

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ENEIDA DE OLIVEIRA CABRAL ROCHA

**ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GENÉTICA EM ÁREAS DO CÓRTEX
PRÉ-MOTOR ASSOCIADAS À ATIVIDADE DE NEURÔNIOS-ESPELHO EM
HUMANOS**

Porto Alegre
JUN/2014

ENEIDA DE OLIVEIRA CABRAL ROCHA

**ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GENÉTICA EM ÁREAS DO
CÓRTEX PRÉ-MOTOR ASSOCIADAS À ATIVIDADE DE NEURÔNIOS
ESPELHO EM HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Porto Alegre
JUN/2014

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu pai, José Antônio Cabral Rocha, e à minha mãe, Cleusa Maria de Oliveira Cabral Rocha por simplesmente existirem e serem pessoas tão boas, que me inspiram tanto orgulho. Pai, mãe, vocês são tão importantes para mim que eu nunca vou poder agradecer o suficiente. Não haveria nenhum trabalho pronto sem que vocês estivessem sempre ali. Vocês são as minhas raízes e o centro do meu universo. Obrigada.

Gostaria também de agradecer todo o carinho que recebi de Ricardo Antônio Cervo, uma das pessoas mais gentis que eu conheço e tenho orgulho de conviver. Obrigada pelo teu apoio, querido, pela tua paciência e compreensão, pela tua ajuda tão decisiva. -Obrigada por acreditar em mim-. Letícia Moreira, obrigada pela amizade, por sempre, mesmo sem saber, me apoiar e incentivar e ser estrutural na minha vida.

Gostaria de agradecer *for last but not for least* aos professores desta universidade que realmente fazem a diferença e me inspiraram a ser uma pessoa melhor: Neusa Stobbe Saltiel, por inspirar compreensão e alegria; Denise Zancan, por inspirar paciência e atenção; Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky, por difundir a humildade através do ensino da Evolução, Nelson Jurandi Rosa Fagundes por me ensinar sobre a disciplina mais incrível da Biologia e permitir que eu desenvolvesse esse projeto. Professores Eros Carvalho do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas e Mônica Birchler Vanzalla da Faculdade de Administração também fizeram a diferença para mim por seu profissionalismo, prontidão e seriedade.

Muito obrigada.

Para minha mãe e meu pai

ÍNDICE GERAL

1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	06
3.1 DEFINIÇÃO DA ÁREA HOMÓLOGA HUMANA COM ATIVIDADE DE NEURÔNIOS-ESPELHO E DEFINIÇÃO DO TIPO DE ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	06
3.2 DEFINIÇÃO DA BASE DE DADOS DE MICROARRANJO UTILIZADA.....	08
3.3 UTILIZANDO O PORTAL DE PESQUISA <i>ALLEN BRAIN INSTITUTE</i>	09
3.4 COMPARAÇÕES ENTRE AS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO A E NO GRUPO B.....	10
3.4.1 Criação do Grupo de Genes Corticais na Área de Broca.....	11
3.4.2 Criação do Grupo de Genes do Perfil IFG.....	11
3.5 OBTENÇÃO DAS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA O IFG E PARA O CÓRTEX CEREBRAL.....	11
3.5.1 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o Córtex como um todo(Grupo A).....	12
3.5.2 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo B).....	13
3.5.3 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no Córtex quando comparado ao Cérebro como um todo (GrupoC).....	13
3.6 RELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS ÁREAS AVALIADAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS: UTILIZANDO GenMAPP e MAPPFinder.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1 OBTENÇÃO DAS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA O IFG E PARA O CÓRTEX CEREBRAL	15
4.1.1 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o Córtex como um todo (Grupo A).....	15
4.1.2 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo B).....	15
4.1.3 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no Córtex quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo C).....	17
4.2 COMPARAÇÕES ENTRE AS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO A E NO GRUPO B	19

4.3	PERFIL DE ENRIQUECIMENTO GENÉTICO: RELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS ÁREAS AVALIADAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS	19
4.3.1	Processos Biológicos enriquecidos para os “genes corticais” do IFG.....	20
4.3.2	Processos Biológicos enriquecidos na Área de Broca (Perfil IFG).....	21
4.3.3	Processos Biológicos enriquecidos no córtex como um todo (Grupo C).....	22
4.4	COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DO CÓRTEX COM OS PROCÊSOS BIOLÓGICOS DOS GENES CORTICAIS DA ÁREA DE BROCA.....	23
4.4.1	Lista de processos com <i>Fold-change</i> > 1.5.....	24
4.4.2	Lista de processos com pelo menos 20% de enriquecimento e pelo menos 10 genes diferenciais presentes em cada categoria.....	24
5.	DISCUSSÃO.....	26
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	27
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

RESUMO

Os neurônios-espelho são neurônios relacionados ao processamento de ações intencionais executadas por um indivíduo ou observadas enquanto outro indivíduo as executa. Após a descoberta dessas células, várias especulações teóricas foram realizadas, sendo a funcionalidade dos neurônios-espelho relacionada a tarefas cognitivas como a compreensão das atitudes alheias, atribuição de significado a eventos executados e desenvolvimento de uma Teoria da mente. Dessa forma, a presença de neurônios-espelho estaria intimamente ligada à capacidade de um indivíduo apresentar um comportamento empático e compatível com a presença de habilidades pró-sociais.

A atividade dessas células foi diretamente observada no córtex pré-motor de macacos, enquanto a atividade de neurônios-espelho em humanos foi indiretamente observada através de estudos por ressonância magnética funcional (fMRI) numa área homóloga à área F5, a área 44 de Brodmann ou Área de Broca. Este trabalho busca, então, agrupar um conjunto de informações sobre o perfil humano de expressão genética nessa área cerebral de interesse a fim de proceder futuras comparações com os perfis de expressão de outros animais onde não há registro direto ou indireto de neurônios-espelho mas há observação de comportamentos pró-sociais sugestivos da presença destas células.

A fim de obter um perfil de expressão genética da Área de Broca, optou-se pela avaliação de dados de microarranjos deste local e não somente de uma determinada população de neurônios. Esta abordagem forneceria

um conjunto mais completo e informativo sobre as características da área como um todo, além de permitir comparações futuras contra outros conjuntos de dados. As informações sobre a expressão genética da área de Broca foram obtidas do portal Allen Brain Institute, disponíveis online, analisadas e agrupadas em listas. Informações a cerca dos processos biológicos correspondentes aos genes diferencialmente expressos foram obtidas através do software GenMAPP e MAPPFinder.

O resultado da pesquisa demonstrou que tanto a expressão genética quanto os processos biológicos são de certo modo homogêneos dentro do córtex humano quando o comparamos com o resto do cérebro. Apesar disso, os resultados apontaram 24 processos biológicos altamente enriquecidos na área de Broca quando comparada com o córtex como um todo.

A pesquisa realizada buscou construir um conjunto de dados preliminares que visam colocar em evidência os processos biológicos bem como os genes que participam de um perfil próprio da área de Broca. Com isso, coloca-se em perspectiva um posterior refinamento das informações obtidas e a utilização delas em estudos comparativos.

2. INTRODUÇÃO

Tomando o cérebro como um órgão de extrema complexidade, podemos abordá-lo cientificamente em vários níveis. Entre eles estão a neuroanatomia, a neuro-histologia e a neurofisiologia, por exemplo. Porém, aquilo que é somado ao conhecimento humano sobre o funcionamento do sistema nervoso dos animais pode ser interpretado também “à luz da evolução”, o que, segundo Theodosius Dobzhansky, teria a capacidade de conferir sentido a tudo o que aprendemos através das pesquisas em biologia[1].

