

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES DE LRRK2 E PERFIL LINFOCITÁRIO NA DOENÇA DE PARKINSON

ANNA FERNANDES LIBRAIS KASSA; MARÍLIA GOMES CONSTANTINO DA COSTA CALADO; NATALY ROSSINI; EDERSON CICHACZEWSKI

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra (SNpc) e pela presença de inclusões intracelulares de alfa-sinucleína (α -Syn). Mutações em vários genes estão associadas ao desenvolvimento da DP, sendo o leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) um dos mais frequentemente detectados. Estudos experimentais correlacionaram o LRRK2 com respostas inflamatórias do sistema nervoso periférico. O presente estudo realizou uma revisão sistemática desses achados e o objetivo principal deste estudo foi compreender a existência de uma possível ação da Doença de Parkinson no sangue periférico e traçar um perfil linfocitário da mesma nos portadores. A metodologia foi dividida em duas etapas principais: a primeira etapa consistiu em uma revisão sistemática da literatura com caráter qualitativo, utilizando as bases de dados PubMed, Scielo, LILACS e Scopus. A revisão da literatura visou construir um panorama atualizado do estado da arte no campo. Na segunda etapa, os dados foram extraídos de duas bases públicas: Fox Investigation for New Discovery of Biomarkers (BioFIND) e Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI). Ambas as bases contêm histórico médico e análise de fluidos biológicos, dos quais foram selecionados apenas o soro sanguíneo e as amostras de sangue total para este estudo. Três aspectos centrais foram explorados nesta etapa: a seleção de atributos relevantes, a composição para correlações e a precisão dos classificadores escolhidos. Esta etapa envolveu o pré-processamento dos dados, selecionando subconjuntos de interesse e excluindo atributos não relevantes. Os resultados mostraram alterações significativas em citocinas de portadores de DP, incluindo mudanças em monócitos e desequilíbrios de linfócitos T auxiliares (CD4+) em reações inflamatórias. CD4+ e CD8+ foram encontrados em proporções significativamente maiores em pacientes com DP comparados a indivíduos não-portadores. Alterações em subtipos de Linfócitos T reguladores (TReg) e a reatividade das células T em relação a α -Syn também foram observadas.

Palavras-chave: bioinformática; diagnóstico precoce; biomarcador; alfa-sinucleína.

1 INTRODUÇÃO

O gene leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) (ou, também, OMIM 609007) foi descrito pela primeira vez na literatura científica como Roco2, por ser pertencente à família proteica Roco - que possuem domínios estruturais únicos (Boosgraf; van Haastert. 2003). O LRRK2 tem em seu código uma proteína de 2527 aminoácidos composta por múltiplos domínios protéicos, um destes domínios de ligação com GTPases por Proteínas Ras, um domínio carboxila terminal, um domínio de quinase de proteína serina/treonina e muitos outros domínios de repetição. O gene LRRK2 está geneticamente relacionado à fisiopatologia da doença de Parkinson. A doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum, sendo uma doença crônica que manifesta disfunção motora

progressiva (Araki; Ito; Tomita. 2018).

A pesquisa realizada por Brochard *et al* (2008) teve como resultado dados que indicavam que as células T mediadoras na toxicidade dopaminérgica são, na prática, administradas pelos CD4⁺ e requerem a expressão do FasL.

A FasL aumenta concomitantemente à 6-hidroxidopamina (6-OHDA) - composto orgânico que foi indicado como um dos fatores de lesão neuronal na substância negra. A lesão induzida pelo 6-OHDA foi comprovada após experimento onde a apoptose neuronal ocorreu, em ratos, após a sua ativação por via “extrínseca” e sua interação com a FasL no cérebro dos roedores (Pan *et al.* 2007).

As pesquisas relacionando processos inflamatórios à neurodegeneração na DP debatiam se a inflamação é um fator ativo ou uma consequência da degeneração (Hirsch; Hunot 2009). Os resultados de diversos estudos apontam alternâncias atribuídas tanto para respostas celulares tanto pró quanto para anti-inflamatória. A alfa-sinucleína é fator inicial de respostas específicas tanto em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) quanto nos citotóxicos (Sulzer *et al.* 2017).

