

Polimorfismos Genéticos na Doença de Parkinson e Perturbação no Controlo de Impulsos

Daniela Sant'Ana e Vasconcelos Boleixa

Dissertação de Mestrado em Ciências Forenses

2013

Polimorfismos Genéticos na Doença de Parkinson e Perturbação no Controlo de Impulsos

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências Forenses submetida à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Orientador: Professora Doutora Maria Berta de Jesus Duarte Silva

Categoria: Professor Associado

Afiliação: Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto

Co-Orientador: Professora Doutora Sara Cavaco

Categoria: Professor Afiliado

Afiliação: Centro Hospitalar do Porto – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o contributo de várias pessoas que, direta ou indiretamente, possibilitaram o seu desenvolvimento, e às quais não posso deixar de agradecer.

À Professora Doutora Teresa Magalhães, por me ter permitido ingressar neste ciclo de estudos e aprender com todos os professores que percorreram este caminho connosco.

À Professora Doutora Berta Martins da Silva, por me ter permitido integrar o seu grupo de trabalho, de forma a desenvolver o meu projeto de dissertação da melhor maneira. Pelo apoio demonstrado e pela sua disponibilidade, um obrigada!

À Professora Doutora Sara Cavaco, que permitiu que este projeto fosse concretizado, o meu obrigado por todo o seu apoio, disponibilidade, dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Alexandre, pela oportunidade que me deu de desenvolver esta investigação, que é parte integrante do seu projeto de doutoramento. Obrigada pela disponibilidade, apoio e dedicação que sempre demonstrou.

À Doutora Maria Clara Sá Miranda, por me ter acolhido no seu grupo, permitindo enriquecer este projeto com todo o seu conhecimento.

Ao Professor Doutor Paulo Pinho e Costa, pelo tempo dispensado, correções científicas e sugestões indispensáveis, muito obrigada.

À Bárbara, pela infinita paciência que teve, por todo o apoio demonstrado e por todos os conhecimentos que não hesitou em partilhar comigo, muito obrigada! Desculpa ter-te chateado tanto e ter sido a tua sombra...

À Sandra e à São, as segundas mães, por todo o carinho, apoio, bondade, simpatia, cumplicidade, proteção e boa disposição com que me acolheram!

À Cláudia e à Oriana, pelas boas pessoas que são (embora de personalidade bem vincada!), pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstraram.

À Dina, pelas suas histórias e pela alegria contagiante com que irradia o espaço que ocupa, pelo carinho, simpatia e todo o apoio com que me recebeu.

À Andreia, a mamã babada, que sempre se mostrou disponível para ajudar, pelo apoio e simpatia que sempre demonstrou.

À Joana e à Daniela, as companheiras de guerra, por sermos unidas pela mesma causa! Pelo apoio, disponibilidade, alegria, companheirismo, amizade, partilha e momentos de descontração.

Ao Daniel, pela paciência demonstrada ao longo do percurso e que me acompanhou nos momentos de maior frustração.

AGRADECIMENTOS

Ao Paulo, que, acabadinho de chegar da Holanda, pôs mãos ao trabalho, para me ajudar a conseguir a obter resultados, depois de muitos meses de trabalho.

À Doutora Paula Magalhães, que muitas vezes chateei, e que, com toda a bondade, simpatia, paciência e carinho, me aturou e animou na fase mais frustrante, quando parecia não haver muito mais a fazer.

Ao pessoal mais fixe do IBMC: à Cátia, grande jogadora; à Ana, que só come erva; à Marta, o desenho animado; à Marisa, que adora piadas secas; à Luz, a recatada; à Tânia, minha conterrânea, veterana e companheira de pampilhos e bolinhos da terra mais fixe de sempre; à Cláudia, pelos abraçinhos dados; ao Manel, a enciclopédia ambulante, que debita ciência; à Lorena, a senhora dos ratinhos, pelas suas gargalhadas; e à Fátima, pela sua serenidade. A todos, por me terem acolhido da melhor forma, fazendo com que me sentisse muito à vontade e parte do grupo, pela alegria e momentos de estupidez, bem necessários para manter a sanidade mental, um obrigada.

