



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

PATRICK FARIAS LOPES

**INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES *G2019S*, *I2012T* E *I2020T* NO
ÉXON 41 DO GENE *LRRK2* EM PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON**

BELÉM
2009

PATRICK FARIAS LOPES

**INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES *G2019S*, *I2012T* E *I2020T* NO
ÉXON 41 DO GENE *LRRK2* EM PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa

BELÉM
2009

PATRICK FARIAS LOPES

**INVESTIGAÇÃO DAS MUTAÇÕES *G2019S*, *I2012T* E *I2020T* NO
ÉXON 41 DO GENE *LRRK2* EM PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa: Belém (PA), _____ de _____ de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
(ICB – UFPA)

Prof. Msc. Erik Artur Cortinhas Alves
(CCS – UEPA)

Prof. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos – suplente
(ICB – UFPA)

Aos meus amigos

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus

À meus pais que me ensinaram grande parte dos valores morais que me guiam hoje.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva que me orientou, me acolheu na grande família do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, que foi mestre dentro e fora de sala, e além de tudo foi um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa que me deu a oportunidade inicial, me apresentou o mundo da neurociência permitindo o meu ingresso no Laboratório de Neuropatologia Experimental, dividiu o seu conhecimento como mestre e bons momentos como grande amigo que considero ser.

Ao Prof. Msc. Nelson Monte de Carvalho Filho que me deu a base de tudo o que sei hoje na biologia molecular e sobre a genética da Doença de Parkinson, que dividiu seus conhecimentos com habilidades e sem medir esforços.

Ao Prof. Msc. Erik Arthur Cortinha Alves pelo indispensável apoio prestado à realização deste trabalho.

Ao mestrando Carlos Eduardo Amaral pelo também indispensável apoio prestado à realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Neuropatologia Experimental.

A todos os amigos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo.

Aos colegas de turma, em especial: Alessandra Gorayeb, André Ricardo, Carlos Eduardo, Daniele Santana, Ian Levy, Igor Andrade, Juliana Albuquerque, Layanna Freitas, Livia do Vale, Marcus Oliveira, Nilton Barreto e Raissa Andrade.

Aos amigos do meio extra-acadêmico, que de certa forma contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

À minha namorada Miki Taketomi Saito, pelo total apoio prestado, compreensão e cumplicidade nas minhas tarefas, e acima de tudo pelo carinho e companheirismo.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 01. Neuropatologia da DP	8
Figura 02. Modelo de mecanismos do parkinsonismo.....	12
Figura 03. Estrutura da proteína LRRK2	18
Figura 04. Início dos sintomas da DP	27
Figura 05. História familiar	28
Figura 06. Análise por SSCP do éxon 41 do gene <i>LRRK2</i>	29
Figura 07. Sequenciamento do éxon 41 do gene <i>LRRK2</i>	20
Quadro 01. Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática.....	9
Quadro 02. Genes relacionados à DP e padrões de herança	16
Quadro 03. Condições da PCR para o éxon 41 do gene <i>LRRK2</i>	25
Tabela 01. Pacientes portadores da <i>G2019S</i>	31

ABREVIATURAS

AD – autossômico dominante

AR – autossômico recessivo

CL – corpos de Lewy

COMT – catecol-o-metil transferase

DJ-1 – oncogene que codifica a proteína DJ-1

DP – Doença de Parkinson

EDTA - ácido-etileno-diamino-tetra-acético

EROS – espécies reativas de oxigênio

G – Glicina (aminoácido)

I – Isoleucina (aminoácido)

iMAO – inibidores de monoamino oxidases

Irrk2 – leucine rich repeated kinase (cinase rica em repetições de leucina)

MAO – monoamino oxidase

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropirinida

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PINK1 – PTEN-induced putative kinase 1

PP – parkinsonismo primário

ROC – *Ras of complex protein*

S – Serina (aminoácido)

SNCA – gene da α -sinucleína

SNpc – substância negra *pars compacta*

SSCP – single strand chain polymorphism (polimorfismos conformacionais de cadeia simples)

SUP – Sistema Ubiquitina-Proteassoma

T – Treonina (aminoácido)

UCHL1 – Ubiquitina carboxi terminal hidrolase L1

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa motora mais comum que se caracteriza pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos e possui uma prevalência de 1 a 2% em indivíduos com mais de 65 anos de idade. A etiologia da DP é pouco conhecida, sendo considerada, na maioria dos casos, idiopática. Entretanto, existem evidências que sugerem que tanto fatores ambientais como fatores genéticos desempenham uma função no desenvolvimento da DP. Mutações pontuais no gene *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* são reconhecidas como uma das causas mais comuns da DP e segregam de forma dominante, sendo que a frequência destas alterações varia muito de acordo com a origem geográfica da população estudada. O gene LRRK2 possui 51 éxons, sendo o éxon 41 apresenta a mutação G2019S que mais freqüente desse gene. Tem-se relatado a frequência de mutações no gene para valores em torno 5-6% para DP familiar e 1-2% para DP esporádica. Além da mutação G2019S, o éxon 41 apresenta as mutações I2012T e a I2020T, que também estão associados a quadro de DP. O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença da mutação G2019S. A amostra estudada foi composta de 55 indivíduos diagnosticados com DP. A partir das amostras de sangue dos pacientes com DP foi obtido DNA nuclear, para amplificação, por meio da PCR, do éxon 41. Os amplicons foram triados pela técnica de SSCP. Dos 55 pacientes 3 apresentaram alterações no SSCP e foram analisadas por meio do sequenciamento direto do DNA. Os 3 pacientes apresentaram a mutação G2019S em heterozigose (frequência alélica 2,7%). O quadro clínico desses indivíduos não diferiu do que já está descrito na literatura, assim como a resposta satisfatória ao tratamento com agonistas dopaminérgicos. Não se detectou nenhum indivíduo como sendo portador da I2012T ou da I2020T.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, LRRK2, exon 41, G2019S

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative motor disorder, and it's characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons and has a prevalence of 1 to 2% in individuals over 65 years old. The etiology of PD is poorly understood, considered, in most cases, idiopathic. However, there is an evidence to suggest that both environmental factors and genetic factors play a role in the development of PD. Point mutations in the gene Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) are recognized as one of the most common causes of PD and segregate in dominant fashion, and the frequency of these changes varies according to geographic origin of the population. The LRRK2 gene has 51 exons, and exon 41 gives the G2019S mutation most often found in the gene. It has been reported the frequency of mutations in the gene for values around 5-6% for DP familial and 1-2% for sporadic PD. In addition to the G2019S mutation, the exon 41 mutations has I2012T and I2020T, which are also associated with the framework of DP. This study aimed to investigate the presence of the G2019S mutation. The sample consisted of 55 individuals diagnosed with PD. From the blood samples of patients with PD was obtained nuclear DNA for amplification by PCR of exon 41. The amplicons were screened by SSCP technique. Of the 55 patients 3 had changes in the SSCP and were analyzed by direct sequencing of DNA. The 3 patients had the G2019S mutation in heterozygous (allelic frequency 2.7%). The clinical picture of these individuals did not differ from what is already described in literature as well as a satisfactory response to dopamine agonists treatment. There was no any individual as a carrier of I2012T or I2020T.

Keywords: Parkinson's disease, LRRK2, exon 41, G2019S

SUMÁRIO

Epígrafe	i
Agradecimentos	ii
Lista de figuras, quadros e tabelas	iii
Lista de abreviaturas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A DOENÇA DE PARKINSON	1
1.1.1. Epidemiologia	3
1.1.2. Medidas terapêuticas	5
1.1.3. Aspectos clínicos e fisiopatológicos	6
1.1.4. Mecanismos do parkinsonismo	10
1.1.5. Fatores ambientais na doença de Parkinson	12
1.1.6. Aspectos genéticos e moleculares	14
1.1.7. O gene LRRK2 e a doença de Parkinson	17
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	22
3.2. ASPECTOS ÉTICOS	22
3.3. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	23
3.4. PROTOCOLOS EMPREGADOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO EXON 41 DO GENE <i>LRRK2</i>	23
3.4.1. Extração de DNA	23
3.4.2. Amplificação do éxon 41 do gene <i>LRRK2</i>	25
3.4.3. Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)	25
3.4.4. Análise de sequenciamento	26
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26

4. RESULTADOS	27
4.1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES COM DP	27
4.2. ANALISE MOLECULAR	29
4.3. PERFIL DOS PACIENTES COM DP APRESENTANDO A MUTAÇÃO G2019S	31
5. DISCUSSÃO	33
5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXO I	44
ANEXO II	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) constitui a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum no mundo, sendo superada apenas pela doença de Alzheimer (Dawson & Dawson, 2002; Van Den Eeden *et al.*, 2003; Vila & Przedborski, 2004). A DP tem uma prevalência de 1-2% sobre a população mundial com mais de 55 anos de idade (Di Fonzo *et al.* 2005; Kachergus *et al.*, 2005). A sua primeira descrição foi feita por James Parkinson em 1817, através de seu famoso trabalho intitulado “*An essay on the shaking palsy*” (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004). No seu trabalho, James Parkinson descreveu uma nova condição, que ele denominou de *paralysis agitans*, e a caracterizou originalmente como:

“Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forward, and to pass from a walking to a running pace the senses and intellect being uninjured.” (James Parkinson, 1817).

[“Movimento tremulante involuntário, com redução da força muscular, em partes que não estão em ação e mesmo quando com suporte, com propensão a inclinar o tronco pra frente, e passar de um compasso de marcha para corrida, sem comprometimento dos sentidos e do intelecto.”]

De acordo com a literatura, os principais sintomas clínicos da DP são: rigidez muscular (resistência aumentada a movimentos passivos), tremor de repouso, bradicinesia (lentidão nos movimentos) e instabilidade postural (déficit de coordenação e equilíbrio) (Samii *et al.*, 2004).

Além dos déficits motores, há certos aspectos celulares como a progressiva perda de neurônios dopaminérgicos principalmente da substância negra mesencefálica na parte compacta (SNpc), com a formação de inclusões intracitoplasmáticas nos neurônios restantes, inclusões essas conhecidas como corpos de Lewy (Samii *et al.*, 2004; Di Fonzo *et al.* 2005). Essa perda neuronal é notada em outras regiões do cérebro (Tolosa *et al.*, 2006). Logo, é difícil o diagnóstico dessa doença através de suas características patológicas, já que para se obter um diagnóstico confiável seria necessário a realização de exames

extremamente invasivos e impossíveis de serem feitos sem causar nenhum tipo de dano ao indivíduo por ter que atingir regiões de difícil acesso no cérebro, o que só se faz durante uma autópsia.

Além dos denominados sintomas cardinais da DP, outras manifestações presentes ao longo da evolução do quadro clínico, em maior ou menor grau, incluem: transtornos neuropsiquiátricos (depressão e demência), disfunções autonômicas (hipotensão postural, alterações esfinterianas, impotência) e sintomas sensitivos, como dor (Miyasaki, *et al.*, 2006). Esses sintomas são dados como menos importantes, mas, muitas vezes, contribuem de forma significativa para um comprometimento da qualidade de vida do indivíduo, assim como chegam a ser consideravelmente incapacitantes.

Embora a etiologia da DP ainda não tenha sido esclarecida, estudos apontam para uma etiologia multifatorial que leva à degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (Samii *et al.*, 2004), entre os quais se encontram susceptibilidade genética, levando a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e processamento inadequado de proteínas, e a exposição a fatores ambientais (Shimohama *et al.*, 2003; Fukae *et al.*, 2007). Logo, os recentes avanços no campo da neurologia trouxeram novos conhecimentos acerca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP.

Dessa forma, a DP pode se apresentar em duas formas: a DP esporádica, que se refere estatisticamente a grande maioria dos casos que são os de origem ou causa desconhecidas; e a DP familiar (15-20% dos casos com pacientes e seus parentes de 1º grau), que se vale de características transmitidas geneticamente em padrões dominantes ou recessivos (Samii *et al.*, 2004).

Nesse contexto de descoberta de novas informações acerca da DP o campo da genética tem papel fundamental e de destaque. Mutações genéticas relacionadas à DP em genes como *Parkina*, *LRRK2*, *DJ-1* e *PINK1*, surgem como termos correntes na descrição de casos de DP, especialmente em indivíduos com início precoce da doença e história familiar positiva.

1.1.1. Epidemiologia

A DP atinge todos os grupos étnicos, classes sócio-econômicas e sexos e com uma prevalência estimada de 150 a 200 indivíduos afetados a cada 100.000 habitantes, representando a segunda doença neurológica mais comum (Barbosa *et al.*, 1997).