O objetivo principal deste estudo foi compreender a existência de uma possível ação da Doença de Parkinson no sangue periférico e traçar um perfil linfocitário da mesma nos portadores - buscando um parâmetro para uma análise laboratorial preditiva para a doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi segmentado em duas etapas principais:

A primeira consistiu em uma revisão sistemática da literatura em caráter qualitativo; as bases de dados utilizadas foram Pubmed, Scielo, LILACS e Scopus. Os idiomas selecionados para a leitura dos artigos foram português e inglês, visando um espectro mais abrangente para o levantamento de dados. No estabelecimento dos critérios de inclusão, os autores optaram por artigos publicados a partir do ano de 2005. A decisão baseou-se na possibilidade de reunir os artigos mais recentes, porém, permitindo ao mesmo tempo, a sistematização para construção de uma linha temporal dos avanços no tópico de forma mais abrangente, em trabalhos futuros. Os descritores e operadores booleanos utilizados foram: "alpha-synuclein" OR "LRRK2" AND "parkinson's disease" e em português foram: "alfa-sinucleína" OR "LRRK2" AND "parkinson"

A revisão de literatura foi adotada para a construção de um panorama atualizado a respeito do estado da arte no campo.

Após a extração dos dados, na segunda etapa, com acesso à duas bases de dados Fox Investigation for New Discovery of Biomarkers (BioFIND) e a Parkinson 's Progression Markers Initiative (PPMI).

Ambas as bases possuem histórico médico e análise de fluídos biológicos (dos quais, para este estudo, foi escolhido apenas o sêrum sanguíneo e as amostras em sangue total).

Nesta segunda etapa foram explorados três aspectos centrais: a seleção de atributos relevantes, a composição para as correlações e a precisão dos classificadores escolhidos. Este trabalho deu-se enquanto uma atividade de pré-processamento de dados, selecionando os subconjuntos de interesse e excluindo atributos não relevantes.

Em seguida, pretende-se realizar a análise dos dados correlacionando os resultados sistematizados na revisão de literatura e os dados das bases públicas de interesse.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

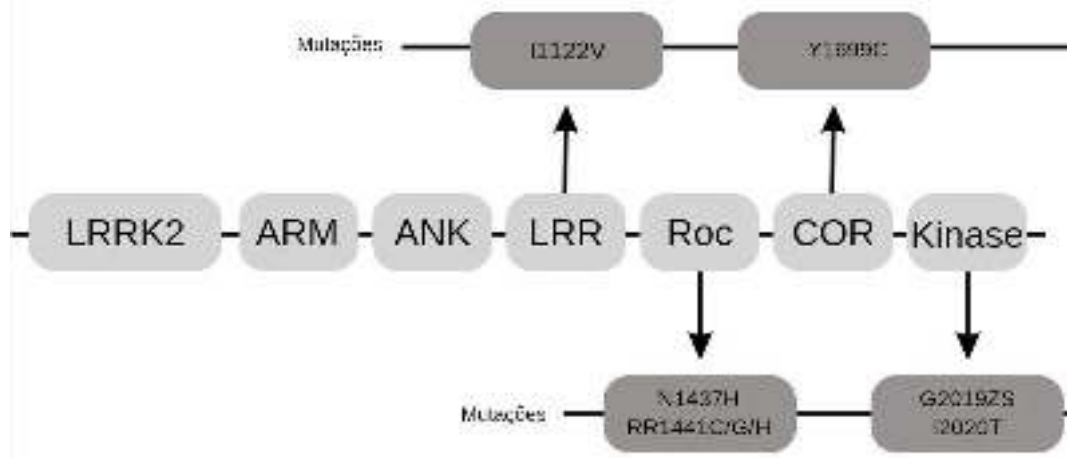
Os dados trazidos por Hisanaga *et al* (2001) mostraram que em sangue periférico, pacientes portadores de Doença de Parkinson tinham níveis menores de linfócitos circulantes do que os pacientes de controle. A porcentagem de CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, e CD4⁻CD8⁺ em sangue periférico não sofreu alterações significativas em ambos os grupos.

Portadores de doença de Parkinson tiveram aumento significativo de linfócitos CD4 + e CD8+ em comparação com o grupo de controle.