A toda a minha Família e amigos, pelo apoio e por acreditarem mais em mim do que eu própria.

Ao meu vovô, o meu velhote, que, por mais dificuldades que atravessasse, não deixa de apoiar os sonhos e objetivos dos netos. Porque quem menos tem é quem mais dá, tu dás sempre todo o teu coração e bondade!

À minha MÃE, que sempre fez de tudo, possível e impossível, para que eu pudesse chegar onde cheguei. Que, nos momentos mais difíceis, mostrou a grande mulher que é, apesar do seu 1,56 m de altura. Por seres a mulher mais forte que eu conheço e o melhor exemplo que eu poderia ter! Obrigada.

Ao meu irmão, o meu “piolho”, que eu adoro, por muito chatinho que seja. Por queres ser como a mana, farei de tudo para ser sempre um exemplo a seguir e nunca desiludir ninguém.

Por último, mas nunca menos importante, ao meu PAI, que nos deixou cedo demais. Cujas últimas palavras que me dirigiu foram “nunca me ensinaram a desistir e esse é o legado que te deixo”. Ao meu pai, quem eu queria ao meu lado, para me acompanhar e com quem partilhar as minhas pequenas vitórias... Para que se orgulhasse da filha que criou com os seus valores. Dizem que “uma pessoa não morre enquanto viver dentro de nós e for lembrada”... E tu és lembrado todos os dias! As saudades são muitas e, por mais tempo que passe, não diminuem...

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois da doença de Alzheimer, e afeta mais de 1% da população idosa em todo o mundo. É uma doença progressiva e crônica do sistema nervoso central, de etiologia complexa, envolvendo os gânglios da base e resultando em perturbações do movimento, do tônus muscular e da postura, que contribuem significativamente para uma qualidade de vida reduzida, uma vez que interferem com as atividades do quotidiano. A DP tem sintomas motores e não motores. A disfunção motora característica da doença é originada pela morte dos neurónios secretores de dopamina da substância negra. A dopamina é um neurotransmissor fundamental para o normal funcionamento dos circuitos dos gânglios da base e para o movimento. Havendo uma redução da atividade da dopamina no cérebro destes doentes, o tratamento clínico da DP envolve a administração de fármacos com vista a compensar esta perda, entre os quais está a L-DOPA, um precursor da dopamina. Esta terapia reduz os sintomas motores e não motores da DP, mas está associada a efeitos colaterais. Nos últimos anos, tem sido dada importância crescente à ocorrência de perturbação do controlo de impulsos e abuso da medicação dopaminérgica como uma das complicações não motoras que ocorrem na DP.

A perturbação no controlo de impulsos (PCI), um conjunto de desordens comportamentais complexas (como o vício patológico no jogo, comer compulsivamente, hipersexualidade, compras compulsivas, cleptomania, piromania e *punding*), ocorre mais frequentemente em doentes com DP do que na população em geral, tendo sido descrita uma prevalência de 13,6% nestes doentes. Possíveis fatores de risco para o desenvolvimento desta perturbação nestes doentes são o uso de agonistas da dopamina em substituição da levodopa, a idade mais precoce de início da DP, e PCI pré-existentes e/ou desordens de abuso de substâncias, ser do sexo masculino, impulsividade e depressão.

A razão pela qual algumas alterações de comportamento ocorrem apenas numa fração de doentes com DP é ainda desconhecida, mas pensa-se que poderá ser explicada, em parte, pela existência de polimorfismos genéticos no sistema dopaminérgico.

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar o papel de alguns fatores genéticos no desenvolvimento da PCI em doentes com Parkinson. Para além disto também se investigou possíveis associações genéticas com o desenvolvimento da DP. Para tal, foram analisados os polimorfismos rs6280, rs6313 e rs7301328, correspondentes a variações genéticas no gene *DRD3* do sistema dopaminérgico, no gene *HTR2A* do sistema serotoninérgico e no gene *GRIN2B* do sistema glutamatérgico, respetivamente. Adicionalmente, pesquisou-se a existência de duas mutações (N370S e L444P) do gene *GBA*, associadas à Doença de Gaucher, procurando correlações entre a sua presença e a progressão da DP ou eventual existência de alterações cognitivas nesses doentes.