De modo geral, as neurociências evolutivas abrigam conjuntos diversos de frentes investigativas e cada um deles conta com ferramentas distintas para suas atividades. Temos disciplinas clínicas, que englobam a neuropsicologia, a psiquiatria, a psicologia clínica e a psicopatologia. Temos também as ciências do comportamento, representadas pela etologia, ecologia comportamental, antropologia biológica e psicologia evolucionista. E temos também uma terceira categoria de investigação, centrada em estudos genéticos, para a qual contribuem a neurogenética, a genômica, a paleontogenética, a biologia do desenvolvimento e a genética do comportamento [1]. Todas elas buscam obter uma maior compreensão sobre os caminhos através dos quais a natureza guiou os organismos, levando-os a possuírem os cérebros de hoje, com as implicações comportamentais e cognitivas relacionadas.

Este trabalho de conclusão de curso em Biomedicina é um estudo preliminar sobre o perfil de expressão genética da Área de Broca em humanos, e tem como objetivo gerar um conjunto inicial de dados que possa servir como parâmetro para outras investigações, sejam elas intra ou interespecíficas.

Este plano foi elaborado partindo do que hoje se conhece sobre a surpreendente atividade de alguns neurônios especiais identificados, em 1996, no córtex motor de macacos, por Giacomo Rizzolatti na Universidade de Parma, Itália [2]. Esses neurônios chamaram a atenção dos pesquisadores pelo fato de serem responsivos tanto durante a execução de

certas atividades realizadas pelo próprio indivíduo que os possui, quanto durante a observação das mesmas atividades sendo realizadas por outros indivíduos. Desta forma, o que estava sendo registrado era a capacidade de um indivíduo analisar a atividade de outro como se fosse a sua própria atividade. Assim, os neurônios em questão foram chamados de “neurônios-espelho”, sugerindo que seu funcionamento poderia contribuir de modo importante para o aprendizado e para a compreensão da intenção e atitude alheias [3].

Atualmente, as pesquisas sobre neurônios-espelho estão cada vez mais complexas, preenchendo gradualmente as várias lacunas produzidas pela nova descoberta. Hoje, fala-se de um “sistema de neurônios-espelho” [4], e ele já foi detectado em diferentes áreas cerebrais, tanto nas pesquisas com macacos quanto em pesquisas com humanos, onde as observações foram feitas a partir de avaliações por ressonância magnética [5]. Porém, não há ainda na literatura uma tentativa de traçar um perfil genético dessas áreas funcionais para posterior estudo comparativo intra ou interespecífico com a intenção clara de associar as funções a seus respectivos padrões de expressão.

A comunidade científica chamou a atenção ao longo dos anos para a semelhança anatômica e histológica entre os encéfalos dos animais na natureza. Essa homologia foi se reafirmando à medida que esses estudos foram se estendendo a níveis mais profundos. Seguindo essa linha de investigação, foi demonstrado, então, que todos os cérebros de vertebrados seguiam um plano básico de construção [6]. Levando essas informações em conta, é coerente esperar que as homologias anatômicas também impliquem em homologias comportamentais. Assim, quando tratamos da existência de certos sistemas anátomo-funcionais em alguns animais que demonstram comportamentos específicos como o de espelhagem, podemos especular sobre a existência de um sistema homólogo em animais que apresentam os mesmos comportamentos.

Partindo do princípio que os cérebros dos animais que apresentam capacidade de aprendizagem, – ou ainda mais pronunciadamente – os animais que apresentam comportamentos sociais, são em maior ou menor

grau evolutivamente correlacionados aos nossos próprios cérebros, é esperado que uma boa parte dos vertebrados, e pelo menos a maioria dos mamíferos possuam a “atividade-espelho” já identificada em primatas, ocorrendo em áreas corticais homólogas [7]. Infelizmente, a observação direta dessa atividade cortical não é possível para a maioria dos animais devido às limitações metodológicas inerentes a uma verificação desta natureza.

A abordagem genética para a análise das áreas corticais que apresentam atividade de neurônios-espelho seria a alternativa necessária para estabelecer uma identidade dessas áreas anátomo-funcionais homólogas. Isso poderia, num segundo momento, trazer à tona a possibilidade de um estudo comparativo relacionando os perfis de expressão genética entre vários organismos, bem como a possibilidade de um estudo evolutivo dos genes presentes e associados às áreas de interesse.

Sendo assim, um primeiro passo em direção à comparação do perfil genético interespecífico seria a identificação de quais genes estariam associados à atividade de neurônios-espelho, de modo que seu perfil de expressão possa ser comparado em diferentes organismos (e em diferentes áreas cerebrais). Apesar da descoberta dos neurônios-espelho tratar do registro da atividade de células específicas na área F5 do córtex pré-motor de macacos, seria infrutífero tentar traçar um perfil de expressão para essas células porque não se trata de um tipo celular único, mas de um neurônio piramidal encontrado em abundância em camadas diferentes do neocórtex.

Deste modo, a abordagem necessária teria de levar em conta - não o tipo celular -, mas perfil daquela área como um todo a fim de detectar algum padrão. Assim, a alternativa encontrada foi a construção e análise de um perfil humano de expressão genética de neurônios espelho comparando a área 44 de Brodmann (com atividade de “espelhagem”) com áreas “controle”, ou seja, áreas que poderiam servir de referência e contraste para a área de Broca. Esta foi a tarefa desenvolvida neste trabalho.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 DEFINIÇÃO DA ÁREA HOMÓLOGA HUMANA COM ATIVIDADE DE NEURÔNIOS-ESPELHO E DEFINIÇÃO DO TIPO DE ABORDAGEM EXPERIMENTAL

A atividade de espelhagem foi primeiramente descrita em macacos *Rhesus* em 1996, na universidade de Parma, Itália, por Giacomo Rizzolatti e colegas[1]. Neste famoso experimento, a área submetida à análise correspondia ao córtex pré-motor, onde foi registrada a atividade de 532 neurônios na parte rostral da área 6 inferior, chamada área F5, em tarefas de observação de ações intencionais. Em um segundo momento as pesquisas se direcionaram para a identificação e análise de áreas anatomicamente homólogas entre cérebro de macacos e de humanos. O que resultou dessa pesquisa realizada por fMRI foi o estabelecimento da área 44 de Brodmann como a área humana correspondente à atividade mais significativa de neurônios-espelho[8].

Trata-se, portanto, da chamada “Área de Broca”, localizada no giro frontal inferior do córtex cerebral, classicamente relacionada à produção e processamento da linguagem juntamente com a Área de Wernick situada na porção posterior do giro temporal superior do córtex (esquerdo). A esse respeito, Buccino e colegas discorreram, em artigo em 2006, sobre a justaposição da atividade “linguística” à atividade pré-motora na Área de Broca, o que representaria uma possível corroboração para a hipótese de Libberman, - a teoria motora da percepção da fala [2]-, na qual os objetos da percepção da fala não estariam ligados ao som, mas primariamente ao gestual fonético [8]. Isso é importante porque representa uma das possíveis vias de conexão entre a visualização de ações e conexões com suas respectivas intencionalidades em humanos (significação, compreensão empática) [9], [10].

Assim, a área cerebral humana fixada como objeto deste estudo foi a área homóloga à F5 dos macacos, ou seja, o Giro Frontal Inferior (IFG, acrônimo para língua inglesa), que inclui a *pars opercularis* e *pars triangularis* e *pars orbitali*, no córtex pré-motor do lobo frontal, na área 44 de Brodmann, conhecida como Área de Broca [10].

A área humana homóloga à área F5 classicamente associada à atividade de neurônios espelho foi buscada no banco de dados do *Allen Brain Institute*, e ela se mostrou presente no estudo original e disponível publicamente *online*. A figura 2 (Fig 2) obtida através do *software Brain Explorer v2.0* mostra o posicionamento anatômico do Giro Frontal Inferior (IFG, área 44 de Brodmann) estudado.