Quando feita a coloração com isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina ou ficoeritrina-cianina, os linfócitos CD4+ e CD8+ podiam ser facilmente distinguidos pela densidade e imunoreatividade. O aspecto mais marcante das diferenças foram demonstradas entre CD4+ brilhantes e CD8+ foscas, os quais tinham proporções significativamente maiores em portadores da DP.

Um padrão que foi reconhecido neste estudo é o de que portadores de DP em estágio inicial tiveram a proporção maior entre os linfócitos citados, porém a correlação não foi comprovada na mesma metodologia.

Figura 1 - Mutações no domínio estrutural do LRRK2 na Doença de Parkinson



Em estudos experimentais, a substituição do LRRK2 pós-mutação por sua forma estrutural primária em células T e B periféricas resgatou em parte a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta induzida.

As mutações G2019S na kinase e a R1441G no Roc do LRRK2 foram demonstradas como indutores suficientes para iniciar o processo de perda de neurônios dopaminérgicos, em estudos in-vitro (Kozina; Byrne. 2022).

O entendimento sobre a disfunção imunológica e a estruturação do perfil linfocitário dos pacientes com DP é um caminho em direção a compreensão da patogênese que ainda possui muitos campos a serem explorados.

A tabela a seguir foi construída a partir de uma síntese dos estudos selecionados na revisão de literatura e de como alguns biomarcadores tem se relacionado com as mutações do LRRK2.

Tabela 1 - Biomarcadores e correlação com LRRK2

Biomarcador estudado	Substrato	Correlação com LRRK2 na DP
Alfa sinucleína	Proteína que se acumula nas células cerebrais de pessoas com Parkinson	Estudos sugerem que mutações no gene LRRK2 podem influenciar o acúmulo de alfa-sinucleína no cérebro, contribuindo para o desenvolvimento da doença.
Catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina)	Neurotransmissores envolvidos no controle motor e outras funções cognitivas	O gene LRRK2 pode influenciar a regulação desses neurotransmissores, afetando a função dopaminérgica e contribuindo para os sintomas motores da doença de Parkinson.
Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	Promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos	Estudos sugerem que o gene LRRK2 pode influenciar os níveis de BDNF, afetando a sobrevivência e função dos neurônios dopaminérgicos no cérebro, o que está implicado na patogênese da doença de Parkinson.
Proteína S100B	Marcador de danos neuronais	Alguns estudos encontraram uma associação entre variantes no gene LRRK2 e níveis alterados de proteína S100B, indicando um possível papel do gene na neurodegeneração associada à doença de Parkinson.
Linfócitos T CD4+	Responsáveis pela regulação da resposta imune	Estudos sugerem que o gene LRRK2 pode influenciar a função dos linfócitos T CD4+, levando a alterações na resposta imune, que por sua vez podem estar envolvidas no processo neurodegenerativo na doença de Parkinson.
Linfócitos T CD8+	Envolvidos na destruição de células infectadas ou danificadas	Variantes genéticas no LRRK2 foram associadas a mudanças na proporção de linfócitos T CD8+ no sangue periférico, sugerindo uma possível influência do gene na resposta imune específica na doença de Parkinson.
Linfócitos B	Produzem anticorpos e regulam a resposta imune	Alguns estudos indicaram que variantes no gene LRRK2 podem afetar a função dos linfócitos B, potencialmente contribuindo para a resposta imune anormal observada na doença de Parkinson.
Citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF-alfa, IL-6)	Regulam a resposta inflamatória	O gene LRRK2 pode influenciar a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune, contribuindo para a neuroinflamação observada na doença de Parkinson.

Fonte: dados analisados pelos autores em artigos de interesse (Benner et al., 2008); (Dzamko, N. 2020); (Mao et al. 2016).

A regressão linear simples (RLS) tem a capacidade de usar uma variável de entrada para prever o valor de uma variável de saída, pretende-se por meio dos dados analisados neste estudo implementar um sistema de RLS, treinando um modelo preditivo que encontre padrão entre os biomarcadores e resultados laboratoriais diferenciando pontos chaves do diagnóstico de pacientes portadores de doença de Parkinson e pacientes de grupo controle.