Na população em estudo, não foi encontrada qualquer associação entre as variações genéticas estudadas e o desenvolvimento da Doença de Parkinson.

RESUMO

Considerando o grupo de doentes com e sem PCI, verificou-se que as variações estudadas não estão associadas ao desenvolvimento de perturbações no controlo de impulsos. Observou-se ainda que uma doença com um início mais precoce e uma dose de medicação mais elevada poderão ser fatores de risco para o desenvolvimento da PCI.

O reduzido número de indivíduos presente neste estudo torna-o limitativo e confere-lhe um baixo poder estatístico, pelo que será importante replicar este estudo, em populações mais alargadas, para o esclarecimento da importância destas variações genéticas no desenvolvimento de PCI em doentes com DP.

Um melhor conhecimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento destas complicações nos doentes com DP poderá, no âmbito forense, contribuir para esclarecer questões de atribuição ou não do estatuto de inimizabilidade a estes doentes.

ABSTRACT

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, after Alzheimer's disease, and affects over 1% of the elderly population throughout the world. It is a chronic progressive disease of the central nervous system, with complex etiology, involving the basal ganglia and resulting in movement, muscle tone and posture disorders, which will significantly reduce the quality of life, interfering with the everyday activities. The PD encompasses both motor and non-motor symptoms. The motor symptoms of Parkinson's disease result from the death of dopamine-secreting neurons in the substantia nigra. Dopamine is a neurotransmitter essential for the normal functioning of the circuits of the basal ganglia and for normal movement. The clinical treatment of PD involves the administration of drugs in order to compensate the dopamine loss, among which is L-DOPA, a precursor of dopamine. This therapy reduces symptoms of motor and non-motor PD, but is associated with diverse side effects. In recent years, growing importance has been given to the occurrence of impulse control disorder and dopaminergic drug abuse as one of the non-motor complications that occur in PD.

The impulse control disorder (ICD), a set of complex behavioral disorders (such as pathological gambling, binge eating, hypersexuality, compulsive shopping, kleptomania, pyromania, and punding), occurs most frequently in patients with PD than in the general population and has been reported a prevalence of 13.6% in these patients. Possible risk factors for the development of ICD, in these patients, are the use of dopamine agonists in substitution of levodopa, an earlier age of onset of PD, pre-existing ICD and/or substance use disorders, male gender, impulsivity and depression. The reason why ICD affects only a fraction of PD patients remains unclear but genetic factors, especially in the dopaminergic system, may be involved.

In this study, we sought to understand if there are genetic factors that contribute to the development of ICD in these patients. With this purpose, we studied the rs6280, rs6313 and rs7301328 polymorphisms, corresponding to genetic variations in the dopamine system gene *DRD3*, in the serotonergic system gene *HTR2A* and glutamatergic system gene *GRIN2B*, respectively. Additionally, we investigated the existence of two mutations (N370S and L444P) of the *GBA* gene, associated with Gaucher disease, looking for correlations between the presence and progression of PD or possible existence of cognitive impairment in these patients.

In this study, we did not find any association between the genetic variants studied and the development of Parkinson's disease. The patients group was divided in two subpopulations with and without ICD. No association between the studied variations and development of ICD was found. Additionally, we have observed that an earlier disease onset and a higher drug dose may be risk factors for the development of ICD.

The low number of individuals studied is a limitation and gives it a low statistical power, so it will be important to replicate this study in larger cohorts, to clarify the importance of these genetic variations in the development of ICD in patients with PD.