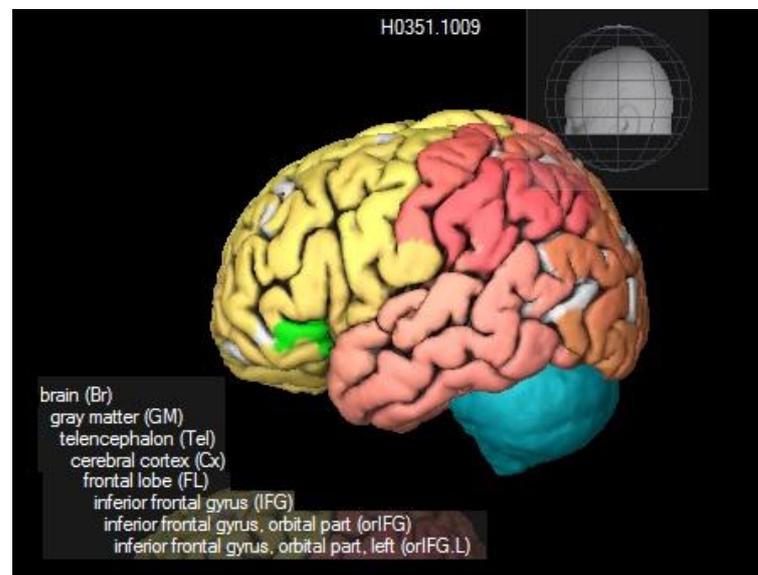


Figura 2 | Posicionamento anatômico do giro frontal inferior (IFG). Destacado em verde o Giro Frontal Inferior (*pars opercularis* selecionada) que corresponde a área 44 de Brodmann ou área de Broca, visualizada no *software Brain Explorer v2.0* disponível pelo *Allen Brain Institute* contém visualizações para os dados disponíveis na plataforma *online*.

3.2 DEFINIÇÃO DA BASE DE DADOS DE MICROARRANJO UTILIZADA

Para que fosse possível trazer à tona alguma informação acerca das características próprias do IFG (Giro Frontal Inferior), optou-se pela avaliação do perfil global de transcrição genética baseado nos resultados de experimentos com microarranjos de expressão gênica, o que poderia revelar tanto mudanças no grau de expressão genética quanto no tipo de expressão genética para o local de interesse [11].

Os estudos com microarranjos para fins de avaliação de áreas cerebrais são recentes e até 2002 não havia estudo que avaliasse as diferenças de expressão genética para conjuntos mistos de tecido como é o caso do cérebro [12]. Em 2004, um importante estudo sobre evolução do perfil de expressão genética em chimpanzés e humanos foi publicado por Khaitovich et al., inserindo mais elementos para a pesquisa em evolução do cérebro (e de grandes sistemas)[12], inferindo regulação positiva ou negativa, e acelerações ou diminuições na taxa de evolução de certos genes baseados em resultados de experimentos com microarranjo [13]. Os estudos subsequentes também direcionaram o olhar para modificações dos perfis de expressão genética e como eles poderiam ser interpretados [14].

O ponto de partida para o presente estudo constituiu-se de uma pesquisa primária na base de dados de microarranjo disponibilizados online publicamente através do portal *Allen Brain Atlas* (<http://www.brain-map.org>). Esse portal é uma iniciativa que disponibiliza visualização, exploração, localização de amostras cerebrais histológicas e em MRI correlacionadas à expressão genética, além de validações e dados de hibridização *in situ*, sendo os dados gerados utilizando tecnologia *high-throughput* [15]. Amostras do estudo partiram do tecido cerebral total de seis indivíduos doadores *post mortem*. Cada região cerebral foi dissecada e submetida a uma extração de mRNA. A plataforma escolhida para proceder a hibridização foi *genome-wide Agilent 8x60K array chip*, e os dados da hibridização (*one color array*) foram revelados pelo software *Agilent Feature*

Extraction Software (v10.5). Em seguida, os valores da expressão genética para cada região analisada foram processados em linguagem R, utilizando o pacote “Agi4x44PreProcess” para o *Bioconductor*.

Esses dados normalizados para todas as amostras foram então disponibilizados para *download* em formato (.csv) no portal *Allen Brain Institute*. Toda a descrição da preparação de amostras e análise de dados do projeto estão disponíveis no *Supplementary Table and Technical White Papers* disponíveis online [16].

3.3 UTILIZANDO O PORTAL DE PESQUISA ALLEN BRAIN INSTITUTE

A base de dados do *Allen Brain Institute* possui uma interface onde o usuário pode promover dois tipos principais de buscas para dados de expressão em humanos: uma por genes individuais (*gene search*) e outra por diferenças entre a expressão de duas ou mais estruturas cerebrais (*differential search*) [16]. (Fig 1)

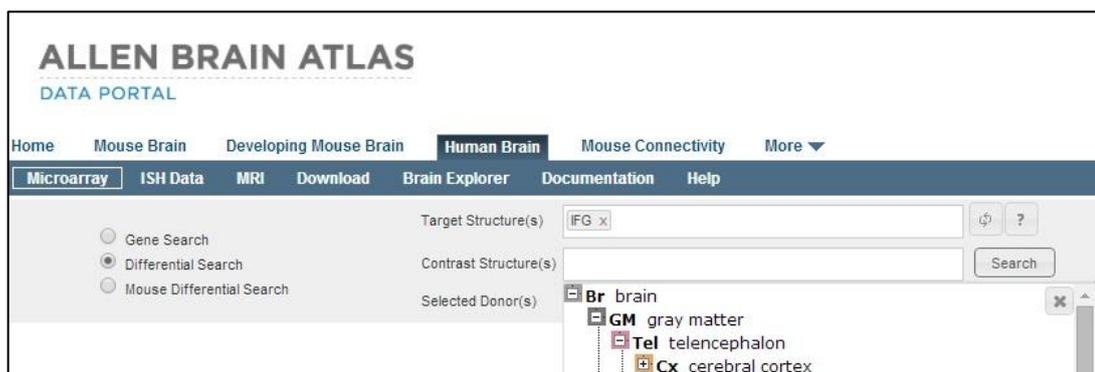


Figura 1 | Interface online do portal de dados Allen Brain Atlas. A figura mostra a página inicial onde o usuário promove a busca de interesse. A partir desta plataforma são fornecidas informações sobre os experimentos de microarranjo realizados para seis amostras. Todos os campos de busca podem ser definidos arbitrariamente pelo usuário.

Este trabalho baseou-se na obtenção de dados de microarranjo para o IFG (giro frontal inferior, área 44 de Brodmann, *Broca's area*) a partir da busca diferencial online. Primeiramente foi procedida a escolha das estruturas que foram comparadas. Então, os valores de expressão genética presentes *online* para as estruturas escolhidas foram contrastados automaticamente e um arquivo contendo valores *p* calculados, bem como valores de *fold-change* (diferença de expressão) foi gerado internamente e disponibilizado para *download*.

É importante frisar que os resultados gerados pela busca diferencial (*p-values* e *fold-changes*) são sempre relativos à estrutura alvo estabelecida pelo usuário, e são dependentes da(s) estrutura(s)-alvo escolhidas para comparação. Os valores são calculados internamente pelo algoritmo embutido no código do portal online.

Tanto para a busca diferencial quanto para a busca simples de genes arbitrários, o resultado é dado em forma de um mapa de calor (*heat map*) que reflete um maior ou menor grau de expressão para cada gene nas diferentes estruturas relacionadas. Esse mapa de calor é disponibilizado segundo valores de *fold-change* ou da intensidade da expressão genética relacionada aos genes listados.