Em países desenvolvidos, como na América do Norte, a DP prevalece em 0,3% da população geral e em aproximadamente 1% da população com mais de 60 anos de idade, acometendo mais de um milhão de indivíduos (Samii *et al.*, 2004). Sendo a DP uma desordem neurodegenerativa relacionada à idade (Kachergus *et al.*, 2005) a sua incidência aumenta consideravelmente com o avanço da idade do indivíduo, onde 20 em cada 100.000 habitantes, na idade de 55 anos, são acometidos com a doença e 120 em cada 100.000 habitantes na idade de 70 anos são diagnosticados com a enfermidade.

O Brasil é uma nação populosa e bastante heterogênea no que diz respeito à formação da sua população o que se indicou através de estudos de marcadores de ancestralidade, onde de diversos cruzamentos interétnicos entre Europeus, povos Ameríndios e Africanos – lembrando que da parte dos povos Europeus os que mais contribuíram para a formação da nossa população foram os Portugueses – resultaram na população mais miscigenada do planeta. De acordo com Pimentel e cols., (2008) espera-se que o número de indivíduos brasileiros portadores de DP dobre nos próximos 25 anos.

Está claramente estabelecido que mutações no gene *LRRK2* são apontadas como causadoras da DP em diversas áreas geográficas e grupos étnicos, e que a sua prevalência em casos de DP familiar e esporádico variam muito ao redor do mundo. Nesse sentido, dados precisos sobre a frequência das mutações no gene em populações da América Latina ainda são muito escassos. No Brasil, a frequência definitiva da prevalência dessas mutações na população permanece não esclarecida até agora (Pimentel *et al.*, 2008).

Na população brasileira estima-se atualmente que a DP tenha uma prevalência aproximada de 3,3% na população acima de 64 anos de idade segundo dados de estudos nacionais. Nesse estudo se observou um significativo aumento no

número de diagnósticos da DP com o avanço da idade (Barbosa *et al.*, 2006), dados esses que corroboram com a literatura.

Por razões desconhecidas, o homem tem maior predisposição a desenvolver o distúrbio (Ropper & Brown., 2005). Estudos diferem quanto ao acometimento preferencial por gênero, mas alguns mostram que realmente há o predomínio da doença sobre o sexo masculino, em uma taxa de 1,5:1 até 2:1 indivíduos afetados do sexo masculino em relação ao sexo feminino, respectivamente (Van Den Eeden *at al.*, 2003). A razão para essa diferença no acometimento quanto ao gênero não está esclarecida, apesar de se sugerir um possível efeito neuroprotetor dos estrogênios sobre as células e vias celulares envolvidas (DeLau & Breteler, 2006).

Além dos indivíduos que venham a desenvolver a doença em períodos tardios da vida existem aqueles que desenvolvem o chamado parkinsonismo precoce, que nesse caso comumente é do tipo DP familiar com componente genético. Nesses indivíduos com DP de início precoce os sintomas aparecem por volta de 21 a 30 anos de idade, compreendendo cerca de 0,5 a 1% dos casos de DP diagnosticados, enquanto que os casos de início juvenil podem ser detectados em idade abaixo de 20 anos de idade (Beal, 2001).

Ademais, mesmo com a existência de grupos de pesquisadores que afirmam que a DP seja de origem genética, a maioria dos estudos mostra que quase 95% dos casos detectados são referentes à DP idiopática (Dauer & Przedborski, 2003).

Com a relativa melhora na qualidade de vida, hoje observa-se um constante processo de envelhecimento da população dos países desenvolvidos e dos em desenvolvimento, e assim será possível verificar mais claramente que daqui para um futuro próximo as estatísticas sofrerão mudanças significativas, onde, possivelmente o número de indivíduos afetados poderá até triplicar nos próximos 50 anos (Jankovic, 2005).

1.1.2. Medidas terapêuticas

São vultosos os investimentos feitos em pesquisa sobre a DP, o que proporcionou um considerável avanço no desenvolvimento de medidas terapêuticas para DP. Porém, nenhuma dessas conseguiu promover a neuroproteção (prevenção de morte celular) e assim diminuir a velocidade com que ocorre a progressiva perda de neurônios dopaminérgicos, que é o principal efeito desencadeador da DP.

Dos tratamentos disponíveis todos são direcionados a amenização dos efeitos sintomáticos da desordem e esses estão divididos em quatro categorias: (1) anticolinérgicos, (2) agonistas de receptores dopaminérgicos, (3) inibidores da monoamino-oxidase (iMAO) e (4) L-diidroxifenilalanina (L-DOPA) (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004; Hsin, 2007).

Tentativas de neuroproteção e neuroreestruturação (recuperação de neurônios “doentes”) estão sendo muito debatidas à medida que se avançam os conhecimentos acerca da DP (Dawson & Dawson, 2002), mas não há no momento uma estratégia firmada para se interferir com a história natural da doença e impedir a sua progressão.

Foi nesse cenário que surgiu a terapia com o uso da levodopa (L-DOPA) como meio de terapia sintomática eficaz disponível há quase meio século, permitindo controle de grande parte dos sintomas, especialmente no início da doença. Alguns estudos revelam que a estimativa de indivíduos que respondam de forma positiva à terapia com L-DOPA seja de cerca de 94 a 100% dos pacientes (Gelb *et al.*, 1999). Sendo assim, uso da L-DOPA, até então, é a medida terapêutica mais bem sucedida que se tem conhecimento.

O principal obstáculo no desenvolvimento de drogas neuroprotetoras é o desconhecimento dos eventos moleculares específicos que venham a provocar a degeneração neuronal na DP. Nos últimos 11 anos a maioria das hipóteses sobre a etiologia e patogênese da DP aceitas no campo da neurociência/neurologia derivou de estudos *postmortem* ou de modelos *in vivo*, sendo o mais notável de todos o modelo animal baseado na intoxicação por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropirínida (MPTP), que induz, seletivamente, a neurodegeneração dopaminérgica (Dauer & Przedborski, 2003).

Evidências, baseadas na literatura, de que a neuroinflamação é um importante contribuinte para o processo crônico degenerativo, o que foi demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro* de DP, e talvez para a própria DP idiopática, inúmeros estudos experimentais têm apostado na inibição da inflamação como uma estratégia terapêutica promissora, resultando em atenuação da degeneração dopaminérgica nigroestriatal em modelos de DP (Gao *et al.*, 2003). No entanto, o uso de drogas antiinflamatórias para prevenir a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP ainda não foi formalmente testado em pacientes.

A inovadora técnica de transplante de células tronco derivadas de tecido cadavérico fetal se baseia na tentativa de repovoamento do tecido nervoso que sofreu degeneração, mas este método revolucionário para o tratamento da DP ainda está em fase inicial de estudo. Um estudo em que se utilizou transplante de tecido de mesencéfalo fetal observou-se um nível satisfatório de sobrevivência das células transplantadas, com melhora dos sinais e sintomas apresentados por pacientes com DP grave, em especial os mais jovens (Freed *et al.*, 2001). Especula-se poder fazer uso de células tronco da medula óssea que poderiam se diferenciar tanto em células produtoras de dopamina como em células que liberam certos fatores de crescimento e de atração, podendo promover migração de células para o local afetado na DP (Samii *et al.*, 2004).

1.1.3. Aspectos clínicos e fisiopatológicos

A DP é uma desordem progressiva e é clinicamente caracterizada pelo chamado tremor de repouso, além de apresentar bradicinesia e rigidez muscular levando a instabilidade postural. Além desses sintomas o indivíduo ainda tende a apresentar outros sintomas como distúrbios do equilíbrio e da marcha, micrografia, perda da expressividade facial (face de máscara), hipocinesia e dificuldade na deglutição (*drooling*) (Blum *et al.*, 2001; Dauer & Przedborski, 2003; Mata *et al.*, 2005). Ainda como característica da DP é típico que o indivíduo desenvolva esses sintomas de forma assimétrica, e também que este seja responsivo positivamente à terapia de reposição de dopamina com L-DOPA (Mata *et al.*, 2005).

Dentre os achados patológicos estão inclusos a disfunção e morte dos neurônios dopaminérgicos, principalmente, da substância negra parte compacta (SNpc) e estriado (degeneração da via nigro-estriatal), e a formação de inclusões intracitoplasmáticas proteinadas chamadas de corpos de Lewy (CL), nas células remanescentes (Mata *et al.*, 2005). A disfunção/morte dos neurônios dopaminérgicos leva a uma profunda depleção do neurotransmissor dopamina no estriado, um componente central dos gânglios da base que é responsável pela iniciação e coordenação dos movimentos (Farrer, 2006).

Os corpos celulares dos neurônios nigroestriatais estão na SNpc e se projetam primariamente para o putamen. A perda desses neurônios, que contêm consideráveis quantidades de neuromelanina na sua constituição produz o achado neuropatológico clássico da DP, a despigmentação da SNpc (Figura 01) (Dauer & Przedborski, 2003).

Os CL são inclusões esféricas que se formam no citoplasma das células, que consistem em uma densa camada granular cercada por um halo que se propaga radialmente em filamentos (Flint, 2001). Os CL presentes na SNpc e no *locus coeruleus* não são marcadores próprios da DP, porém, se apresentam como marcadores anatomo-patológicos para tal desordem (Blum *et al.*, 2001). No interior dos CL são encontradas proteínas alfa-sinucleína e outras quando acumuladas contribuem de forma significativa para o processo degenerativo dos neurônios dopaminérgicos encefálicos (Meneses & Teive, 2003).

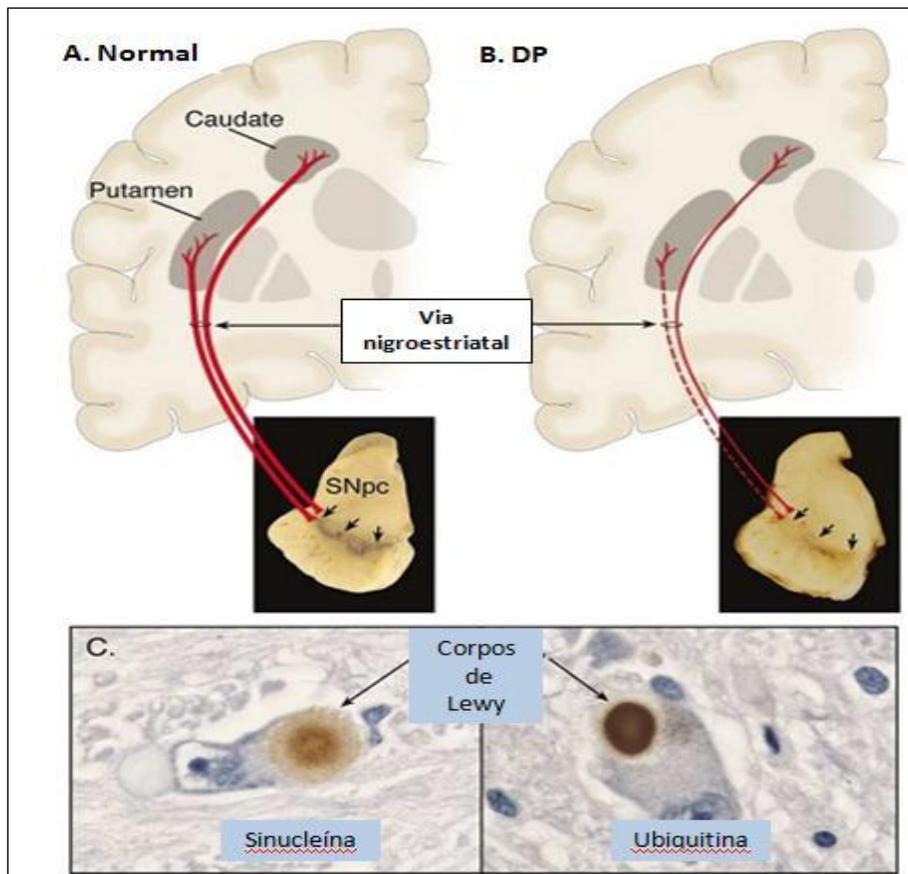


Figura 01: Neuropatologia da DP. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal (em vermelho). Os neurônios dopaminérgicos que compõem essa via possuem seus corpos celulares na SNpc (setas) e projetam (linhas vermelhas sólidas) para o estriado (núcleos caudado e putamen), com a fotografia de A demonstrando a pigmentação normal da SNpc resultado da neuromelanina contida nos neurônios dopaminérgicos. (B) Representação esquemática da via nigroestriatal afetada pela DP: a degeneração ocorrida (setas) é resultado da progressiva perda de neurônios dopaminérgicos que projetam para o putamen (linha tracejada), com essa perda sendo observada mais acentuada do que nos neurônios que projetam para o caudado (linha vermelha fina). Há também demonstração da despigmentação da SNpc devido a degeneração das células neuronais dopaminérgicas. (C) Marcação através de imuno-histoquímica para CL em neurônios dopaminérgicos da SNpc confirma que os mesmos apresentam agregados de alfa-sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

Por ser uma doença de causa ainda não bem definida, a DP tem sua detecção precoce dificultada e que, por sinal, é raramente feita. O diagnóstico clínico é feito através de sinais e sintomas que só se tornam detectáveis somente após a depleção de mais de 70% da dopamina (DA) estriatal e quando a perda neuronal dopaminérgica da SNpc já atingiu valores entorno de 55-60%, levando aos sintomas motores deficitários mais grosseiros (Deumens *et al.*, 2002; Dauer & Przedborski, 2003).