4 CONCLUSÃO

Ainda existem inúmeras lacunas com relação à determinação de biomarcadores em exames laboratoriais para o diagnóstico precoce da Doença de Parkinson, porém com as investigações da expressão do perfil linfocitário e a correlação com outros fatores, novas perspectivas para investigações futuras abrem-se.

Os autores iniciaram novos estudos para uma melhor aplicabilidade da base de dados e, futuramente, pretendem desenvolver e implementar um software de integração.

Com foco na utilização de um modelo de aprendizado de máquina supervisionado para identificar padrões mais complexos, precisão e correlações sutis entre biomarcadores, visando um sistema escalável onde exista a possibilidade de uma análise diagnóstica integrativa entre não apenas a clínica médica e a laboratorial, mas um sistema colaborativo com outras instituições de pesquisa, engenheiros e gestores em saúde.

REFERÊNCIAS

ARAKI, M.; ITO, G.; TOMITA, T. Physiological and pathological functions of LRRK2: implications from substrate proteins. **Neuronal Signal**. 2018.

BENNER E.J.; BANERJEE, R.; REYNOLDS, A. D.; SHERMAN, S.; PISAREV, V.; TSIPERSON, V.; NEMACHEK, C.; CIBOROWSKI, P.; PRZEDBORSKI, E.; MOSLEY, R. L.; GENDELMAN, H. E. Nitrated α -synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. **PloS ONE**. 2008.

BOOSGRAAF, L.; VAN HAASTERT, P.J.M. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. **Biochim. Biophys.** 2003.

BROCHARD, V.; COMBADIÈRE, B.; PRIGENT, A.; LAOUAR, Y.; PERRIN, A.; BERAY-BERTHAT, V.; BONDUELLE, O.; ALVAREZ-FISCHER, D.; CALLEBERT, J.; LAUNAY, J. M.; DUYCKAERTS, C.; FLAVELL, R. A.; HIRSCH, E. C.; HUNOT, S.. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **J clin invest**. 2009.

DZAMKO, N. Investigating lymphocyte populations in patients with Parkinson's disease. **Ann Transl Med**. 2020.

HIRSCH, E. C; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **The Lancet Neurology**. 2009.

HISANAGA, K.; ASAGI, M.; ITOYAMA, Y.; IWASAKI, Y. Increase in Peripheral CD4 Bright⁺ CD8 Dull⁺ T Cells in Parkinson Disease. **Arch Neurol**. 2001.

KOZINA, E; BYRNE, M. Mutant LRRK2 in lymphocytes regulates neurodegeneration via IL-6 in an inflammatory model of Parkinson's disease. **NPJ Parkinson Disease**. 2022.

MAO, X.; OU, M. T.; KARUPPAGOUNDER, S. S.; KAM, T. I.; YIN, X.; XIONG, Y.; GE, P.; UMANAH, G. E.; BRAHMACHARI, S.; SHIN, J. H.; KANG, H. C.; ZHANG, J.; XU, J.; CHEN, R.; PARK, H.; ANDRABI, S. A.; KANG, S. U.; GONÇALVES, R. A.; LIANG, Y.; ZHANG, S.; QI, C.; LAM, S.; KEILER, J. A.; TYSON, J.; KIM, D.; PANICKER, N.; YUN, S. P.; WORKMAN, C. J.; VIGNALI, D. A. A.; DAWSON, V. L.; KO, H. S.; DAWSON, T. M.. Pathological alpha-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. **Science**. 2016.

PAN, J.; ZHAO, Y. X.; WANG, Z. Q.; JIN, L.; SUN, Z. K.; CHEN, S. D. Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. **Elsevier**. 2007.

SULZER, D; ALCALAY, R. N; GARRETTI, F; COTE, L;; KANTER, E; AGIN-LIEBES, J; LIONG, C; MCMURTREY, C; HILDEBRAND, W. H; MAO, X; DAWSON, V. L; DAWSON, T. M; OSEROFF, C; PHAM, J; SIDNEY, J; DILLON, M. B; CARPENTER, C; WEISKOPF, D; PHILLIPS, E; MALLAL, S; PETERS, B; FRAZIER, A; ARLEHAMN, C. S. L.; SETTE, A. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides. **Nature**. 2017.