3.4 COMPARAÇÕES ENTRE AS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO A E NO GRUPO B

A comparação entre as listas de genes diferencialmente expressos (grupo A *versus* grupo B) foi realizada manualmente, produzindo duas diferentes listas ou subgrupos dos quais poderia ser extraído um conjunto de informações mais significativas com as análises posteriores: “Grupo Cortical” e “Grupo Perfil”.

3.4.1 Criação do Grupo de Genes Corticais na Área de Broca

Caso fossem encontrados genes participando apenas do grupo B (IFG VS Br) e não do grupo A (IFG VS Cx), isso significaria que eles seriam característicos das áreas corticais de um modo geral. Assim, uma vez que houvesse diferença de expressão de certos genes em relação ao cérebro e não houvesse diferença se tratando do córtex, isso equivaleria a dizer que os genes avaliados fariam parte de um perfil de expressão característico do córtex como um todo, ou seja, estaríamos tratando de genes “corticais” na área de Broca (IFG). Genes que se enquadravam nessa condição foram alocados em um subgrupo chamado Grupo Cx_IFG, ou “grupo cortical”.

3.4.2 Criação do Grupo de Genes do Perfil IFG

Para genes que estivessem presentes tanto no grupo A (IFG VS Cx) quanto no grupo B (IFG VS Br), possivelmente estaríamos tratando de genes mais aproximadamente relacionados ao perfil de expressão único do IFG. Quando os genes apresentassem diferenças de expressão em relação às outras áreas cerebrais, mas também apresentassem diferenças em relação a áreas corticais, isso seria indicativo de que aqueles genes estariam com suas expressões caracteristicamente modificadas para a área de Broca em especial. Esse subgrupo foi denominado Grupo IFG ou “grupo perfil”.

3.5 OBTENÇÃO DAS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA O IFG E PARA O CÓRTEX CEREBRAL

Para obter uma lista prioritária de genes diferencialmente expressos no IFG (Giro Frontal Inferior, área de Broca, 44 de Brodmann), foram criados três grupos de comparação através da ferramenta *differential search*.

O primeiro grupo (grupo A) de comparação é composto por IFG (giro frontal inferior, área 44 de Brodmann, alvo) *versus* córtex (Cx, contraste). O

segundo grupo (grupo B) é composto por IFG (alvo) *versus* cérebro (Br, contraste). O terceiro grupo (grupo C) é composto por córtex (Cx, alvo) *versus* cérebro (Br, contraste).

Uma vez que esses três grupos fossem criados, poderíamos então, por comparação, proceder a averiguação dos genes que estariam atuando diferencialmente para o córtex como um todo, ou mais especificamente para o IFG, ou ainda apontar quais genes obtidos seriam relacionados ao perfil cortical do IFG.

3.5.1 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o Córtex como um todo (Grupo A)

Primeiramente, a partir da busca diferencial e do contraste gerado, foi obtido um conjunto de dados sobre os microarranjos disponibilizados em arquivos do tipo .csv. O arquivo contendo os valores de expressão é obtido em modo processado contendo os valores de expressão genética calculados utilizando normalização com valores de \log_2 [16]. Além desse arquivo, outros dois arquivos foram gerados correspondendo a metadados sobre as amostras e sobre os genes testados.

O arquivo contendo metadados sobre os genes testados (Probes.csv) foi manipulado na plataforma do Biocondutor [17], usando linguagem R para criar uma tabela disposta em ordem crescente para os valores de *fold-change* a fim de identificar e selecionar os genes com valores de *fold-change* $> 1,5$ e *p-values* $< 0,05$ [18]. Para tanto, foram empregados os dados das primeiras 2000 ocorrências derivadas da pesquisa no *Brain Atlas*.

Os genes classificados foram então chamados de Grupo A (grA) e foram comparados a um segundo grupo, o Grupo B (grB).

3.5.2 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo B)

Esse segundo grupo foi obtido do mesmo modo que o Grupo A, e corresponde aos genes diferencialmente obtidos no contraste entre IFG e todas as estruturas cerebrais além do córtex testado anteriormente.

O arquivo contendo metadados sobre os genes testados (Probes.csv) foi também manipulado em linguagem R, com o pacote Biocondutor [17], para criar uma tabela disposta em ordem crescente para os valores de *fold-change* a fim de identificar e selecionar os genes com valores de *fold-change* $> 1,5$ e *p-values* $< 0,05$, ou seja, os mesmos critérios estabelecidos para o grupo A. Neste caso, foram empregados os dados das primeiras 2823 ocorrências derivadas da pesquisa no *Brain Atlas*. Essa comparação foi realizada a fim de detectar os genes que estariam sendo expressos diferencialmente somente no IFG.

3.5.3 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no Córtex quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo C)

Num terceiro momento, um último grupo foi gerado a fim de se observar o comportamento dos genes no córtex como um todo quando comparado com o cérebro.

Seguindo os mesmos passos anteriores, o arquivo Probes.csv foi manipulado em linguagem R, com o pacote Biocondutor, para criar outra tabela disposta em ordem crescente para os valores de *fold-change* para que fosse possível identificar e selecionar os genes com valores de *fold-change* $> 1,5$ e *p-values* $< 0,05$, seguindo os critérios estabelecidos para o grupo A e para o grupo B. Neste caso, foram empregados os dados das primeiras 2000 ocorrências derivadas da pesquisa no *Brain Atlas*.

3.6 RELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS ÁREAS AVALIADAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS: UTILIZANDO GenMAPP e MAPPFinder

A fim de criar um conjunto de dados que pudessem indicar em um nível mais elevado os tipos de atividades biológicas que estariam presentes no IFG (giro frontal inferior, área 44 de Brodmann), suas particularidades ou abrangências, partiu-se então para a avaliação do chamado “grau de enriquecimento funcional” (*functional enrichment*) [18] tomando como referência as listas de genes diferencialmente expressos obtidos no banco de dados do *Allen Brain Institute*.

A análise do enriquecimento funcional é uma forma particular de análise dos genes diferencialmente expressos em microarranjos porque ela funciona a partir da comparação dos resultados dos valores de expressão genética (processados ou não processados) com a presença dos genes em determinadas rotas metabólicas. Isso é feito cruzando as informações de arquivos de dados fornecidos pelo pesquisador com informações de anotações contidas em plataformas online como o Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), por exemplo [19].

Esta etapa do trabalho foi realizada utilizando o *software* GenMAPP (Gene Microarranjo Pathway Profiler) gratuitamente disponível online através do site <http://www.genmapp.org/>. GenMAPP é uma ferramenta muito utilizada para avaliar as funções biológicas ligadas aos genes diferencialmente expressos em microarranjos. Esses experimentos classicamente produzem milhares de dados, o que dificulta muito a avaliação manual da função de cada gene diferencialmente expresso em um *gene chip*, por exemplo. Sendo assim, quando utilizamos o GenMAPP, convertemos as listas de genes diferencialmente expressos em arquivos onde é possível rastrear suas presenças em listas relativas a processos biológicos identificados pelo programa.

Em conjunto com a utilização do GenMAPP está a utilização do *software* MAPPFinder, uma ferramenta que lê os arquivos gerados pelo

GenMAPP, gerando por sua vez uma lista onde se pode observar a quantidade e a incidência dos genes diferencialmente expressos em diferentes categorias. O programa cria um perfil global de expressão genética também baseado na integração das anotações no Gene Ontology (GO) Project [19].

4. RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DAS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA O IFG E PARA O CÓRTEX CEREBRAL

Para obter uma lista prioritária de genes diferencialmente expressos no IFG (Giro Frontal Inferior, área de Broca, 44 de Broadmann), foram obtidos os dados para três tipos distintos de comparação:

4.1.1 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o Córtex como um todo (Grupo A)

A pesquisa procedida para comparar a expressão genética do IFG contra o córtex produziu uma lista contendo 150 genes que satisfizeram as condições de *fold-change* > 1,5 e *p-values* < 0,05. Destes 150 genes são mostradas as primeiras 29 ocorrências. (Tabela 1).