Na clínica, por não haver testes mais práticos para a detecção da doença, os exames têm se tornado mais rigorosos, com graduações na sua certeza, com a inclusão de diversas escalas, como por exemplo: clinicamente possível, clinicamente provável e clinicamente definitivo. Assim o diagnóstico só será considerado como clinicamente definitivo após a avaliação da resposta ao tratamento com drogas repositoras de dopamina (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

É interessante notar que o tremor da DP ocorre enquanto os músculos estão relaxados, mas que esse decresce durante os movimentos voluntários, então o tremor tipicamente não provoca grandes prejuízos nas atividades da vida cotidiana do indivíduo acometido pela DP. Já a rigidez muscular surge do aumento da resistência dos membros do indivíduo a movimentos passivos, e a bradicinesia (a lentidão dos movimentos). Esses sintomas podem afetar a vida diária do paciente com DP, fazendo com que o indivíduo leve muito mais tempo e sinta mais dificuldade para efetuar certas atividades comuns como a de comer e se vestir (Dauer & Przedborski, 2003).

Vale ressaltar também que além das características motoras, várias outras características tipicamente não-motoras são notadas no quadro clínico da DP, incluindo disfunções autonômicas e cognitivas, mudanças psiquiátricas, sintomas sensoriais e distúrbios no sono (Quadro 01) (Samii *et al.*, 2004).

Quadro 01: Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática

Sinais motores clássicos	Sinais motores secundários	Sinais não-motores
Tremor em repouso	Hipocinesia	Depressão
Rigidez muscular	Acinesia	Distúrbios no sono
Bradicinesia	Hipomimia	Demência (mais frequente em indivíduos afetados idosos)
Instabilidade postural	Hipofonia	Lentidão de processos cognitivos
	Micrografia	Disfunções autonômicas (maior frequência urinária, constipação, hipofagia)
	<i>Drooling</i>	Comportamento psicótico

Fonte: Samii *et al.*, 2004.

O progresso em relação à patogênese da DP, no entanto, não foi acompanhado de avanços correspondentes na área da terapêutica. Utilizada inicialmente na década de 1960, a L-DOPA, ainda que associada a uma série de efeitos colaterais a curto e longo prazo revolucionou o tratamento da DP e permanece como a opção farmacológica mais eficaz até então (Pahwa *et al.*, 2006), onde a meta terapêutica consiste em corrigir a deficiência estriatal de dopamina própria da doença (Gwinn-Hardy, 2002).

1.1.4. Mecanismos do parkinsonismo

Os mecanismos pelos quais as mutações genéticas levam ao parkinsonismo ainda não estão esclarecidos, mesmo assim, com o conhecimento que se tem acerca dos processos envolvidos real e hipoteticamente na DP já se sabe que a DP resulta primariamente da morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra (Dauer & Przedborski, 2003).

Uma variedade de eventos celulares, bioquímicos e moleculares, têm sido observados em indivíduos portadores de DP e esses eventos sendo detectados muito frequentemente na SNpc. Entre esses efeitos pode-se incluir: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação, excitotoxicidade e apoptose. O motivo desses eventos ainda permanece desconhecido, ou se já são conhecidos, não se sabe ao certo até que ponto ou a partir de que ponto esses eventos contribuem para o processo neurodegenerativo (McNaught *et al.*, 2006).

As mutações no gene *SNCA*, sejam as substituições simples de aminoácidos ou duplicação gênica, levam a formação de proteína α -sinucleína (monômero) anômala ou ao aumento da sua expressão que se acumula no citoplasma. Este acúmulo promove a oligomerização da α -sinucleína que é tóxica para a célula. O neurônio degrada a proteína via sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), sistema endossoma-lisossomal ou formando agregados fibrilares de alto peso molecular. A α -sinucleína participa do processo de formação de vesículas e na neurotransmissão da dopamina, mas por ser anômala, impede a sinapse e leva ao acúmulo desse neurotransmissor que é tóxico em excesso e a consequente

formação de espécies reativas de oxigênio que são maléficas à saúde celular (Hsin, 2007).

As proteínas parkina e DJ-1 participam do SUP e o defeito nessas proteínas pode diminuir a eliminação dos agregados tóxicos de α -sinucleína. A proteína DJ-1 também tem função antioxidante e sua anomalia pode facilitar a fibrilização da α -sinucleína mal-formada. Na DP os agregados de α -sinucleína acumulados no citoplasma e nos axônios dos neurônios compõem os CL (Farrer, 2006).

A proteína UCHL1 (ubiquitina carboxi terminal hidrolase L1), que tem atividade hidrolase e ligase, atua no SUP, na via endossoma-lisossomal e na formação dos CLs. A sua função é prover monômeros de ubiquitina para a proteína ubiquitina E3 ligase (parkina) e evitar que a ubiquitina seja degradada pela via endossoma-lisossomal (Farrer, 2006). A proteína parkina também medeia a fagocitação de mitocôndrias com disfunções nas suas atividades através dos autofagossomos. A falha na remoção dessas mitocôndrias pode então ser um importante fator patogênico (Less *et al.*, 2009).

As mutações dos genes *PARK6*, *PARK7* e *PARK2* resultam na disfunção da mitocôndria, produtora de ATP, que é essencial para o funcionamento do SUP (Farrer, 2006).

Para que haja a eliminação dos agregados de α -sinucleína é também necessária a preservação da citoarquitetura, o que inclui a preservação dos microtúbulos. A proteína *tau* estabiliza a função dos microtúbulos. A proteína Irrk2 é importante para a manutenção do tráfego celular e para a citoarquitetura. A sua disfunção pode conseqüentemente levar ao acúmulo de proteína *tau* e formar agregados que também são citotóxicos (Farrer, 2006).

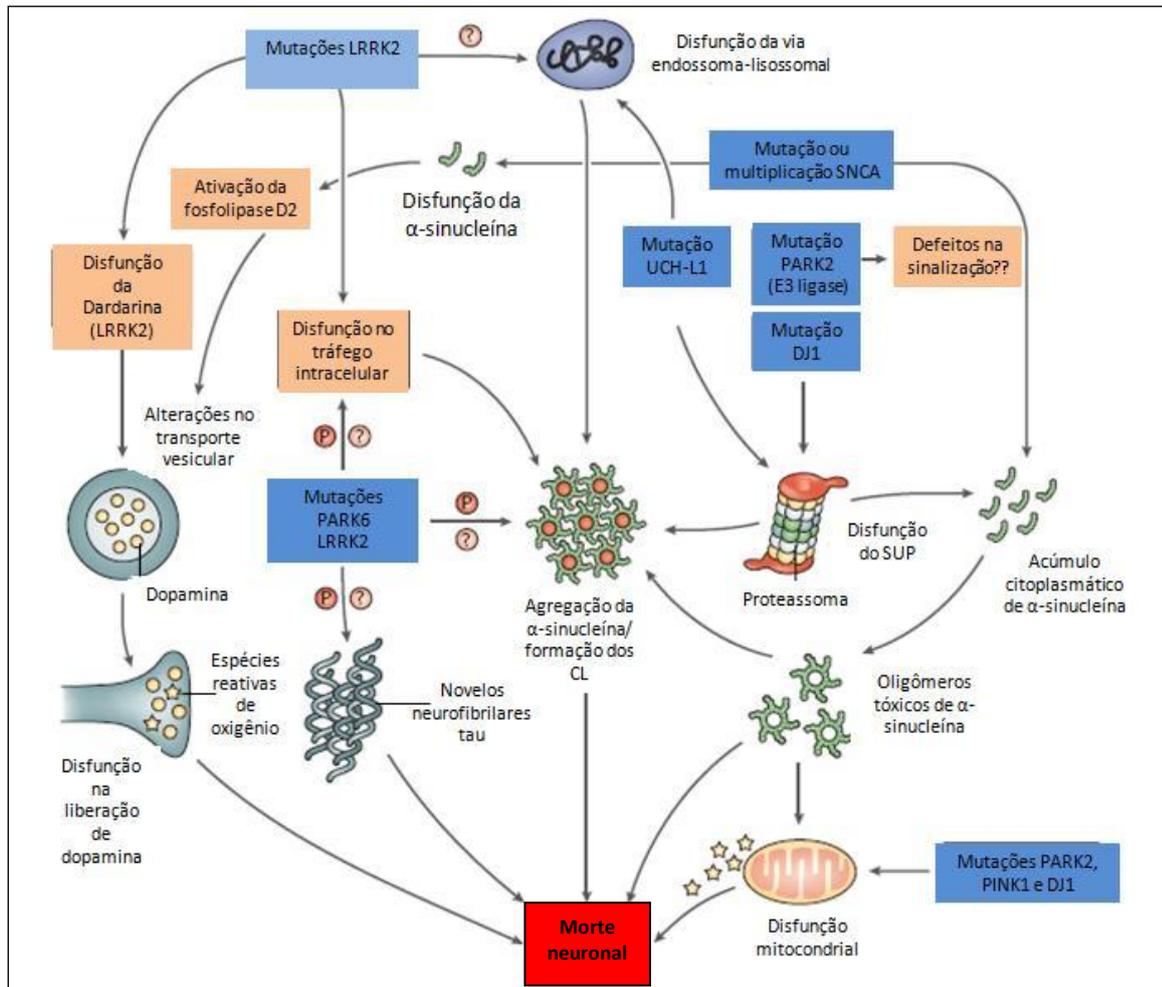


Figura 02: Modelo de mecanismo do parkinsonismo (adaptado de Farrer, 2006).

1.1.5. Fatores ambientais na doença de Parkinson

Em relação ao desenvolvimento da DP e de parkinsonismo, diversos fatores ambientais já foram associados aos mesmos, mas nenhuma dessas associações resultou em um fato concreto e conclusivo como causador da doença (Sherer *et al.*, 2002; Gasser, 2009). Dentre as exposições ambientais e ocupacionais já apontadas como participantes na etiologia da DP, vale citar a ingestão de água de poço, exposição prolongada a pesticidas e herbicidas, a vida rural, a exposição a certos metais, campos magnéticos e a mineração (Jankovic, 2005). A hipótese mais aceita no momento é que haja a interação de fatores ambientais e genéticos no desencadeamento da DP.

O surgimento da teoria da influência de fatores ambientais no desenvolvimento da DP se fortaleceu na década de 80, quando jovens usuários de

drogas da região da baía de São Francisco, nos Estados Unidos, de forma inadvertida, se injetaram um subproduto da fabricação da meperidina (fármaco utilizado para deprimir o SNC e assim reduzir as reações de dor, tendo alto potencial de dependência física e psicológica) (RANG *et al.*, 2004), o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinida (MPTP) e desenvolveram um quadro muito semelhante ao da DP (Sherer *et al.*, 2002; Healy *et al.*, 2004; Tan, 2007).

O MPTP induz toxicidade através de sua conversão pela MAO-B em astrócitos para seu metabólito ativo MPP+, que então é seletivamente captado por neurônios dopaminérgicos, causando defeito no complexo I (NADH CoQ redutase) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando ao estresse oxidativo e degeneração neuronal. A partir desta constatação surgiram os mais diversos modelos experimentais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que ainda são muito utilizados. Mas os modelos experimentais baseados no MPTP apresentam diferenças cruciais em relação ao que se observa na doença de curso natural. Por exemplo, no parkinsonismo induzido por MPTP não se observa a formação de corpos de Lewy, que são considerados marcadores patológicos da DP (Goedert, 2001; Sherer *et al.*, 2002).

Em um estudo feito por Baldereschi *et al.* (2003), observou-se um maior risco para DP em indivíduos de idade avançada, do sexo masculino, sem prática prévia de tabagismo e expostos a pesticidas. Segundo este estudo, a hipótese mais simples para esta associação (DP e pesticidas) é que os pesticidas ou seus metabólitos sejam diretamente tóxicos para a mitocôndria, cuja disfunção é considerada atualmente como um dos eventos-chave na fisiopatologia da DP.