ABSTRACT

A better understanding of the factors involved in the development of these complications in patients with PD could, in forensics, contribute to clarify issues of attributing or not the status of unimputability to PD patients.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

AMPA – α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-propionato

DG – Doença de Gaucher

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxinucleótido Trifosfato

DP – Doença de Parkinson

DRD3 – recetor D3 da dopamina

DRS – *Dementia Rating Scale*

dsDNA – *double strand* DNA (DNA de cadeia dupla)

EAAT – *Excitatory Amino-Acid Transporter* (Transportadores de Aminoácidos Excitatórios)

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (ácido etilendiamina tetra-acético)

GABA – ácido γ -amino-butírico

GCase - Glucocerebrosidase

Glu – Glutamato

GRIN2B – subunidade 2B do recetor NMDA do glutamato

HRM – *High Resolution Melting* (*Melting* de Alta Resolução)

HSA-CHP – Hospital de Santo António-Centro Hospitalar do Porto

HTR2A – recetor 2A da serotonina

IC – Intervalo de Confiança

iGluR – Recetor ionotrópico do glutamato

°C – Graus Celsius

bp – pares de bases

Ca²⁺ – cálcio

KA – ácido caiânico

L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina

LIMP-2 – *Lysosomal Integral Membrane Protein Type 2* (Proteína Integrante da Membrana do Lisossoma)

mGluR – Recetor metabotrópico do glutamato

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

NMDA – N-metil-D-Aspartato

OR – *Odd Ratio*

PC – População Controlo

PCI – Perturbação no Controlo de Impulsos

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PK – População de doentes com DP

QUIP – *Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's Disease*

RCLB – *Red Cell Lysis Buffer* (tampão de lise de eritrócitos)

RE – Retículo Endoplasmático

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Base Única)

SPSS – *Statistics Package for Social Sciences*

T_m – Temperatura de *melting*

UPDRS – *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

Da – Daltons

H₂O – água

HCl – ácido clorídrico

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

K⁺ –potássio

Kb – kilo pares de bases

min – minutos

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

μL – microlitro

μM – micromolar

mV – miliVolt

Na⁺ – sódio

NaCl – cloreto de sódio

ng – nanograma

nm - nanómetro

p – significância estatística

p/v – peso/volume

χ² – Qui-Quadrado

seg – segundos

TE – Tris-EDTA

TE₂ – Tris-EDTA 2x

U – unidades

vs. – *versus*

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	VII
ABSTRACT	XI
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XV
ÍNDICE GERAL	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ÍNDICE DE TABELAS	xxiv
INTRODUÇÃO	1
1. O SISTEMA NERVOSO	3
1.1. O Neurónio	3
1.2. Neuroglia	3
1.3. Os gânglios da base	4
1.4. Transmissão do Impulso Nervoso	5
1.5. Sinapses	6
1.6. Sistemas de Neurotransmissores	7
1.6.1. Aminas biogénicas	7
1.6.1.1. Dopamina	8
1.6.1.2. Serotonina	10
1.6.2. Glutamato	12
2. A DOENÇA DE PARKINSON	14
2.1. Perturbação no controlo de impulsos	17
2.2. Polimorfismos associados à Doença de Parkinson e à Perturbação no Controlo de Impulsos	18
2.2.1. DRD3	18
2.2.2. GRIN2B	19
2.2.3. HTR2A	19
3. A DOENÇA DE GAUCHER	20
3.1. O gene da Glucocerebrosidase	23
3.2. Doença de Parkinson e Doença de Gaucher	24
OBJETIVOS	25
Objetivos Gerais:	27
Objetivos Específicos:	27
MATERIAL E MÉTODOS	29

ÍNDICE

1.	Populações em estudo	31
1.1.	População de doentes	31
1.2.	População controlo	31
2.	Estudos genéticos	31
2.1.	Estudo caso vs. controlo	31
2.2.	SNP – Single Nucleotide Polymorphism	31
3.	Procedimentos	32
3.1.	Clínicos	32
3.2.	Laboratoriais	32
3.2.1.	Amostras biológicas	33
3.2.2.	Extração de DNA	33
3.2.3.	Quantificação de DNA	34
3.2.4.	Seleção dos SNPs a analisar	34
3.2.5.	Técnicas utilizadas	34
3.2.5.1.	Real Time-PCR	35
3.2.5.2.	PCR-HRM	35
3.2.5.3.	Tecnologia <i>TaqMan</i>	38
3.2.5.4.	PCR-RFLP	40
4.	Análise Estatística	44