Tabela 1 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo A

ID	Gene ID	Gene symbol	Gene name	Entrez-id	Chromosome	p-value	Fold-change
10380 43	57983	TFAP2D	transcription factor AP-2 delta (activating enhancer binding protein 2 delta)	83741	6	1.49e-11	2,299
10483 73	9463	CARTPT	CART prepropeptide	9607	5	8.72e-13	2,275
10372 11	59125	C13orf33	chromosome 13 open reading frame 33	84935	13	1.37e-19	2,269
10352 68	79499	RTP1	receptor (chemosensory) transporter protein 1	132112	3	1.31e-20	2,265
10169 34	152816	CTXN3	cortexin 3	613212	5	9.61e-19	2,190
10166 64	81682	FREM3	FRAS1 related extracellular matrix 3	166752	4	4.15e-10	2,162
10506 68	7119	TPBG	trophoblast glycoprotein	7162	6	2.11e-23	2,141
10347 92	80350	AMDHD1	amidohydrolase domain containing 1	144193	12	1.04e-24	2,108
10596	7096	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	7139	1	3.13e-	2,108

23						21	
10551 37	3465	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	3485	2	3.76e- 16	2,072
10125 24	80296	FRMPD2	FERM and PDZ domain containing 2	143162	10	1.81e- 17	2,026
10403 61	37190	NGB	neuroglobin	58157	14	2.02e- 12	1,900
10579 35	1405	CRYBB1	crystallin, beta B1	1414	22	6.03e- 12	1,890
10158 32	10270	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	10417	4	9.22e- 11	1,870
10162 07	59020	ADTRP	androgen-dependent TFPI-regulating protein	84830	6	1.50e- 17	1,860
10346 14	80607	CBLN2	cerebellin 2 precursor	147381	18	2.90e- 24	1,825
10505 74	7219	PHLDA2	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	7262	11	3.20e- 16	1,825
10547 02	3827	KRT5	keratin 5	3852	12	1.21e- 14	1,821
10302 44	1590	DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila)	1602	13	3.55e- 20	1,809
10200 57	29532	POM121L8P	POM121 transmembrane nucleoporin-like 8 pseudogene	29797	22	4.60e- 09	1,802
10533 72	5021	PAH	phenylalanine hydroxylase	5053	12	7.21e- 16	1,797
10446 27	26878	KCNH5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5	27133	14	9.71e- 12	1,789
10287 59	430	ASGR2	asialoglycoprotein receptor 2	433	17	4.42e- 12	1,785
10264 67	10728	NPFRR2	neuropeptide FF receptor 2	10886	4	5.53e- 09	1,778
10156 89	100251 1	LOC1002944 69	hypothetical protein LOC100294469	1002944 69	8	2.30e- 10	1,772
13147	31205	FBXO40	F-box protein 40	51725	3	3.05e- 08	1,754
10166 37	9696	TESPA1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	9840	12	7.50e- 28	1,740
10243 55	83431	METTL21C	methyltransferase like 21C	196541	13	4.42e- 07	1,740
10585 74	840	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	844	1	1.70e- 13	1,731

Tabela 1 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo A. Dos 150 genes que satisfizeram as condições estabelecidas, são mostradas as primeiras 30 ocorrências, ou seja, os 30 genes com maior grau de expressão genética no IFG quando comparados com o córtex cerebral.

4.1.2 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no IFG quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo B)

Por sua vez, a pesquisa relativa à comparação da expressão genética do IFG contra o cérebro como um todo produziu uma lista de genes que satisfizeram as condições de *fold-change* > 1,5 e *p-values* < 0,05. Neste caso, os genes obtidos compuseram uma lista de 2823 genes que se mostravam pelo menos uma vez e meia mais expressos no IFG do que no cérebro como um todo. (Tabela 2).

Tabela 2 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo B

ID	Gene ID	Gene symbol	Gene.name	Entre z.id	Chromosome	p-value	Fold-change
1035 256	79515	TMEM155	transmembrane protein 155	132332	4	3.57e-245	12.48
1058 533	880	CCK	cholecystokinin	885	3	1.95e-87	9,304
1058 534	880	CCK	cholecystokinin	885	3	1.26e-101	9,184
1026 514	12240 8	THEMIS	thymocyte selection associated	387357	6	6.3e-38	8,782
1056 965	2274	FOXG1	forkhead box G1	2290	14	9.96e-144	8.59
1016 087	94681	LY86-AS1	LY86 antisense RNA 1 (non-protein coding)	285780	6	2.68e-134	8.36
1025 477	7096	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	7139	1	1.21e-51	8.23
1016 637	9696	TESPA1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	9840	12	3.37e-134	7,794
1054 779	3762	KCNS1	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 1	3787	20	1.17e-61	7,706
1016 922	4869	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	4900	11	1.56e-102	7,544
1049 116	8880	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3	8988	5	6.14e-107	7,528
1048 356	9471	GDA	guanine deaminase	9615	9	1.32e-100	7,465
1025 478	7096	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	7139	1	5.52e-40	7,394
1012 781	4869	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	4900	11	3.83e-62	6,826
1059 623	7096	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	7139	1	5.24e-52	6,779
1026 885	36435	TRIM54	tripartite motif containing 54	57159	2	7.09e-84	6.77
1011 934	9696	TESPA1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	9840	12	1.81e-77	6,682
1050 121	7736	SLC30A3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	7781	2	2.26e-49	6,667
1049 060	8913	PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	9033	10	1.3e-50	6,587
1050 120	7736	SLC30A3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	7781	2	1.09e-136	6,523
1033 783	81720	GALNTL5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5	168391	7	6.32e-42	6,077
1016 207	59020	ADTRP	androgen-dependent TFPI-regulating protein	84830	6	7.19e-50	5,826
1016 664	81682	FREM3	FRAS1 related extracellular matrix 3	166752	4	8.09e-27	5,807
1016 188	10015 16	PP12613	uncharacterized LOC100192379	100192 379	4	1.05e-66	5.71
1011 393	94754	SLC26A4-AS1	SLC26A4 antisense RNA 1 (non-protein coding)	286002	7	3.24e-58	5,656
1021 943	37774	RXFP1	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	59350	4	6.83e-47	5,597
1026 515	12240 8	THEMIS	thymocyte selection associated	387357	6	2.26e-32	5,535
1033 784	81720	GALNTL5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5	168391	7	1.5e-37	5,501

Tabela 2 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo B. Dos 2823 genes que satisfizeram as condições estabelecidas, são mostrados os 30 genes com maior grau de expressão genética no IFG quando comparados com o cérebro inteiro.