Em relação ao tabagismo, o que se observa é uma associação inversa com o desenvolvimento da DP, porém sem bases biológicas bem estabelecidas e compreendidas. Uma das explicações atribuí a menor incidência de DP entre tabagistas ao fato de a nicotina ser capaz de estimular a liberação da dopamina e agir como antioxidante (DeLau & Breteler, 2006).

Outros estudos tentando associar a DP com a exposição a metais concluíram que não existem evidências concretas da toxicidade de metais relacionada com o surgimento da DP (Gorell, *et al.*, 1999; Uversky, *et al.*, 2001; Jankovic, 2005).

1.1.6. Aspectos genéticos e moleculares

Historicamente a DP era considerada como uma doença não-genética. A partir de estudos realizados em gêmeos essa hipótese passou a se tornar inconsistente e então surgiu a hipótese da participação de um componente genético no desenvolvimento da doença, reforçada pela observação de vários casos em uma mesma família (McInerney-Leo *et al.*, 2005).

As primeiras descrições de história familiar de DP surgiram no final do século XIX, onde Gowers verificou que 15% dos seus pacientes com DP apresentavam história familiar positiva (Filadélfia, EUA) (Gowers, 1893, apud Polymeropoulos *et al.*, 1996).

Wszolek *et al.* (1995) relataram uma família do Nebraska (Estados Unidos) na qual 18 membros em seis gerações tiveram uma progressão lenta de um quadro de parkinsonismo herdado em um padrão autossômico dominante. De acordo com esse trabalho, se constatou em um dos indivíduos dessa família que ainda estava vivo bradicinesia, rigidez muscular, tremor de repouso, instabilidade postural. No tratamento desse indivíduo foi observada uma resposta favorável ao tratamento com L-DOPA. A análise *postmortem* mostrou depleção neuronal, perda na pigmentação, gliose e a presença de corpos de Lewy na SNpc desse indivíduo. Em relatos posteriores (Wszolek *et al.*, 2004) ainda se constatou que mais 4 membros dessa mesma família desenvolveram o mesmo quadro com as mesmas características.

Desde então se passou a descrever a partir da última década mutações em genes candidatos associadas com a etiologia da DP em várias famílias. Essas mutações apresentavam características de herança de padrões mendelianos. A identificação de várias formas monogênicas estabeleceu a DP como um distúrbio de movimento com uma origem genética considerável, em pelo menos um subgrupo de pacientes. Mesmo assim, todas as formas monogênicas combinadas explicam apenas cerca de 20% dos casos de DP de início precoce e menos de 3% de início tardio (Klein, 2006).

Quanto mais precoce a idade de início da DP, maior a probabilidade de que os fatores genéticos tenham um papel dominante (Warner & Schapira, 2003). Apesar de relativamente incomuns, as formas genéticas da doença forneceram um

caminho para estudo e identificação dos mecanismos que levaram a instalação do quadro de DP, não só nos casos genéticos, mas também nos esporádicos (Spitz *et al.*, 2007).

A partir de 1997 foi possível estabelecer uma relação direta entre a DP e mutações no gene da α -sinucleína, que causa uma forma herdável de DP. A descoberta dessa relação e de outros três genes em 2002 tem facilitado a compreensão de como esses genes atuam por vias moleculares semelhantes que podem estar envolvidas com o processo patogênico da DP (Dauer & Przedborski, 2003).

Treze *loci* gênicos foram identificados como tendo relação com a DP, conhecidos como *PARK* que são denominados do *PARK1* ao *PARK15* (Gasser, 2009). Cada *PARK* representa uma região genômica ligada com graus variáveis de evidências à “doença tipo DP”, como descreveram Singleton (2004) e Klein & Schlossmacher (2007). Aqui se fala em “doenças”, pois será comentado a seguir que o espectro de manifestações das formas genéticas de DP muitas vezes se estende além das características definidoras da doença de tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Esses genes, em diferentes frequências estatísticas, foram constantemente identificados em casos de DP familiar ou DP esporádica em origens étnicas distintas (Gasser, 2009).

O Quadro 02 mostra alguns genes associados à etiologia da DP e seus respectivos padrões de herança. Os genes *PARK1*, *PARK5* e *PARK8* têm transmissão autossômica dominante. Os *PARK2*, *PARK6* e *PARK7* representam as formas de DP com padrão autossômico recessivo, relativamente raras, associadas à perda da função da proteína afetada e resultam em DP com idade de início precoce (tipicamente abaixo de 40 anos), com progressão lenta e boa resposta ao tratamento com L-DOPA (Farrer, 2006).

Apesar de somente uma pequena proporção dos casos de DP (cerca de 10%) ser causada por mutações genéticas com alta penetrância, a identificação destes genes teve um impacto significativo na compreensão dos mecanismos que determinam a degeneração dopaminérgica (Zimprich *et al.*, 2004). Esses mecanismos envolvem a agregação de proteínas, déficit de degradação de substrato pelo sistema ubiquitina-proteassomo, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (Samii *et al.*, 2004).

Quadro 02: Genes relacionados com a DP e padrões de herança

Nome do Locus	Gene	Locus	Proteína	Herança
PARK1	<i>SNCA</i>	4q21 – q23	α -sinucleína	AD
PARK2	<i>PARK2</i>	6q25 – q27	Parkina	AR
PARK3	<i>SPR?</i>	2p13	sepiapterina redutase?	AD
PARK4	<i>SNCA</i>	4p15	α -sinucleína	AD
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p14	“ubiquitin C-terminal hydrolase L1” (UCHL1)	AD
PARK6	<i>PARK6</i>	1p35 – p36	“PTEN-induced kinase 1 (PINK1)	AR
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p37	DJ1	AR
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q11.2-q13.1	“leucine-rich repeated kinase2” (Lrrk2, dardarina)	AD
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	ATP13A2	AR
PARK11	<i>GIGF2?</i>	2q34	“GBR10-interacting GYF protein 2”	AD
PARK13	<i>OMI/HTRA2</i>	-	“HTRA serine peptidase 2”	AD?
PARK14	<i>PLA2G6</i>	-	phospholipase A2 group VI	AR
PARK15	<i>FBX07</i>	-	F-box only protein 7	AR

Fonte: Gasser, 2009. AD= autossômico dominante; AR= autossômico recessivo

Apesar do Quadro 02 descrever treze *loci* gênicos *PARK*, nem todos os genes e *loci* listados têm um papel confirmado na patogênese da DP. Recentemente, foi descrito que mais um gene candidato chamado *GBA* (codifica a enzima glicocerebrosidase) pode estar implicado na etiologia da DP. Ainda, não foi atribuída designação *locus PARK* ao gene *GBA* (Gasser, 2009).

Embora só uma minoria dos casos possa ser atribuída a determinantes específicos genéticos, o estudo de genes que causam a DP de herança monogênica forneceu oportunidades para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes (De Marco *et al.*, 2008).

A expectativa é que genes adicionais sejam identificados em um futuro próximo, fornecendo novas peças ao “quebra-cabeça etiológico” da DP (McInerney-Leo *et al.*, 2005; Klein & Schlossmacher, 2007).

Dentre todos os genes estudados, o gene que mais vindo sendo divulgado ultimamente como real causa do parkinsonismo genético é o gene *LRRK2*. Estudos recentes apontam diferentes mecanismos para a forma de atuação desse “novo” gene. Ainda não está bem definida a função da proteína codificada por este gene e como as mutações afetam a função da proteína *Lrrk2*.

1.1.7. O gene *LRRK2* e a doença de Parkinson

A forma autossômica dominante da DP causada pela alteração do gene *LRRK2* (*PARK8*) foi descrita primeiramente por Funayama e cols (2002) como uma alteração, descrita em uma família japonesa acompanhada durante 20 anos, de início muito precoce e com características clínicas bem definidas de DP (Hsin *et al.*, 2006).

Em 2004, dois grupos independentes mapearam a mutação *G2019S* no gene *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2* – quinase com repetições ricas em leucina 2) na região 12 do braço longo do cromossomo 12 (12q12) (Paisán-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004).

O gene *LRRK2* possui 51 exons e codifica uma proteína chamada *Lrrk2* ou dardarina, sendo composta por 2527 resíduos de aminoácidos (Santpere & Ferrer, 2009). O termo dardarina advém do basco *dardara* que significa tremor (Paisán-Ruiz *et al.*, 2009). A *Lrrk2* é uma proteína que faz parte de uma recém-descoberta família de proteínas quinase que apresentam uma sequência similar à das tirosinas e das serina-treonina quinases (Hsin, 2007).

A *Lrrk2* é uma proteína predominantemente citoplasmática, mas que pode estar associada a várias organelas, e é expressa nos dos tecidos cerebrais e outros tecidos, incluindo – mas não limitado à – as células mais afetadas na DP (Ding & Goldberg, 2009). Esta proteína pertence à família das proteínas G e é uma quinase ativada por dimerização dependente de nucleotídeos trifosfatos. A presença de

mutações patogênicas no gene *LRRK2* pode afetar a sua dimerização (*R1441G/C*) ou o seu domínio quinase (*G2019S* ou *I2020T*) (Alegre-Abarrategui *et al.*, 2009).

A sequência da proteína *Irrk2* compreende múltiplos domínios: 12 repetições ricas em leucina (LRR – daí o seu nome), um domínio que contém a superfamília Ras/GTPase, um domínio WD40 e um domínio catalítico tipo tirosina-quinase (Mata *et al.*, 2005; Paisán-Ruíz, 2009). O domínio Ras/GTPase foi denominado de domínio Roc (*Ras of complex protein*), e dessa forma a *Irrk2* faz parte do grupo de proteínas das famílias ROCO, que são parte da família Ras/GTPase que são compostas por dois domínios importantes: Roc e COR além de outros domínios como mostra a figura 02.

Figura 03. Estrutura da proteína *Irrk2*

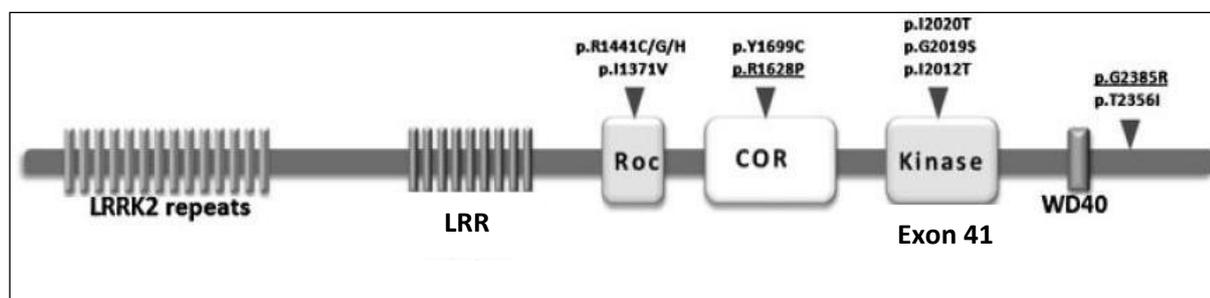


Figura 03. Proteína *Irrk2* e suas alterações. Representação esquemática da proteína *Irrk2* e seus domínios funcionais seguidos de suas mutações patogênicas. No seu domínio quinase (exon 41) podem ocorrer as mutações *I2012T*, *G2019S* e *I2020T*. LRR: repetições ricas em leucina. Roc: complexo de Ras (GTPase). COR: terminal C do Roc. Kinase: domínio catalítico tipo tirosina-quinase. (Extraído e modificado de Paisán-Ruíz, 2009).

Mutações no gene *LRRK2* (*PARK8*) parecem explicar 0,5 a 2% dos casos de DP esporádica e por volta de 6% dos casos de DP familiar, representando a causa genética mais comum de casos familiares e esporádicos de DP. A mutação mais freqüente deste gene, a *G2019S*, tem penetrância variável (Spitz, 2006; Paisán-Ruíz, 2009).

Estudos postulam que as mutações no gene *LRRK2* promovem o aumento da atividade quinase da proteína *Irrk2*. Essa proteína atua com outras proteínas na regulação da maioria das vias celulares, especialmente aquelas relacionadas à transdução de sinais, e também está envolvida nas respostas do citoesqueleto a estímulos externos. A proteína *Irrk2* é uma proteína encontrada na membrana mitocondrial externa, de forma semelhante à parkina (Spitz, 2006).