RESULTADOS 45

1.	SNPs e o desenvolvimento da Doença de Parkinson	47
1.1.	<i>DRD3</i> - Polimorfismo (c.25A>G) do sistema dopaminérgico na Doença de Parkinson	47
1.2.	<i>HTR2A</i> - Polimorfismo (c.102T>C) do sistema serotoninérgico na Doença de Parkinson	48
1.3.	<i>GRIN2B</i> - Polimorfismo (c.366C>G) do sistema glutamatérgico na Doença de Parkinson	48
1.4.	<i>GBA</i> - Mutações N370S (c.1226A>G) e L444P (c.1448T>C) do gene <i>GBA</i> na Doença de Parkinson	49
2.	SNPs e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos	52
2.1.	Sexo	52
2.2.	Idade	53
2.3.	Idade de início dos sintomas e duração da Doença de Parkinson	53
2.4.	PCI e Escalas de Sono/Fadiga (NMS – <i>Non Motor Symptoms</i>), Demência (DRS-2 – <i>Dementia Rating Scale II</i>), Ansiedade e Depressão (HADS)	53
2.5.	Dose de medicação e PCI	53
2.6.	Fármacos e PCI	54
2.7.	Idade de início dos sintomas e SNPs	54
2.8.	<i>DRD3</i> - Polimorfismo do sistema dopaminérgico (c.25A>G) na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos	55
2.9.	<i>HTR2A</i> - Polimorfismo do sistema serotoninérgico (c.102T>C) na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos	56
2.10.	<i>GRIN2B</i> - Polimorfismo do sistema glutamatérgico (c.366C>G) na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos	57
2.11.	<i>GBA</i> – Mutação do gene da glucocerebrosidase (N370S) na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos	58