4.1.3 Gerando a Lista de Genes Diferencialmente expressos no Córtex quando comparado ao Cérebro como um todo (Grupo C)

A pesquisa relativa à comparação da expressão genética do córtex contra o cérebro como um todo produziu uma última lista de genes. Esta

última busca resultou em um grupo de 924 genes que satisfizeram as condições de *fold-change* > 1,5 e *p-values* < 0,05 estabelecidas. Os dados são mostrados na tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo C

ID	Gene ID	Gene symbol	Gene name	Entrez id	Chromosome	p-value	Fold-change
1035256	79515	TMEM155	transmembrane protein 155	132332	4	0.00E+00	9.29
1056965	2274	FOXP1	forkhead box G1	2290	14	0.00E+00	8.853
1048356	9471	GDA	guanine deaminase	9615	9	0.00E+00	6.839
1058533	880	CCK	cholecystokinin	885	3	0.00E+00	6.773
1016922	4869	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	4900	11	0.00E+00	6.209
1050120	7736	SLC30A3	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	7781	2	0.00E+00	5.997
1016087	94681	LY86-AS1	LY86 antisense RNA 1 (non-protein coding)	285780	6	0.00E+00	5.943
1049116	8880	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3	8988	5	0.00E+00	5.547
1026514	122408	THEMIS	thymocyte selection associated	387357	6	5.35E-276	5.385
1042322	34368	FEZF2	FEZ family zinc finger 2	55079	3	0.00E+00	5.172
1054779	3762	KCNS1	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 1	3787	20	7.24E-313	5.021
1044726	26757	KCNV1	potassium channel, subfamily V, member 1	27012	8	0.00E+00	5.006
1026885	36435	TRIM54	tripartite motif containing 54	57159	2	0.00E+00	4.955
1049060	8913	PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1	9033	10	0.00E+00	4.852
1025477	7096	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)	7139	1	0.00E+00	4.704
1048690	9220	LHX2	LIM homeobox 2	9355	9	0.00E+00	4.611
1040066	40610	NEUROD6	neuronal differentiation 6	63974	7	1.56E-317	4.603
1016637	9696	TESPA1	thymocyte expressed, positive selection associated 1	9840	12	2.95E-251	4.478
1027382	125853	OR14I1	olfactory receptor, family 14, subfamily I, member 1	401994	1	0.00E+00	4.381
1049632	8441	ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB-like domain)	8507	5	0.00E+00	4.317
1011393	94754	SLC26A4-AS1	SLC26A4 antisense RNA 1 (non-protein coding)	286002	7	0.00E+00	4.277
1053623	4847	NPPA	natriuretic peptide A	4878	1	0.00E+00	4.215
1040959	36308	SLC17A7	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	57030	19	2.68E-308	4.18
1057339	1947	EGR3	early growth response 3	1960	8	0.00E+00	4.121
1033783	81720	GALNTL5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5	168391	7	6.40E-308	4.098
1049100	8889	KALRN	kalirin, RhoGEF kinase	8997	3	0.00E+00	4.08
1033528	83565	CREG2	cellular repressor of E1A-stimulated genes 2	200407	2	0.00E+00	3.981
1053752	4735	NEUROD2	neuronal differentiation 2	4761	17	4.39E-214	3.935
1029479	811	CAMK2A	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	815	5	0.00E+00	3.912

Tabela 3 | Lista de genes diferencialmente expressos no grupo C. Dos 924 genes que se mostraram pelo menos uma vez e meia mais expressos no córtex como um todo do que no cérebro como um todo, são mostradas as 30 primeiras ocorrências (*p-value* < 0,05).

4.2 COMPARAÇÕES ENTRE AS LISTAS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO A E NO GRUPO B

A partir da comparação entre o grupo B e o grupo A, obtivemos uma lista de genes que representavam o perfil cortical associado à área de Broca. Deste modo, foram catalogados apenas os genes que apareciam na lista do grupo B, o que resultou em um “subgrupo cortical” composto por 1398 genes, uma vez que se retiraram os genes que ocorriam em ambos.

Este procedimento foi repetido, mas, desta vez, os genes que apareciam tanto no grupo A quanto no grupo B foram aqueles catalogados. Com isso, formou-se uma lista correspondente ao “subgrupo perfil”, ou seja, uma lista composta por 87 genes diferencialmente expressos no IFG tanto para o cérebro quanto para o córtex como um todo. . Esses genes são candidatos a terem sua atividade associada à função espelho característico do IFG.

O procedimento de comparação entre os grupos A e B foi realizado de modo automatizado e verificado manualmente a fim de selecionar quais genes ocorriam em quais listas (e quais genes coincidiam ou eram únicos). As duas listas obtidas não são mostradas, mas seu significado pode ser contemplado nos resultados obtidos com o software GenMAPP e MAPPFinder.

4.3 PERFIL DE ENRIQUECIMENTO GENÉTICO: RELAÇÃO ENTRE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS ÁREAS AVALIADAS E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS

Uma vez obtidas três listas significativas acerca da expressão genética (a) dos “genes corticais” da Área de Broca, (b) da Área de Broca e (c) do

Córtex como um todo, conduziu-se então a investigação acerca das funções biológicas exercidas por esses genes.

Cada lista foi analisada com software GenMAPP e MAPPFinder. Os genes presentes em cada uma delas foram então classificados como pertencentes aos processos biológicos dos quais fazem parte. Depois disso, eles foram agrupados e ordenados do processo mais presente na lista para o processo menos presente na lista analisada.

4.3.1 Processos Biológicos enriquecidos para os “genes corticais” do IFG

Para os genes diferencialmente expressos no IFG comparando com o cérebro como um todo, obtivemos uma lista preliminar da ocorrência dos 63 processos biológicos mais significativamente enriquecidos para a área em questão. (Tabela 4)

Tabela 4 | Processos biológicos correspondentes ao “genes corticais” da Área de Broca (IFG).

MAPP Name	Number Changed	Number On MAPP	Percent Present
cyclic-nucleotide-mediated signaling	27	101	26.7
potassium ion transport	41	156	26.3
transmission of nerve impulse	65	247	26.3
synaptic transmission	63	241	26.1
central nervous system development	24	100	24
second-messenger-mediated signaling	36	160	22.5
cation transport	29	152	19.1
ion transport	39	215	18.1
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	16	101	15.8
neurogenesis	37	237	15.6
inorganic anion transport	21	139	15.1
positive regulation of cell proliferation	17	113	15
cell-cell adhesion	21	141	14.9
enzyme linked receptor protein signaling pathway	20	147	13.6
di-, tri-valent inorganic cation transport	14	104	13.5
anion transport	22	166	13.3
muscle contraction	18	135	13.3
skeletal development	15	116	12.9
detection of abiotic stimulus	15	124	12.1
glycoprotein biosynthesis	13	110	11.8
muscle development	16	142	11.3
regulation of growth	11	100	11
positive regulation of apoptosis	14	130	10.8
positive regulation of programmed cell death	14	131	10.7
circulation	11	104	10.6
induction of apoptosis	13	123	10.6

induction of programmed cell death	13	123	10.6
protein amino acid glycosylation	11	105	10.5
cell division	12	116	10.3
cytokinesis	12	116	10.3
biopolymer glycosylation	11	108	10.2
glycoprotein metabolism	13	127	10.2
cell-cell signaling	27	274	9.9
regulation of cell proliferation	25	252	9.9
growth	14	149	9.4
cell proliferation	21	229	9.2
histogenesis	13	142	9.2
regulation of protein kinase activity	10	110	9.1
regulation of transferase activity	10	110	9.1
cell growth	11	123	8.9
endocytosis	11	124	8.9
regulation of cell size	11	123	8.9
locomotory behavior	16	181	8.8
M phase of mitotic cell cycle	11	126	8.7
protein amino acid dephosphorylation	11	126	8.7
small GTPase mediated signal transduction	21	241	8.7
cell motility	15	176	8.5
locomotion	15	176	8.5
dephosphorylation	11	132	8.3
cell cycle	14	173	8.1
cellular morphogenesis	13	160	8.1
secretory pathway	11	141	7.8
inflammatory response	15	196	7.7
M phase	12	164	7.3
apoptosis	18	255	7.1
response to chemical substance	15	212	7.1
lipid metabolism	10	149	6.7
carbohydrate metabolism	13	197	6.6
sensory perception of light	11	173	6.4
visual perception	11	173	6.4
regulation of cell cycle	11	187	5.9
intracellular protein transport	11	194	5.7
reproduction	14	244	5.7
lipid biosynthesis	10	200	5
ubiquitin cycle	12	251	4.8

Tabela 4 | Processos biológicos correspondentes ao “genes corticais” da Área de Broca (IFG). Avaliando os 1398 genes que se mostraram diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o cérebro, obtemos uma lista com 63 processos biológicos mais significativos nos quais eles se enquadram. A lista acima corresponde aos processos com pelo menos 20% de enriquecimento e pelo menos 10 genes participantes.