A proteína *Lrrk2* parece ser um elemento chave na etiologia de várias doenças neurodegenerativas, incluindo as sinucleinopatias e taupatias. A *Lrrk2* pode ser responsável pela fosforilação tanto da α -sinucleína como da proteína tau, assim como a sua atividade quinase pode ser um evento importante no acúmulo e agregação destas proteínas nos neurônios em degeneração (Farrer, 2006).

No gene *LRRK2* já foram identificadas mais de 20 mutações potencialmente patogênicas, mas dessas somente seis (*R1441C*, *R1441G*, *R1441H*, *Y1699C*, *G2019S* e *I2020T*) são altamente patogênicas devido a forte evidência de co-segregação em famílias afetadas e dados de experimentos *in vitro* que indicaram alterações na atividade quinase da proteína *Lrrk2* (Gasser, 2009).

Investigações realizadas em um grande número de famílias com DP de padrão autossômico dominante mostraram que as mutações mais comuns no gene *LRRK2* são em ordem decrescente de frequência: *G2019S*, *R1441C* e *I1371V*.

De todas as mutações ligadas à DP familiar, a mutação missense *G2019S* no gene *LRRK2* é a mais freqüente. Esta mutação também está presente de uma forma significativa em um grande número de casos de DP esporádica em certas populações (Ding & Goldberg, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os efeitos da mutação *G2019S* podem estar implicados na redução na taxa de crescimento dos neuritos, assim como diminuição no número de ramificações de axônios e dendritos. Apesar dessa hipótese, a função da proteína *Lrrk2* nos neurônios ainda não está consolidada (Santperre & Ferrer, 2009).

Mutações no gene *LRRK2* associadas com a atividade aumentada do domínio quinase dessa proteína resultou em aumento de morte apoptótica de linhagens celulares dopaminérgicas que estavam sendo estudadas *in vitro* (Santperre & Ferrer, 2009).

Modelos animais de *Drosophila* demonstraram que a super expressão da *LRRK2-G2019S* resultou em degeneração retinal, perda seletiva de neurônios dopaminérgicos, déficits motores e ciclo de vida reduzido. Moscas com a mutação *G2019S* apresentaram aspectos de déficits motores significativamente piores do que aquelas que expressavam o gene selvagem (Santperre & Ferrer, 2009).

O quadro clínico dos pacientes portadores de mutações no gene *LRRK2* é muito similar ao da DP. No trabalho de Di Fonzo *et al.* (2006) a idade de início dos

sintomas dos portadores da mutação *G2019S* varia entre 38 a 68 anos (em uma média de 54,2 anos). Além do quadro sintomático que se observa em indivíduos portadores dessa mutação, Berg *et al.* (2005) observaram em autopsia de paciente com quadro de DP com a mutação *G2019S*, a presença de corpos de Lewy, fato que está de acordo com a literatura, uma vez que a formação de corpos de Lewy no encéfalo de pacientes com DP é um dos principais achados patológicos dessa doença.

Baseando-se na literatura, que recentemente passou a descrever o envolvimento do gene *LRRK2* e suas mutações na etiopatogenia da DP, este trabalho foi executado com o intuito de investigar a ocorrência de mutações no exon 41 deste gene (*I2012T*, *G2019S* e *I2020T*) em um grupo de 55 indivíduos afetados pela DP. Visando principalmente a mutação *G2019S*, que de acordo com a literatura é responsável por 5-6% dos casos de parkinsonismo hereditário e 1-2% dos casos de parkinsonismo esporádico. Além de que, o gene *LRRK2* e suas mutações estão relacionados com mais de 10% dos casos de DP da forma autossômica dominante.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a análise molecular do exon 41 do gene *LRRK2* em pacientes com Doença de Parkinson acompanhados pelo serviço de Neurologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) e do Hospital Ophir Loyola, além da Associação Paraense dos Portadores de Doença de Parkinson, utilizando os métodos de SSCP e sequenciamento direto.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar e determinar a frequência das mutações *G2019S*, *I2012T* e *I2020T* em pacientes com DP;

Descrever e associar o quadro clínico de pacientes com DP e com a mutação *G2019S*;

3. METODOLOGIA

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por um grupo constituído por 55 pacientes com diagnóstico de DP tratados em Hospitais de referência e que estão inscritos na Associação Paraense de Pacientes com DP.

Foi avaliado nesse estudo um total de **55** indivíduos (aqui nomeados de DP01, DP02, DP03 e assim por diante): **33** do sexo masculino e **22** do sexo feminino (na proporção de 1,5:1). O presente estudo contou com um grupo heterogêneo de pacientes portadores com DP não correlacionados, sem levar em consideração a origem da doença. Logo, este trabalho considerou somente a análise dos pacientes, sem envolver membros de suas famílias, o que poderá ser objeto de um futuro estudo.

A idade dos pacientes variou de 44 anos (paciente DP08) a 83 anos (paciente DP03). Os dados clínicos dos pacientes com Doença de Parkinson foram obtidos a partir dos prontuários hospitalares e fichas médicas de diagnóstico de cada indivíduo.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça.

No momento do contato com os pacientes e/ou seus respectivos familiares, foram informados os objetivos deste estudo e os riscos e benefícios do mesmo ao paciente, aos familiares e à população afetada pela doença em questão. Para os pacientes que receberam o convite para participação deste estudo (aceitação por parte do paciente ou responsável por ele), foi fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido aos pais (ou responsáveis) do paciente (Anexo I).

Considerando o caráter observacional do estudo, os pacientes e familiares não foram expostos a nenhum risco maior. O material biológico colhido (sangue periférico) foi obtido por um procedimento pouco invasivo (utilizando punção venosa periférica). O material biológico coletado foi utilizado apenas neste estudo e ficará armazenado sob a responsabilidade do pesquisador responsável (coordenador do estudo).

O presente estudo obteve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da UFPA com protocolo nº 2547/06 (Anexo II).

3.3. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas de sangue foram realizadas através de punção venosa com agulhas e seringas estéreis e descartáveis. De cada indivíduo foram coletados de 5 a 10 mL de sangue total em tubo estéril com ácido-etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) para posterior extração de DNA. Os tubos foram devidamente identificados, acompanhados de um protocolo clínico e do termo de consentimento livre e esclarecido. Os tubos foram mantidos a -20 °C para posterior extração de material genético.

3.4. PROTOCOLOS EMPREGADOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO EXON 41 DO GENE LRRK2

3.4.1. Extração de DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos, por meio do método convencional de extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol (modificado de Sambrook *et al.*, 1989).

A partir de 5,0 mL sangue venoso periférico foram obtidos *pellets* leucocitários com uso de uma solução de lise de eritrócitos (5mM/L de MgCl₂,

20mM/L de Tris-HCl, pH 8,0), levados ao agitador por 15 minutos e então levados à centrifuga por 10 minutos (min) a 14000 rotações por minuto (rpm). Após centrifugação foi obtido um *pellet* de leucócitos e o sobrenadante foi desprezado. O processo foi repetido com uso de uma solução tamponada de homogeneização até que restou no tubo apenas um *pellet* de leucócitos que foi resuspendido, após se descartar o último sobrenadante, em 1,5 mL de solução de lise de leucócitos (Tris-HCl pH 7,6 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA pH 8,0 2mM, NaCl 0,4M) adicionada de 50 µL de SDS 10% e 20 µL de proteinase-K(10 mg/mL) (GIBCO BRL).

Para que se procedesse a lise total dos leucócitos, as amostras, em seus respectivos tubos, foram incubadas por 18 horas em banho-maria a 37°C. Passadas as 18 horas, as amostras foram retiradas da incubação, foram adicionados 400 µL de fenol tamponado e 400 µL clorofórmio-isopropanol (24:1) e então levadas ao agitador por 15 minutos cada e então foram novamente centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante contendo DNA desproteínizado de cada amostra foi transferido para tubos individuais autoclavados e nesses tubos foram adicionados 1 volume de isopropanol absoluto à baixa temperatura, e cuidadosamente homogeneizados por inversão. O DNA que se precipitou em forma de *pellets* foi novamente centrifugado a 14000 rpm por 10 min e então o sobrenadante do tubo foi descartado. Após o descarte total do sobrenadante as amostras foram lavadas duas vezes com 200 µL de etanol 70% gelado, uma vez com etanol absoluto gelado e após uma última centrifugação a 14000 rpm durante 5 min o sobrenadante foi completamente descartado e as amostras foram colocadas para secar em ambiente controlado de baixa umidade durante 24 horas, e por fim as amostras foram resuspensas em solução de TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM). As amostras foram quantificadas e armazenadas em *freezer* à -20° C.

3.4.2. Amplificação do exon 41 do gene LRRK2

A investigação de mutações iniciou através da amplificação pela técnica da PCR do exon 41 do gene *LRRK2*. O tamanho do fragmento amplificado foi de 325 pb. O par de iniciadores usado na amplificação do exon 41 foi: F (5': TTG ATG CTT GAC ATA GTG GAC A :3') e R (3': CAT CTG AGG TCA GTG GTT ATC C :5'). As condições da PCR estão descritas no Quadro 03 (modificado de Deng *et al.*, 2006).

Quadro 03: Condições de PCR para o exon 41 do gene LRRK2.

Etapas	Temperaturas	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°	3 min	1
Desnaturação	94°	45 seg	35
Anelamento	59°	45 seg	
Extensão	72°	60 seg	
Extensão Final	72°	5 min	1

3.4.3. Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)

Após a amplificação do exon 41 do gene *LRRK2*, os fragmentos foram submetidos à análise de SSCP. Este procedimento descrito por Labrune *et al.* (1991) é um método de triagem molecular, baseado na desnaturação do DNA em alta temperatura (acima de 90°C), originando 2 fitas simples. Alterações na seqüência gênica dos produtos da desnaturação podem ser visualizadas em gel de poliacrilamida não-desnaturante, corado com nitrato de prata. A presença de uma alteração na seqüência normal provoca um padrão de migração eletroforético alterado e diferente do indivíduo controle (normal), o qual pode ser visualizado ao final da análise.

3.4.4. Análise de sequenciamento

As amostras que apresentaram mobilidade eletroforética alterada no SSCP foram submetidas à análise por seqüenciamento direto automatizado, com o intuito de identificar alterações na seqüência gênica.

Após a amplificação das amostras alteradas, os produtos de PCR foram submetidos à análise através de seqüenciamento direto (primer *foward*) utilizando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e o Seqüenciador Automático ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências das mutações encontradas foram calculadas pela divisão do número de indivíduos DP portadores das mesmas pelo número total de indivíduos com DP pesquisados. Para a determinação dos valores percentuais este coeficiente foi multiplicado por 100.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS PACIENTES COM DP

A partir do levantamento dos prontuários médicos dos pacientes com DP constatou-se que a faixa de idade do grupo foi dos 44 aos 83 anos de idade.

Dos pacientes que participaram deste estudo, 72,7% (40/55) conseguiram definir o início da instalação do quadro da doença. Em relação a este grupo de pacientes com DP foi observado que nenhum relatou o aparecimento dos sintomas abaixo dos vinte anos de idade. Apenas 5,5% (3/55) dos pacientes com DP apresentaram os sintomas iniciais entre 21 e 40 anos. Foi observado que 40% (22/55) apresentaram os sintomas de DP entre 41 e 60 anos de idade e 27,3% (15/55) dos pacientes entre 61 e 80 anos de idade. Nenhum dos indivíduos relatou o início dos sintomas acima dos 81 anos de idade. No total a média de idade na amostra para a idade de aparecimento dos sintomas foi de 53 anos.

A idade mínima encontrada para o aparecimento dos sintomas foi de 28 anos. Foi observado neste paciente um quadro de DP que se instalou precocemente. Não há relato da presença de DP na família deste paciente. A idade máxima encontrada para o aparecimento dos primeiros sintomas de DP foi de 78 anos de idade (Figura 04).