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	59
1. SNPs e o desenvolvimento da Doença de Parkinson	61
2. Dados clínicos, SNPs e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos	62
3. Mutações da Doença de Gaucher e a sua influência na expressão clínica de doentes com Parkinson	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de um neurónio.....	3
Figura 2 - Gânglios da Base e Estruturas Cerebrais Relacionadas.....	5
Figura 3 - Distribuição cerebral de neurónios e suas projeções contendo dopamina.....	8
Figura 4 - Eventos na sinapse dopaminérgica.....	9
Figura 5 - Distribuição cerebral de neurónios e suas projeções contendo dopamina.....	10
Figura 6 - Eventos na sinapse serotoninérgica.....	11
Figura 7 - Eventos na sinapse glutamatérgica.....	13
Figura 8 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a Doença de Parkinson...	16
Figura 9 - Célula de Gaucher	21
Figura 10 - Representação do espectro da Doença de Gaucher	22
Figura 11 – Esquema do procedimento laboratorial.	32
Figura 12 - Curva dos perfis de melting obtidos por PCR-HRM.	36
Figura 13 - Metodologia de deteção de SNPs com sondas <i>TaqMan</i>	39
Figura 14 – Gel obtido para a amplificação inicial dos fragmentos.	42
Figura 15 – Gel obtido da digestão enzimática das mutações.....	43
Figura 16 – Gráfico de frequências (c.25A>G do gene <i>DRD3</i>).....	47
Figura 17 – Gráfico de frequências (c.102T>C do gene <i>HTR2A</i>).....	48
Figura 18 – Gráfico de frequências (c.366C>G do gene <i>GRIN2B</i>)	49
Figura 19 – Gráfico de frequências (mutação N370S do gene <i>GBA</i>).....	50
Figura 20 - Géis obtidos da digestão enzimática das amostras PK022 e PK092.	50
Figura 21 - Sequenciação da amostra PK022 com o primer F.....	51
Figura 22 - Sequenciação da amostra PK092 com o primer F.....	51
Figura 23 - Sequenciação da amostra PK092 com o <i>primer R</i>	52
Figura 24 – Distribuição das idades de início dos sintomas (<i>DRD3</i>) e respetivas médias.....	54
Figura 25 – Distribuição das idades de início dos sintomas (<i>HTR2A</i>) e respetivas médias.....	55
Figura 26 – Distribuição das idades de início dos sintomas (<i>GRIN2B</i>) e respetivas médias.	55
Figura 27 - Gráfico de frequências (c.25A>G do gene <i>DRD3</i>) nas subpopulações de doentes.....	56
Figura 28 – Gráfico de frequências (c.102T>C do gene <i>HTR2A</i>) nas subpopulações de doentes....	57
Figura 29 – Gráfico de frequências (c.366C>G do gene <i>GRIN2B</i>) nas subpopulações de doentes. 58	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos primers para amplificação do polimorfismo c.102T>C e tamanho do produto de PCR.....	37
Tabela 2 – Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem do polimorfismo c.102T>C por Real Time-PCR.....	37
Tabela 3 – Perfil térmico utilizado para a amplificação do polimorfismo c.102T>C, no Rotor-Gene™ 6000 Series (<i>Rcorbett</i>).....	37
Tabela 4 – Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem dos polimorfismos c.25A>G e c.366C>G pela metodologia <i>TaqMan</i>	40
Tabela 5 – Perfil térmico utilizado para amplificação dos polimorfismos c.25A>G e c.366C>G, no Rotor-Gene™ 6000 Series (<i>Rcorbett</i>).....	40
Tabela 6 - Sequência nucleotídica dos primers para amplificação dos dois SNPs e tamanho dos respectivos produtos de PCR	41
Tabela 7 - Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem da mutação c.1226A>G por PCR-RFLP	41
Tabela 8 - Reagentes da Mix usada para amplificação e genotipagem da mutação c.1448T>C por PCR-RFLP	41
Tabela 9 – Perfil térmico utilizado para amplificação das mutações c.1226A>G e c.1448T>C, no termociclador <i>MyCycler</i> (<i>Bio-Rad</i>)	42
Tabela 10 - Mastermix para a digestão enzimática para cada uma das mutações	42
Tabela 11 - Enzima de restrição e respetivo <i>buffer</i> utilizados para a digestão enzimática de cada uma das mutações	42
Tabela 12 - Padrão de restrição esperado para cada genótipo das mutações analisadas	43
Tabela 13 - Resultados médios de cada subpopulação para cada escala de avaliação.	53
Tabela 14 - Resultados dos dois doentes com a mutação N370S e valores obtidos para algumas escalas de avaliação.	58

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. O SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso, em conjunto com o sistema endócrino, controla as funções do organismo (Snell, 2010). Este complexo sistema deteta estímulos externos e internos, processa e integra esta informação (Seeley et al., 2003). Este sistema é composto essencialmente por células especializadas, cuja função é receber estímulos sensoriais e transmiti-los a órgãos efetores (que executam a função), sejam eles musculares ou glandulares. Os estímulos sensoriais que surgem quer do exterior, quer do interior do corpo, são correlacionados dentro do sistema nervoso, e os impulsos são coordenados para que os órgãos efetores funcionem harmoniosamente em conjunto para o bem-estar do indivíduo (Snell, 2010, Seeley et al., 2003).

1.1. O Neurónio

Neurónio é a designação dada à célula nervosa, a unidade funcional do sistema nervoso (figura 1). Os neurónios são células excitáveis especializadas na receção de estímulos e na transmissão do impulso nervoso. Variam em tamanho e forma, mas cada um possui corpo celular, local onde se realizam as funções metabólicas necessárias para a manutenção da célula. A partir do corpo celular são projetadas dendrites, extensões ramificadas que atuam na receção de sinais, transmitindo o impulso para o corpo celular. Do corpo celular emerge um filamento único e alongado que se ramifica na sua extremidade, o axónio, que tem a função de conduzir o impulso até outros neurónios, músculos ou glândulas.