4.3.2 Processos Biológicos enriquecidos na Área de Broca (perfil IFG)

Para os genes diferencialmente expressos no IFG quando comparado com o córtex e com o cérebro (“subgrupo perfil”), obteve-se uma lista de 37 processos biológicos mais enriquecidos. (Tabela 5)

MAPP Name	Number Changed	Number On MAPP	Percent Present
muscle contraction	4	135	2.962963
histogenesis	3	142	2.112676
muscle development	3	142	2.112676
cation transport	3	152	1.973684
sensory perception of light	3	173	1.734104
visual perception	3	173	1.734104
regulation of cell size	2	123	1.626016
cell growth	2	123	1.626016
spermatogenesis	2	125	1.6
cell-cell signaling	4	274	1.459854
cell-cell adhesion	2	141	1.41844
growth	2	149	1.342282
potassium ion transport	2	156	1.282051
cellular morphogenesis	2	160	1.25
synaptic transmission	3	241	1.244813
transmission of nerve impulse	3	247	1.214575
locomotion	2	176	1.136364
cell motility	2	176	1.136364
locomotory behavior	2	181	1.104972
sexual reproduction	2	189	1.058201
regulation of growth	1	100	1
di-, tri-valent inorganic cation transport	1	104	0.9615384
circulation	1	104	0.9615384
positive regulation of cell proliferation	1	113	0.8849558
reproduction	2	244	0.8196721
cell surface receptor linked signal transduction	1	123	0.8130081
detection of abiotic stimulus	1	124	0.8064516
endocytosis	1	124	0.8064516
protein amino acid dephosphorylation	1	126	0.7936508
dephosphorylation	1	132	0.7575758
secretory pathway	1	141	0.7092199
intracellular protein transport	1	194	0.5154639
ion transport	1	215	0.4651163
response to endogenous stimulus	1	219	0.456621
protein folding	1	222	0.4504505
small GTPase mediated signal transduction	1	241	0.4149378
regulation of cell proliferation	1	252	0.3968254
apoptosis	1	255	0.3921569

Tabela 5| Processos biológicos correspondentes ao “subgrupo perfil”. Avaliando os 87 genes diferencialmente expressos tanto para o córtex quanto para o cérebro, obtemos uma lista com 37 processos biológicos nos quais eles se enquadram. A lista dos processos acima corresponde a todos os processos enriquecidos para a Área de Broca quando avaliamos os genes do “subgrupo perfil” composto anteriormente.

4.3.3 Processos Biológicos enriquecidos no córtex como um todo (grupo C)

Para os genes diferencialmente expressos no córtex quando comparado com o cérebro, obteve-se uma lista de processos biológicos mais enriquecidos. (Tabela 6)

Tabela 6 | Processos biológicos relacionados à atividade do córtex cerebral (grupo C).

MAPP Name	Number Changed	Number On MAPP	Percent Present
synaptic transmission	56	241	23.2
potassium ion transport	36	156	23.1
transmission of nerve impulse	57	247	23.1
cyclic-nucleotide-mediated signaling	21	101	20.8
central nervous system development	19	100	19
second-messenger-mediated signaling	29	160	18.1
cation transport	27	152	17.8
ion transport	31	215	14.4
neurogenesis	28	237	11.8
inorganic anion transport	16	139	11.5
cell-cell adhesion	16	141	11.3
di-, tri-valent inorganic cation transport	11	104	10.6
positive regulation of cell proliferation	12	113	10.6
muscle contraction	14	135	10.4
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	10	101	9.9
detection of abiotic stimulus	12	124	9.7
anion transport	16	166	9.6
enzyme linked receptor protein signaling pathway	14	147	9.5
protein amino acid dephosphorylation	12	126	9.5
dephosphorylation	12	132	9.1
skeletal development	10	116	8.6
muscle development	12	142	8.5
regulation of cell proliferation	18	252	7.1
small GTPase mediated signal transduction	17	241	7.1
cell-cell signaling	19	274	6.9
cell proliferation	14	229	6.1
locomotory behavior	10	181	5.5

Tabela 6 | Processos biológicos relacionados à atividade do córtex cerebral (grupo C).

Avaliando os 924 genes diferencialmente expressos para o córtex quando comparado com o cérebro, obtemos uma lista com 27 processos biológicos nos quais eles se enquadram. Os processos mostrados correspondem aqueles que possuem pelo menos 20% de enriquecimento ou pelo menos 10 genes participantes.

4.4 COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DO CÓRTEX COM OS PROCÊSOS BIOLÓGICOS DOS GENES CORTICAIS DA ÁREA DE BROCA

As listas relativas aos tipos de processos biológicos enriquecidos para as áreas avaliadas também foram comparadas entre si. A comparação foi feita de maneira automatizada e verificada manualmente.

4.5.1 Lista de processos com *fold-change* > 1.5

Cruzando informações da lista de enriquecimento dos genes corticais do IFG com aquelas da lista de enriquecimento de genes corticais totais pudemos observar que todos os processos biológicos enriquecidos no córtex estão também enriquecidos na área de Broca, ou seja, não há nenhum processo cortical observado que não esteja enriquecido na área de Broca.

Por outro lado, pesquisando processos que poderiam estar presentes na área de Broca, mas ausentes na lista de enriquecimento do córtex como um todo, verificamos que existem apenas dois processos biológicos adicionais, que são o "*nucleosome assembly*" e "*ubiquitin-dependent protein catabolism*". Sem contar com esses dois processos adicionais, todos os processos dos genes corticais do IFG estão também presentes no córtex.

4.5.2 Lista de processos com pelo menos 20% de enriquecimento e pelo menos 10 genes diferenciais presentes em cada categoria

Quando os processos mais significativos são levados em conta e contrastamos os genes corticais do IFG com aqueles do córtex como um todo, observa-se que todos os processos bastante representados no córtex também estão representados para os genes corticais do IFG. Assim, não há processo altamente enriquecido no córtex que também não esteja enriquecido na área de Broca.

Em contrapartida, quando buscamos os processos biológicos presentes somente para os genes corticais do IFG mais enriquecidos, e não para os genes corticais totais podemos apontar uma diferença de 24 processos biológicos os quais estão presentes para o IFG e ausentes para o córtex. Isso não significa, porém que esses 24 processos não sejam corticais, mas que eles estão diferenciados no IFG (Tabela 7).

Tabela 7 | Processos biológicos altamente enriquecidos apenas para a lista de genes corticais do IFG.

MAPP Name	Number Changed	Number On MAPP	Percent Present
glycoprotein biosynthesis	13	110	11.8
regulation of growth	11	100	11
positive regulation of apoptosis	14	130	10.8
positive regulation of programmed cell death	14	131	10.7
circulation	11	104	10.6
induction of apoptosis	13	123	10.6
induction of programmed cell death	13	123	10.6
protein amino acid glycosylation	11	105	10.5
cell division	12	116	10.3
cytokinesis	12	116	10.3
biopolymer glycosylation	11	108	10.2
glycoprotein metabolism	13	127	10.2
growth	14	149	9.4
histogenesis	13	142	9.2
regulation of protein kinase activity	10	110	9.1
regulation of transferase activity	10	110	9.1
cell growth	11	123	8.9
endocytosis	11	124	8.9
regulation of cell size	11	123	8.9
M phase of mitotic cell cycle	11	126	8.7
cell motility	15	176	8.5
locomotion	15	176	8.5
cell cycle	14	173	8.1
cellular morphogenesis	13	160	8.1
secretory pathway	11	141	7.8
inflammatory response	15	196	7.7
M phase	12	164	7.3
apoptosis	18	255	7.1
response to chemical substance	15	212	7.1
lipid metabolism	10	149	6.7
carbohydrate metabolism	13	197	6.6
sensory perception of light	11	173	6.4
visual perception	11	173	6.4
regulation of cell cycle	11	187	5.9
intracellular protein transport	11	194	5.7
reproduction	14	244	5.7
lipid biosynthesis	10	200	5
ubiquitin cycle	12	251	4.8

Tabela 7 | Processos biológicos altamente enriquecidos apenas para a lista de genes corticais do IFG. A maioria dos processos biológicos enriquecidos apenas para a lista de genes corticais do IFG interessantemente apontam para modificações do ciclo celular. Entre essas modificações, as atividades ligadas a regulação do crescimento, da apoptose, divisão celular possuem o maior grau de representação.