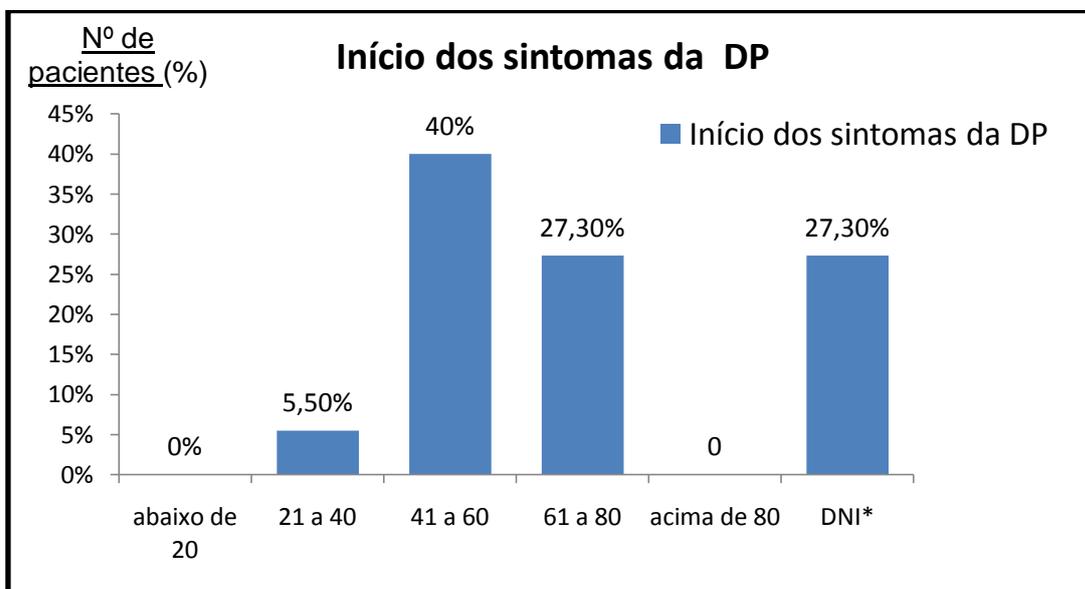


Figura 04. Início dos sintomas da DP: Idade de início para o aparecimento dos sintomas da DP. *DNI: dados não informados

Em relação à história familiar, o levantamento nos prontuários médicos apontou que 23,6% dos pacientes com DP (13/55) não souberam informar a presença de outros casos em suas famílias ou esta informação não constava nos prontuários. Dos que souberam informar 65,5% dos pacientes (36/55) não apresentavam em nenhum grau de parentesco história familiar para a DP e 10,9% (6/55) informaram a presença de outros casos de DP na família: três apresentaram história familiar positiva para parentes em 1º grau (irmão / irmã / pai / mãe); dois para parentes de 3º grau (irmã da mãe / irmão do pai) com sintomas parkinsonianos; um relatou que possuía um parente de 2º grau (avô) portador de sintomas parkinsonianos (Figura 05).

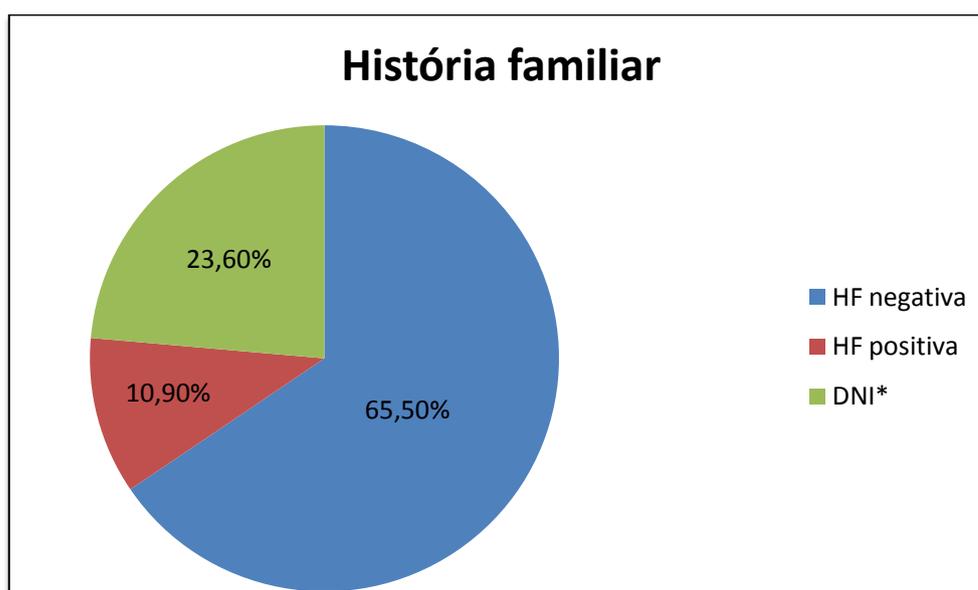


Figura 05. História familiar de quadros semelhantes. Porcentagem de indivíduos que possuem quadro de DP ou semelhante na família. *DNI: dados não informados.

Neste estudo foi verificado que 58,2% (32/55) dos pacientes revelaram quadros clínicos similares ao da DP idiopática: início assimétrico, perda da expressividade facial (face de máscara), hipocinesia, rigidez nos membros, tremor que evoluiu de forma gradual, distúrbios do equilíbrio e da marcha, dentre outros sintomas.

Para todos os pacientes, a primeira medida tomada assim que se confirmou o quadro de DP foi a adoção de medicação a base de agonistas dopaminérgicos, principalmente levo-DOPA. Foi observado também que a maioria dos pacientes submetidos ao controle da DP com o uso de agonistas dopaminérgicos respondeu bem ao tratamento.

4.2. ANÁLISE MOLECULAR

O exon 41 do gene *LRRK2* foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 2,0% (p/v) para verificar a amplificação de um fragmento de 325 pares de base.

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à análise por SSCP. Foram observados três pacientes com DP (5,5% do total) com um padrão de migração eletroforética diferente (canaleta 7) do observado no padrão de migração normal (demais canaletas), indicando uma alteração na seqüência do exon 41 do gene *LRRK2*. A presença desta mutação foi posteriormente confirmada através da análise de seqüenciamento deste fragmento de DNA (Figura 06).

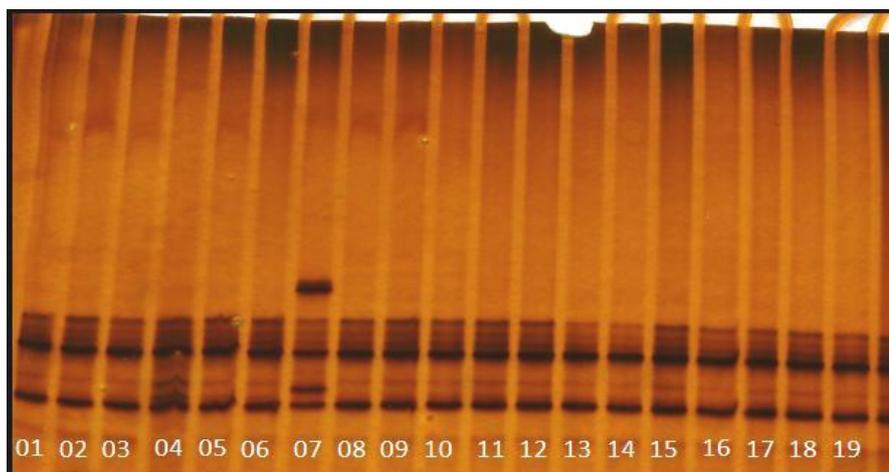


Figura 06. Análise por SSCP do exon 41 do gene *LRRK2*. Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Canaletas de 01 a 06 e 08 a 19: padrão de migração normal. Canaleta 07: paciente com DP que apresentou um padrão de migração alterado para este fragmento.

As amostras que apresentaram padrões de migração eletroforética alterados na técnica de SSCP foram submetidas à análise de seqüenciamento. Os fragmentos foram seqüenciados a partir do primer *foward* e a mutação *G2019S* foi identificada. Esta mutação é causada por transição de uma guanina por uma adenina na posição 6055 do éxon 41 do gene *LRRK2*, levando à substituição de um resíduo de glicina por um resíduo de serina na posição 2019 da proteína. A freqüência alélica para esta mutação foi de 2,7% (Figura 07).

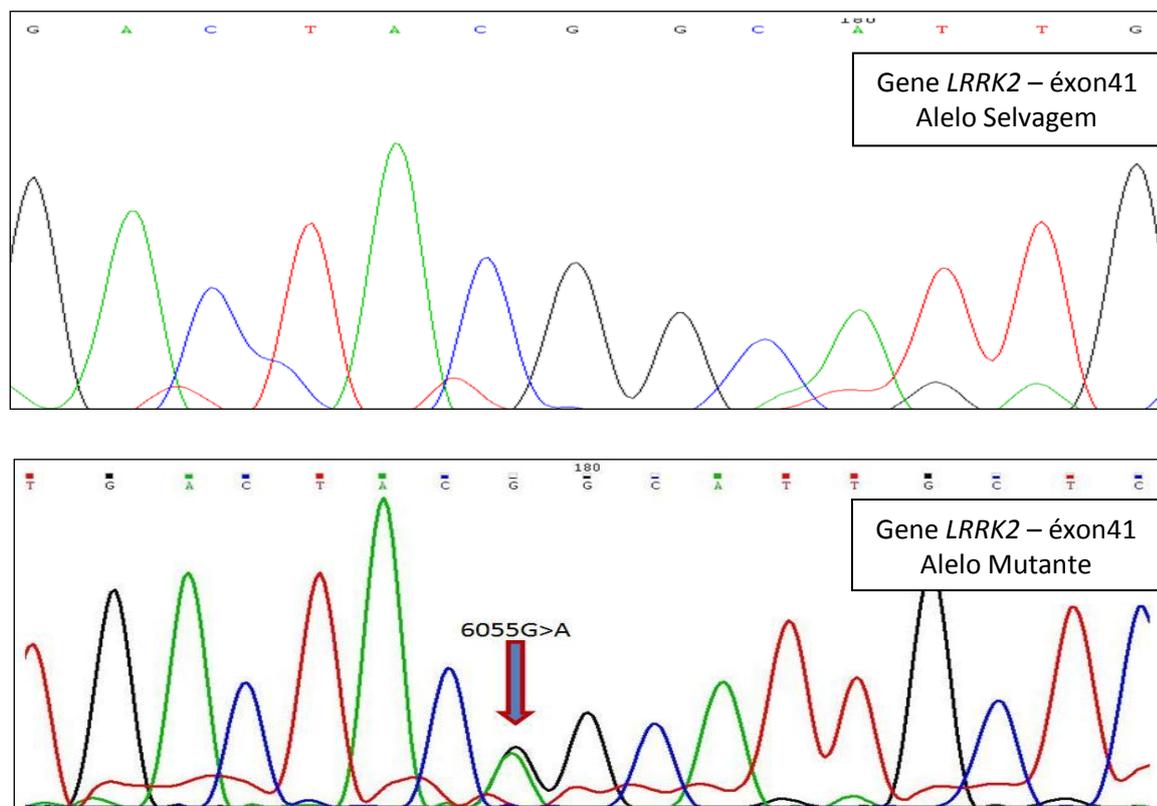


Figura 07. Seqüenciamento do éxon 41 do gene *LRRK2*: Identificação da mutação *G2019S* no estado de heterozigose observado em três pacientes com DP.

Não foi encontrado nenhum paciente com DP apresentando as mutações *I2012T* e *I2020T*.

4.3. PERFIL DOS PACIENTES COM DP APRESENTANDO A MUTAÇÃO G2019S

A Tabela 01 mostra, a partir do levantamento dos prontuários médicos dos pacientes com DP (DP07, DP37 e DP51), que todos apresentaram uma certa precocidade no aparecimento dos sintomas, particularmente o paciente DP07. Estes pacientes apresentaram um quadro clínico que se instalou lentamente e teve início assimétrico. Os pacientes foram responsivos de forma positiva ao tratamento com agonistas dopaminérgicos. Em relação ao gênero dos pacientes com DP apresentando a mutação *G2019S*, dois são do sexo masculino e um do sexo feminino. Somente o paciente DP51 apresentou história familiar positiva para DP.

Tabela 01: Perfil dos pacientes com DP apresentando a mutação *G2019S*

Paciente	Sexo	Idade atual	Idade de início dos sintomas	Ocupação atual	Ocupação anterior	Sintomas iniciais	Medicação	Exposição ambiental	História familiar
DP07	M	51	35	Aposentado	-	-	-	-	-
DP37	F	55	44	dona de casa	dona de casa	tremor hemilateral brando	Biperideno, Mantidan	Água de poço – longo período	Não
DP51	M	83	47	Aposentado	alfaiate, operário da construção civil	tremor hemilateral + parestesia facial	Biperideno, Mantidan	Água de poço	Irmã

5. DISCUSSÃO

A idade mínima encontrada para o início dos sintomas foi de 28 anos (DP08), notando nesse paciente um quadro que se instalou precocemente. Como anteriormente citado, os indivíduos com componente genético favorável à DP tendem a apresentar o chamado parkinsonismo precoce (Beal, 2001). No entanto, não há relato da presença de DP na família de DP08. Estes achados podem sustentar a hipótese que o referido paciente não apresente DP familiar (Beal, 2001).