Os neurónios são encontrados no encéfalo, espinal medula e nos gânglios das raízes posteriores da medula. Ao contrário da maioria das células no corpo, os neurónios num indivíduo maturo não sofrem divisão celular ou replicação.

Como a maioria das células, os neurónios são compostos por núcleo (onde se encontra a informação genética), citoplasma (onde se encontram os organelos celulares) e membrana plasmática, o local de iniciação e condução do impulso nervoso (Snell, 2010).

1.2. Neuroglia

Os neurónios do Sistema Nervoso Central (SNC) são sustentados por diversas variedades de células não excitáveis, que, em conjunto, são denominadas por neuroglia. As células da glia são, geralmente, mais pequenas que os neurónios e excedem o seu número em 5 a 10 vezes, compreendendo cerca de metade do volume total do encéfalo e espinal medula. Existem quatro tipos de células da glia: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e epêndima (Snell, 2010).

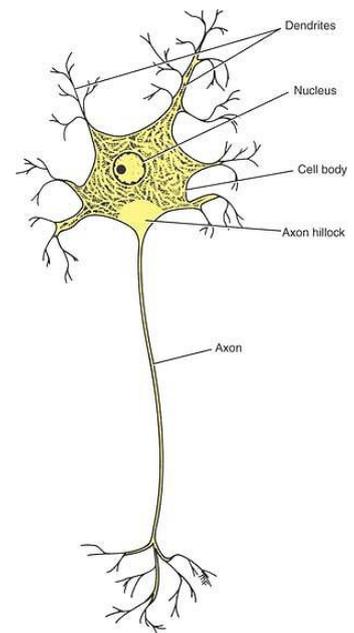


Figura 1 - Estrutura de um neurónio (Adaptado de (Snell, 2010)).

INTRODUÇÃO

Os astrócitos dividem-se em fibrosos, cujas ramificações passam entre as fibras nervosas (localizados na substância branca) e protoplasmáticos, cujas ramificações passam entre os corpos das células nervosas (localizados na substância cinzenta). Os primeiros funcionam como estrutura de sustentação das células nervosas e das fibras nervosas; atuam como isoladores elétricos, uma vez que revestem os contactos sinápticos entre neurónios, impedindo que os terminais axonais influenciem neurónios vizinhos; limitam a propagação de neurotransmissores pela formação de barreiras para a dispersão de substâncias libertadas nas sinapses; e captam excesso de iões potássio (K^+) do meio extracelular. Os segundos armazenam glicogénio no seu citoplasma; têm função fagocítica, atuando sobre terminais axonais sinápticos degenerados; após morte neuronal por doença, os astrócitos proliferam e ocupam o espaço antes ocupado pelos neurónios; conduzem metabolitos e produzem substâncias tróficas (substâncias de nutrição) que influenciam neurónios vizinhos (Snell, 2010).

Os oligodendritos têm como função a formação das bainhas de mielina em vertebrados. As células responsáveis pela sua produção no SNC são os oligodendrócitos, enquanto no Sistema Nervoso Periférico são as células de Schwann (Snell, 2010). As bainhas de mielina (compostas por 70-85% de lípidos e 15-30% de proteínas) revestem os axónios e são camadas isoladoras segmentadas nos chamados nós de Ranvier. A sua presença acelera a condução do sinal (Saladin, 2009).

A microglia encontra-se dispersa pelo SNC, sendo inativas num SNC normal. A sua importante função está relacionada com a resposta imune e a manutenção da homeostasia do SNC. No caso de doença inflamatória do SNC, tornam-se em células imunes. No local de lesão, proliferam e tornam-se células apresentadoras de antigénio; apresentam, também atividade fagocítica (Snell, 2010).

As diferentes células do epêndima estão estreitamente relacionadas com o fluido cérebroespinal (Snell, 2010).