5. DISCUSSÃO

O estudo que se procedeu compara várias listas de expressão gênica diferencial. Foi necessário categorizar os genes em grupos diferentes e separá-los em listas distintas a fim de obter um refinamento maior nos resultados a partir da seleção dos contrastes adequados para isolar, na medida do possível, genes cuja expressão está potencialmente associada à atividade de neurônio-espelho. Caso não fossem realizadas tais comparações as listas de genes diferencialmente expressos não seriam adequadamente informativas.

Dessa forma, foi possível chegar ao final das análises com uma lista mais aproximada do perfil de expressão para a área de Broca em mãos, que foi estabelecida como área de interesse inicial.

Temos, assim, dois conjuntos de dados que nos informam de maneiras diferentes aquilo que estaria acontecendo no Giro Frontal Inferior (área 44).

O primeiro conjunto de dados demonstra *quais* são os genes diferencialmente expressos na Área de Broca, sejam eles mais relacionados ao perfil do córtex onde encontramos esta área, sejam eles genes que trabalham de maneira diferencial até mesmo dentro do próprio córtex.

O segundo conjunto de dados demonstra, então, *o que* esses genes da Área de Broca fazem, ou seja, em quais atividades biológicas eles participam. Estariam estes genes participando de rotas metabólicas comuns ao córtex onde se encontram? Ou estariam eles dentro de rotas metabólicas não usuais para o córtex que os abriga? Os processos biológicos do córtex (que contém o giro frontal inferior) teriam muitas diferenças em relação aos processos do resto do cérebro?

Desses dois conjuntos de resultados, obtivemos listas preliminares que, no primeiro caso, compõe dados que podem subsequentemente serem empregados em novas pesquisas, servindo como plataforma inicial para buscas e comparações com outros organismos, por exemplo.

No segundo caso, obtivemos um corpo de informações mais abrangente. Foi detectado um conjunto de 24 processos biológicos ocorrendo diferencialmente na Área de Broca. Podemos considerar este resultado como

preliminar, porém capaz de direcionar estudos subsequentes. Um estudo mais profundo precisa ser procedido para decidir se esses processos detectados fazem realmente parte de um perfil único de expressão genética da Área de Broca ou se existem áreas com os mesmos processos com os mesmos níveis de enriquecimento genético.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho é um esforço preliminar para obter um conjunto de dados sobre áreas anatômica e funcionalmente delimitadas. Os resultados obtidos com esta pesquisa pretendem funcionar como um ponto de partida para outros estudos que venham a incorporar informações sobre outros organismos, estejam elas no nível puramente genético (como uma exploração das listas de genes diferencialmente expressos a fim de estudar genes homólogos ou seus padrões de seleção), ou estejam elas no nível funcional (como uma exploração dos perfis de processos biológicos em outros animais).

Consideram-se os processos biológicos como níveis altos para contemplar o funcionamento de um organismo. De outro lado, a comparação genética compõe níveis baixos, muito específicos, de estudos. Este trabalho, portanto trata, de maneira geral, de uma frente de estudo que possa indicar tanto caminhos para comparações de níveis mais altos como para níveis mais baixos, seja para organismos de espécies diferentes ou dentro do estudo do próprio cérebro humano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dalgalarondo,P. Evolução do Cérebro: Sistema Nervoso, Psicologia e Psicopatologia sob a Perspectiva Evolucionista. Artmed, 2011. ISBN: 9788536324395
- [2] Gallese V1, Fadiga L, Fogassi L, Rizzolatti G. Action recognition in the premotor cortex. *Brain*. 1996 Apr;119 (Pt 2):593-609.
- [3] Gallese V. The roots of empathy: the shared manifold hypothesis and the neural basis of intersubjectivity. *Psychopathology*. 2003 Jul-Aug;36(4):171-80.
- [4] Oztop E1, Kawato M, Arbib MA. Mirror neurons: functions, mechanisms and models.*Neurosci Lett*. 2013 Apr 12;540:43-55. doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.005. Epub 2012 Oct 11.
- [5] Rizzolatti G1, Fabbri-Destro M, Cattaneo L. Mirror neurons and their clinical relevance.*Nat Clin Pract Neurol*. 2009 Jan;5(1):24-34. doi: 10.1038/ncpneuro0990.
- [6] Charvet CJ1, Striedter GF, Finlay BL. Evo-devo and brain scaling: candidate developmental mechanisms for variation and constancy in vertebrate brain evolution. *Brain Behav Evol*. 2011;78(3):248-57. doi: 10.1159/000329851. Epub 2011 Aug 23.
- [7] De Waal, F. *The Age of Empathy*. Tradução Rejane Rubino. Companhia das Letras, 2010. ISBN 9788535917635
- [8] Buccino G1, Binkofski F, Fink GR, Fadiga L, Fogassi L, Gallese V, Seitz RJ, Zilles K, Rizzolatti G, Freund HJ. Action observation activates premotor and parietal areas in a somatotopic manner: an fMRI study. *Eur J Neurosci*. 2001 Jan;13(2):400-4.
- [9] Binkofski F1, Buccino G. The role of ventral premotor cortex in action execution and action understanding.*J Physiol Paris*. 2006 Jun;99(4-6):396-405. Epub 2006 May 24.
- [10] Binkofski F1, Buccino G. Motor functions of the Broca's region. *Brain Lang*. 2004 May;89(2):362-9.
- [11] Winden KD1, Oldham MC, Mirnics K, Ebert PJ, Swan CH, Levitt P, Rubenstein JL, Horvath S, Geschwind DH. The organization of the

transcriptional network in specific neuronal classes. *Mol Syst Biol.* 2009;5:291. doi: 10.1038/msb.2009.46. Epub 2009 Jul 28.

[12] Khaitovich et al. Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. *Genome Res.* 2004 Aug;14(8):1462-73.

[13] Preuss TM1, Cáceres M, Oldham MC, Geschwind DH. Human brain evolution: insights from microarranjos. *Nat Rev Genet.* 2004 Nov;5(11):850-60.

[14] Uddin M1, Wildman DE, Liu G, Xu W, Johnson RM, Hof PR, Kapatos G, Grossman LI, Goodman M. Sister grouping of chimpanzees and humans as revealed by genome-wide phylogenetic analysis of brain gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2957-62. Epub 2004 Feb 19.

[15] Virginia Gewin. A Golden Age of Brain Exploration *PLoS Biol.* Jan 2005; 3(1): e24. Published online Jan 18, 2005. doi:10.1371/journal.pbio.0030024 PMID: PMC544547

[16] Hawrylycz MJ, et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature.* 2012 Sep 20;489(7416):391-9. doi: 10.1038/nature11405.

[17] Curtis RK1, Oresic M, Vidal-Puig A. Pathways to the analysis of microarranjo data. *Trends Biotechnol.* 2005 Aug;23(8):429-35.

[18] Doniger SW1, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarranjo data. *Genome Biol.* 2003;4(1):R7. Epub 2003 Jan 6.

[19] Smyth, G. K. (2005). *Limma: linear models for microarranjo data.* In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, pages 397-420.