Em relação à idade máxima encontrada para o aparecimento dos sintomas da DP, apenas um probando apresentou o quadro de DP com instalação mais tardia (78 anos de idade). Sendo assim, esse indivíduo é um provável portador do quadro de DP idiopática, onde os sintomas clínicos da DP só aparecem em idades avançadas (acima dos 64 anos de idade) e tendem a progredir podendo ser apenas amenizados através do uso de medicamentos. A partir desses achados é possível caracterizar este paciente dentro dos 90% dos casos de DP, parcela essa correspondente aos quadros de DP idiopática segundo trabalhos como o de Samii *et al.* (2004) e o de Barbosa *et al.* (2006)

No presente estudo 13 indivíduos não souberam informar a presença ou ausência da história familiar de quadros de DP na sua família, ou então esses dados não constavam em suas fichas médicas.

Trinta e dois pacientes com DP apresentaram quadros clínicos similares ao da DP idiopática. Os indivíduos relataram: início assimétrico, perda da expressividade facial (face de máscara), hipocinesia, rigidez nos membros, tremor que evoluiu de forma gradual, distúrbios do equilíbrio e da marcha, dentre outros sintomas. A maioria dos pacientes DP respondeu bem ao tratamento com agonistas dopaminérgicos ou levodopa. Todos esses dados corroboram com dados da literatura, a exemplo os trabalhos de Dauer & Przedborski, (2003) e Mata *et al.* (2005).

O sequenciamento direto foi realizado para as amostras que apresentaram padrão indicativo de mutação no éxon 41 do gene *LRRK2* na técnica de SSCP. Os indivíduos DP07, DP37 e DP51 foram os que apresentaram os padrões alterados. A análise de sequenciamento direto confirmou todos os probandos como heterozigotos para a mutação G2019S.

O presente estudo apresentou uma frequência absoluta calculada para percentual de indivíduos portadores da mutação de 5,45%, sendo todos portadores da

mutação *G2019S* em heterozigose. Para os percentuais de frequência alélica o resultado obtido foi de 2,7%, achado similar a de outros estudos analisando a frequência da mutação *G2019S* no exon 41 do gene *LRRK2* em pacientes com DP (Pimentel *et al.*, 2008; Gasser, 2009).

Um estudo conduzido por Di Fonzo e cols. (2005) encontrou uma frequência alélica de 6,6% para a presença da mutação *G2019S*, frequência relativamente alta, mas um resultado dentro do esperado visto que seu estudo foi realizado com um tamanho amostral reduzido (apenas quatro de famílias).

Estudos realizados em populações européias e dos Estados Unidos evidenciaram a mutação *G2019S* como a mais comum do gene *LRRK2* e sua frequência em casos de DP familiar é de 5 a 6% e de 1 a 2% para os casos de DP de origem esporádica (Gasser, 2009).

Existem trabalhos em que a frequência da mutação *G2019S* encontrada consegue atingir valor que variam de 3 a 41%, isso quando se admite que esses trabalhos foram feitos em populações geneticamente isoladas como nos judeus askenazi e árabes do norte da África (Gasser, 2009).

Estudos realizados na população brasileira apontaram até então uma prevalência de 3,3% na população acima de 64 anos de idade (Barbosa *et al.*, 2006). Tomando como referência um estudo mais abrangente e recente de Pimentel *et al.* (2008), envolvendo 154 pacientes com DP da cidade do Rio de Janeiro, com idades que variavam de 33 a 86 anos de idade, foi encontrado 03 pacientes heterozigotos e nenhum homozigotos para a mutação *G2019S*. O resultado deste estudo foi uma frequência alélica de 1,95% para a citada mutação, sendo dois casos de DP familiar e um caso de DP esporádica.

Em países como Itália, Espanha e Portugal, a frequência para a mutação *G2019S* varia de 1 a 2% para DP esporádica e de 5 a 6% para DP familiar. Até o momento essas frequências estão sendo adotadas como parâmetros de comparação de indícios ancestrais tendo em vista que esses grupos contribuíram significativamente para a formação da nossa população, logo deixando os resultados aqui encontrados dentro do intervalo que se relata na literatura (Hsin, 2007; Gasser, 2009).

A Tabela 01 apresenta uma síntese dos dados relevantes dos três pacientes que foram identificados com a mutação *G2019S*. Nesta tabela é possível verificar a idade atual, a idade de início dos sintomas, a ocupação antes e depois do início da doença, assim como a presença de quadros semelhantes na família. Como se pode

notar, o indivíduo DP07, dentre os que foram constatados como portadores da mutação *G2019S*, foi o que apresentou o início mais precoce e seu quadro clínico continua associado à progressão da DP, independentemente das medidas terapêuticas. Atualmente, este paciente está com 51 anos de idade, sendo o mais jovem dos portadores da mutação dentre os participantes deste trabalho. O paciente DP07 atualmente já não fala e nem anda em decorrência do estágio e da evolução do seu quadro clínico. O paciente DP51 também não anda, mas ainda mantém a fala, mesmo que com certa dificuldade.

As características apresentadas pelo paciente DP07 conflitam com os dados da literatura, uma vez que para indivíduos portadores da mutação *G2019S* a DP tem um início precoce em relação aos casos idiopáticos, mas a sua progressão se dá de forma lenta, boa resposta ao tratamento com L-DOPA com baixa frequência de demência e outras complicações psiquiátricas, aspectos que não foram observados no paciente DP07 (Gasser, 2009).

O fato dos indivíduos aqui apresentados como portadores em heterozigose para a mutação *G2019S* não interfere nos dados como idade de início, progressão da doença e sintomas apresentados. Isso se deve pelo fato de que a mutação parece ser completamente dominante, pois portadores identificados homozigotos para essa mutação não diferiram dos portadores heterozigotos da mesma quando se trata a respeito da idade de início, gravidade da doença e responsividade ao tratamento (Gasser, 2009).

Os estudos de pacientes com DP apresentando a mutação *G2019S* apontam para um padrão de herança autossômico dominante. Sendo assim, os casos de heterozigose aqui encontrados podem ser considerados dentro deste padrão de herança mendeliana (Di Fonzo *et al.*, 2005; Mata *et al.*, 2005; Hsin, 2007; Gasser, 2009).

Até o momento o gene *LRK2* é o mais importante determinante de parkinsonismo de causa genética. A definição dos mecanismos envolvidos na penetrância e expressão gênica das mutações desse gene – principalmente da *G2019S* – poderá explicar o motivo da variabilidade da idade de início dos sintomas e algumas possíveis variações genotípicas (Paisán-Ruíz, 2009).

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dificuldade no estudo da genética da DP se baseia inicialmente no fato de não haver um teste específico para o diagnóstico da afecção, visto que o diagnóstico até o momento é puramente clínico. Então o acompanhamento de pacientes e coleta de dados clínicos muitas vezes se torna um tanto impreciso.

Mesmo com todos os avanços presentes na área da pesquisa e da saúde não se pode dizer que o diagnóstico preditivo para a DP é de grande valia para esta doença já que ainda não há como fazer uma intervenção preventiva ou mesmo clínica no curso da doença, pois até então não há terapia neuroprotetora ou terapia gênica e o diagnóstico genético na sua fase sintomática não altera a estratégia terapêutica.

Os achados proporcionados por este trabalho se resumem em dados significantes sobre o *screening* da mutação *G2019S* do gene *LRRK2* na população brasileira, mesmo se atendo as condições experimentais impostas apresentadas por este trabalho.

O presente estudo contou com um grupo heterogêneo de pacientes portadores da DP sem levar em consideração a origem da doença. Logo, este trabalho considerou somente a análise dos pacientes, sem envolver membros de suas famílias, o que poderá ser objeto de um estudo futuro.

6. CONCLUSÕES

Do total de 55 indivíduos avaliados foram encontrados três casos de heterozigotos para a mutação 6055G>A (*G2019S*) presente no éxon 41 do gene *LRRK2* (DP07, DP37 e DP51).

A frequência alélica encontrada no nosso grupo amostral foi de 2,7% (3 indivíduos em um grupo de 55 pacientes).

Não foi encontrado nenhum indivíduo portador das mutações I2012T e I2020T nos participantes deste trabalho.

O padrão clínico apresentado pelos pacientes portadores da mutação *G2019S* foi semelhante ao que se indica na literatura, exceto o paciente DP07, assim como a satisfatória responsividade ao tratamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE-ABARRATEGUI, J.; CHRISTIAN, H.; LUFINO, M.; MUTIHAC, R.; VENDA, L.L.; ANSORGE, O. & WADE-MARTINS, R. LRRK2 regulates autophagic activity and localises to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. **Hum Mol Genet**, **18**: 4022-2034. 2009.
- BALDERESCHI, M.; Di CARLO, A.; VANNY, P; GHETTI, A.; CARBONIN P.; AMADUCCI L.; INZITARI D. & ITALIAN LONGITUDINAL STUDY ON AGING WORKING GROUP. Life-style related risk factors for Parkinson's disease: a population study. **Acta Neurologica Scandinavica**, **108**: 234-244. 2003.
- BARBOSA, E.R.; LIMONGI, J.C. & CUMMINGS, J.L. Parkinson's disease. **Psychiatric Clinics of North America**, **20**: 769-790. 1997.
- BARBOSA, M.T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D.P.; CUNNINGHAM, M.C.; GUERRA, H.L.; LIMA-COSTA, M.F. & CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, **21**: 800-808. 2006.
- BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews - Neuroscience**, **2**: 325-332. 2001.
- BERG, D.; SCHWEITZER, K.J.; LEITNER, P.; ZIMPRICH, A.; LICHTNER, P.; BELCREDI, P.; BRÜSSEL, T.; SCHULTE, C.; MAASS, S.; NÄGELE, T.; WSZOLEK, Z.K. & GASSER, T. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. **Brain**, **128**: 3000-3011, 2005.
- BLUM D.; TORCH S.; LAMBENG N.; NISSOU M.F.; BENABID A.L.; SADOUL R. & VERNA J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, **65**: 135–172. 2001.
- DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, **39**: 889-909. 2003.
- DAWSON, T.M. & DAWSON, V.L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, **5**: 1058-1061. 2002.
- De LAU, L.M. & BRETELER, M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, **5**: 525- 535. 2006.

- De MARCO EV, ANNESI G, TARANTINO P, ROCCA FE, PROVENZANO G, CIVITELLI D, CIRÒ CANDIANO IC, ANNESI F, CARRIDEO S, CONDINO F, NICOLETTI G, MESSINA D, NOVELLINO F, MORELLI M, QUATTRONE A. glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. **Movement Disorders**, **23**: 460-463. 2008.
- DEUMENS R.; BLOKLAND A. & PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, **175**: 303-317. 2002.
- Di FONZO, A.; TASSORELLI, C.; DE MARI, M.; HSIN, F.C.; FERREIRA, J.; ROHÉ A.; MARCONI, R.; ABBRUZZESE, G.; LOPIANO, L.; FINCATI, E.; GUIDI, M.; MARINI, P.; STOCCHI, F.; ONOFRJ, M.; TONI, V.; TINAZZI, M.; FABBRINI, G.; LAMBERTI, P.; VANACORE, N.; MECO, G.; LEITNER, P.; UITTI, R.J.; WSZOLEK, Z.K.; GASSER, T.; SIMONS, E.J.; BREEDVELD, G.J.; GOLDWURM, S.; PEZZOLI, G.; SAMPAIO, C.; BARBOSA, E.; MARTIGNONI, E.; OOSTRA, B.A.; BONIFATI, V.; & ITALIAN PARKINSON GENETICS NETWORK. Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. **European Journal of Human Genetics**, **14**: 322-331. 2006.
- Di FONZO, A.; ROHÉ, C.F.; FERREIRA, J.; CHIEN, H.F.; VACCA, L.; STOCCHI, F.; GUEDES, L.; FABRIZIO, E.; MANFREDI, M.; VENACORE, N.; GOLDWURM, S.; BREEDVELD.; SAMPAIO, C.; MECO, G.; BARBOSA, E.; OOSTRA, B.A.; BONIFATI, V. & PARKINSON GENETICS NETWORK. A frequent *LRRK2* gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. **The Lancet**, **365**: 412-415. 2005.
- DING, X. & GOLDBERG, M.S. Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. **PLoS ONE**, **4**. 2009 (no prelo).
- FARRER, M.J. Genetics of Parkinson's disease: paradigm shifts and future prospects. **Nature**, **7**: 306-318. 2006.
- FLINT M. B. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature reviews - Neuroscience**, **2**: 325-332. 2001.
- FREED, C.R.; GREENE, P.E.; BREEZE, R.E.; TSAI, W.Y.; DUMOUCHEL, W.; KAO, R.; DILLON, S.; WINFIELD, H.; CULVER, S.; TROJANOWSKI, J.Q.; EIDELBERG, D. & FAHN, S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **New England Journal of Medicine**, **344**: 710-719. 2001.
- FUKAE, J.; MIZUNO, Y. & HATTORI, N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion**, **7**: 58-62. 2007.
- FUNAYAMA, M.; HASEGAWA, K.; KOWA, H.; SAITO, M.; TSUJI, S. & OBATA, F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. **Ann Neurol**, **51**: 296-306. 2002.

- GAO, H.M.; LIU, B.; ZHANG, W. & HONG, J.S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, **24**: 395-401. 2003.
- GASSER, T. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: insights from genetic studies. **Expert Rev Mol Med**, **11**. 2009(no prelo).
- GELB, D.J.; OLIVER, E. & GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Archives of Neurology**, **56**: 33-39. 1999.
- GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, **2**: 75-86. 2001.
- GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; KORTSHA, G.X.; BROWN, G.G. & RICHARDSON, R.J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, **20**: 239-247. 1999.
- GWINN-HARDY, K. Genetics of Parkinsonism. **Movement Disorders**, **17**: 645-656. 2002.
- HEALY, D.G.; ABOU-SLEIMAN, P.M. & WOOD, N.W. PINK, PARK, or PANK? A clinicians'guide to familial parkinsonism. **Lancet Neurology**, **3**: 652-662. 2004.
- HSIN, C.F. **Estudo genético da doença de Parkinson**. Tese de Doutorado. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007. 171p.
- HSIN, C.F.; ROHÉ, C.F.; COSTA, M.D.L.; BREEDVELD, G.J.; OOSTRA, B.A.; BARBOSA, E.R. & BONIFATI, V. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel *parkin* mutation in a genetic isolated from north-eastern Brazil. **Neurogenetics**, **7**: 13-19. 2006.
- JANKOVIC, J. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. **Neurology**, **64**: 800-808. 2005.
- KACHERGUS, J.; MATA, F.I.; HULIHAN, M.; TAYLOR, J.P.; LINCOLN, S.; AASLY, J.; GIBSON, J.M.; ROSS, O.A.; LYNCH, T.; WILEY, J.; PAYAMI, H.; NUTT, J.; MARAGANORE, D.M.; CZYZEWSKI, K.; STYCZYNSKA, M.; WSZOLEK, Z.K.; FARRER, M.J. & TOFT, M. Identification of a novel *LRRK2* mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. **American Journal Of Human Genetics**, **76**: 672-680. 2005.
- KLEIN, C. & SCHLOSSMACHER, M.G. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. **Neurology**, **69**: 2093-2104. 2007.
- KLEIN, C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. **Archives of Neurology**, **63**: 328-334. 2006.

- LABRUNE, P.; MELLE, D.; REY, F.; BERTHELON, M.; CAILLAUD, C.; REY, J.; MUNNICH, A. & LYONNET, S. Single-strand conformational polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.** 48(6):1115-1120, 1991.
- LEES, A.; HARDY, J. & REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, **373**: 2055-2066. 2009.
- MATA, I.F.; KACHERGUS, J.M.; TAYLOR, J.P.; LINCOLN, S.; AASLY, J.; LYNCH, T.; HULIHAN, M.M.; COBB, S.A.; WU, R.M.; LU, C.S.; LAHOZ, C.; WSZOLEK, Z.K. & FARRER, M.J. Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. **Neurogenetics**, **6**: 171-177. 2005.
- MCINERNEY-LEO, A.; HADLEY, D.W.; GWINN-HARDY, K. & HARD, J. Genetic testing in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, **20**: 01-10. 2005.
- MCNAUGHT, K.S.P.; JACKSON, T.; JNOBAPTISTE, R.; KAPUSTIN, A. & OLANOW, W. Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. **Neurology**, **66**: 37-49. 2006.
- MENESES, M.S. & TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2003. 348p.
- MIYASAKI, J.M.; SHANNON, K.; VOON, V.; RAVINA B.; KLEINER-FISMAN G.; ANDERSON K.; SHULMAN L.M.; GRONSETH G.; WEINER W.J. & QUALITY STANDARDS SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY. Practice parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson's disease (an evidence-based review). **Neurology**, **66**: 996-1002. 2006.
- PAHWA, R.; FACTOR, S.A.; LYONS, K.E.; ONDO, W.G.; GRONSETH, G.; BRONTE-STEWART, H.; HALLETT, M.; MIYASAKI, J.; STEVENS, J. & WEINER, M.J. Practice parameter: treatment of Parkinson's disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, **66**: 983-995. 2006.
- PAISÁN-RUIÍZ, C. LRRK2 gene variation and its contribution to Parkinson's disease. **Human Mutation**, **30**: 1-8. 2009.
- PAISÁN-RUIÍZ, C.; JAIN, S.; EVANS, E.W.; GILKS, W.P.; SIMÓN, J.; VAN DER BRUG, M.; MUNAIN, A.L.; APARICIO, S.; GIL, A.M.; KHAN, N.; JOHNSON, J.; MARTINEZ, J.R.; NICHOLL, D.; CARRERA, I.M.; PEÑA, A.S.; SILVA, R.; LEES, A.; MARTÍ-MASSÓ, J.F.; PÉREZ-TUR, J.; WOOD, N.W. & SINGLETON, A.B. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. **Neuron**, **44**: 595-600. 2004.
- PARKINSON, JAMES. **An Essay on the Shaking Palsy**. Sherwood, Neely and Jones. Londres, 1817. 78p.

- PIMENTEL, M.M.G.; MOURA, K.C.V.; ABDALLA, C.B.; PEREIRA, J.S.; ROSSO, A.L.Z.; NICARETTA, D.H.; JUNIOR, C.M.; ALMEIDA, R.M.; SANTOS, J.M.; BASTOS, I.C.C.; MENDES, M.F.X.; MAULTASCH, H.; COSTA, F.H.R.; WERNECK, A.L.S. & SANTOS-REBOUÇAS, C.B. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. **Neuroscience Letters**, **433**: 17-21. 2008.
- POLYMEROPOULOS, M.H.; HIGGINS, J.J.; GOLGE, L.I.; JOHNSON, W.G.; IDE, S.E.; DI LORIO, G.; SANGES, G.; STENROOS, E.S.; PHO, L.T.; SCHAFFER, A.A.; LAZZARINI, A.M.; NUSSBAUM, R.L. & DUVOISIN, R.C. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, **274**: 1197-1199. 1996.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. & MOORE, P.K. **Farmacologia**. Elsevier. 5ª ed. Rio de Janeiro, 2004. 904p.
- ROPPER A.H. & BROWN R.H. **Adams and Victor's Principles of Neurology**. McGraw-Hill . 8ª ed. Nova Iorque, 2005. 1384p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. **N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- SAMII, A.; NUTT, J.G. & RANSON, B.R. Parkinson's disease. **The Lancet**, **363**: 1783-1793. 2004.
- SANTPERRE, G. & FERRER, I. LRRK2 and neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, **117**: 227-246. 2009.
- SHERER, T.B.; BETARBET, R. & GREENAMYRE, J.T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. **The Neuroscientist**, **8**: 192-196. 2002.
- SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y. & TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's Disease. **Trends in Molecular Medicine**, **9**: 360-365. 2003.
- SINGLETON, A. What does PINK mean for Parkinson disease? **Neurology**, **63**:1350-1351. 2004.
- SPITZ, M. **Mutações da glicocerebrosidase em pacientes com doença de Parkinson**. Tese de Doutorado. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006. 112p.
- SPITZ, M.; ROZENBERG, R.; PEREIRA-VEIGA, L. & BARBOSA, E.R. Association between Parkinson's disease and glicocerebrosidase mutations in Brazil. **Parkinsonism & Related Disorders**, **14**: 58-62. 2007.
- TAN, E.K. The role of common genetic risk variants in Parkinson's disease. **Clinical Genetics**, **72**: 387-393. 2007.
- TOLOSA, E.; WENNING, G. & POEWE, W. The diagnosis of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, **5**: 75-86. 2006.

- UVERSKY, V.N.; LI, J. & FINK, A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. **The Journal of Biological Chemistry**, **276**: 44284-44296. 2001.
- VAN DEN EEDEN, S.K.; TANNER, C.M.; BERNSTEIN, A.L., FROSS R.D.; LEIMPETER A.; BLOCH D.A. & NELSON L.M. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, **157**: 1015-1022. 2003.
- VILA, M. & PRZEDBOSRKI, D. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Natural Medicines**, **10**: 58-62. 2004.
- WARNER, T.T. & SCHAPIRA, A.H. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. **Annals Neurology**, **53**: 16-23. 2003.
- WSZOLEK, Z. K.; PFEIFFER, B.; FULGHAM, J. R.; PARISI, J. E.; THOMPSON, B. M.; UTTI, R. J.; CALNE, D. B. & PFEIFFER, R. F. Western Nebraska family (family D) with autosomal dominant parkinsonism. **Neurology**, **45**: 502-505. 1995.
- WSZOLEK, Z.K.; PFEIFFER, R.F.; TSUBOI, Y.; UTTI, R. J.; MCCOMB, R. D.; STOESSL, A. J.; STRONGOSKY, A. J.; ZIMPRICH, A.; MULLER-MYHSOK, B.; FARRER, M. J.; GASSER, T.; CALNE, D. B. & DICKSON, D. W. Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. **Neurology**, **62**: 1619-1622. 2004.
- ZIMPRICH, A.; BISKUP, S.; LEITNER, P.; LICHTNER, P.; FARRER, M.; LINCOLN, S.; KACHERGUS, J.; HULIHAN, M.; UTTI, R.; CALNE, D.; STOESSL, A.J.; PFEIFFER, R.F.; PATENGE, N.; CARBAJAL, I.C.; VIHEREGGE, P.; ASMUS, F.; MÜLLER-MYHSOK, B.; DICKSON, D.W.; MEITINGER, T.; STROM, T.M.; WSZOLEK, Z.K. & GASSER, T. Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, **44**: 601-607. 2004.

ANEXO I

PROJETO: INVESTIGAÇÃO DE ALELOS MUTANTES NO GENE GBA EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON: RELAÇÃO COM A DOENÇA DE GAUCHER?

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que tem o objetivo investigar a ocorrência da influência de fatores genéticos em indivíduos portadores da Doença de Parkinson. A Doença de Parkinson é uma doença que ocorre, geralmente, em pessoas com mais de 50 anos e provoca problemas nos movimentos do corpo, como por exemplo, o aparecimento de tremores nas mãos e a lentidão dos movimentos voluntários. A pesquisa vai tentar identificar se esses fatores genéticos (fatores que passam de pais para filhos) estão realmente ligados ao fato do indivíduo desenvolver a Doença de Parkinson. Em uma etapa do estudo, você será submetido a uma série de perguntas sobre a situação da sua doença e sobre as suas condições de moradia e de trabalho, nos dias de hoje e no passado. Você poderá ser escolhido para participar da etapa do estudo que envolve fazer exames de sangue. Você terá total liberdade para recusar a participação nessa fase, sem problema nenhum. A coleta do sangue para os testes será feita com todo o cuidado, por pessoas treinadas e com material descartável adequado, desta forma, oferecendo riscos mínimos para sua saúde e bem estar. Através do material coletado serão realizados exames genéticos complexos afim de atingir os objetivos desta pesquisa. A finalidade desses testes é descobrir se há possivelmente a ligação entre o quadro da doença de Parkinson e a atuação de determinados fatores genéticos (como o gene *LRRK2*), e não trará nenhum benefício imediato em termos de sua cura ou melhoria do tratamento. Entretanto, a pesquisa poderá ajudar a esclarecer melhor como a doença surge e se desenvolve, e, com isso poderá contribuir para melhorar a prevenção e futuro controle da doença.

Se você aceitar participar da pesquisa, seu nome e a sua participação no estudo ficarão em total sigilo. Danos que forem, comprovadamente, provocados pela pesquisa serão reparados. Você também poderá interromper a sua participação no estudo a qualquer momento que quiser sem que haja perdas ou qualquer forma de represálias.

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto esclarecido (a) sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ___ / ___ / _____

Assinatura do participante

Assinatura do Responsável

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO II



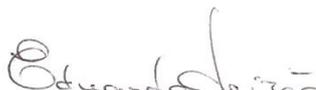
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Investigação de alelos mutantes no Gene GBA em pacientes com doença de Parkinson: relação com a doença de Gaucher?”**, protocolo nº **2547/06**, sob a responsabilidade da pesquisadora Nathália Santos Serrão de Castro e Orientação do *Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 29/09/2006, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 29 de setembro de 2006


Dr. Eduardo Leitão Maia

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa / HUIBB/UFPA