1.3. Os gânglios da base

A designação de gânglios da base aplica-se a um conjunto de aglomerados de substância cinzenta localizados no interior de cada hemisfério cerebral (figura 2). Estão interconectados com o córtex cerebral, o tálamo e o tronco cerebral. Participam em circuitos com origem no córtex cerebral, que se projetam nos gânglios da base e, novamente, no córtex cerebral, passando pelo tálamo. Estão associados a diversas funções, como coordenação motora, postura, movimentos voluntários, cognição, emoções, memória e aprendizagem. Os principais constituintes dos gânglios da base são o estriado (núcleo caudado e putâmen) e o globo pálido. O núcleo subtalâmico e a substância negra (porção responsável pela produção de dopamina no cérebro) estão funcionalmente próximos dos gânglios da base (Snell, 2010).

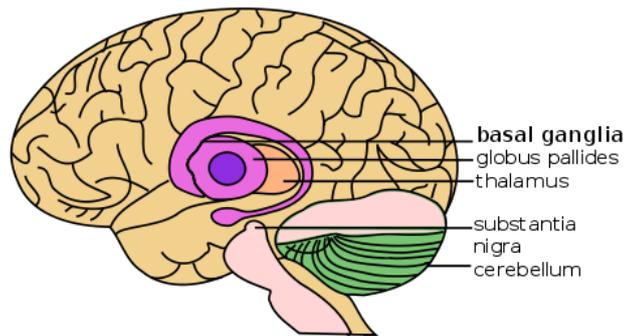


Figura 2 - Gânglios da Base e Estruturas Cerebrais Relacionadas (Adaptado de (Henkel, 1998))

Os gânglios da base têm circuitos motor, óculo-motor, associativo e límbico, sendo o circuito motor funcionalmente o melhor conhecido.

A principal via de entrada no circuito motor é constituída pelo estriado, ainda que existam, também, projeções diretamente do córtex cerebral para o núcleo subtalâmico, e a saída dos gânglios da base é constituída pelo globo pálido interno e pela substância negra reticulada, que se projetam para o tálamo motor.

A via direta (globo pálido interno e substância negra reticulada) provoca a excitação das regiões motoras do córtex, facilitando o movimento desejado, enquanto a via indireta (globo pálido externo) inibe os movimentos corticalmente induzidos, inibindo os movimentos indesejados.

1.4. Transmissão do Impulso Nervoso

A membrana plasmática e o revestimento celular formam uma membrana semipermeável que permite a difusão de certos iões, enquanto restringe outros. No estado de repouso (estado não estimulado), os iões K^+ difundem-se através da membrana plasmática do citoplasma celular para o fluido intersticial. A permeabilidade da membrana a iões K^+ é muito maior do que a iões sódio (Na^+); assim, o efluxo de K^+ é muito superior ao influxo de Na^+ . Isto resulta numa diferença de potencial constante de cerca de -80 mV, conhecido como o potencial de repouso (Snell, 2010).

Quando uma célula nervosa é excitada (estimulada) por meios elétricos, mecânicos ou químicos, ocorre uma alteração rápida na permeabilidade membranar a iões Na^+ , que difundem através da membrana plasmática para o interior do citoplasma. Tal acontecimento resulta numa despolarização progressiva da membrana. O influxo súbito de iões Na^+ seguido pela alteração da polaridade origina o chamado potencial de ação (aproximadamente +40 mV). Este potencial é breve, durando cerca de 5 mseg. A elevada permeabilidade membranar a iões Na^+ rapidamente cessa, aumentando a permeabilidade a iões

INTRODUÇÃO

K^+ . Assim, os iões K^+ começam a fluir a partir do citoplasma da célula, fazendo com que o local volte ao estado de repouso (Snell, 2010).

Uma vez gerado, o potencial de ação propaga-se pela membrana plasmática, longe do local de início, sendo conduzido ao longo dos axónios como um impulso nervoso. Este impulso auto-propaga-se, e a sua amplitude e frequência não se alteram (Snell, 2010). Nas regiões mielinizadas, o sinal propaga-se rapidamente por difusão de Na^+ ao longo da parte intracelular da membrana, mas vai perdendo a sua força ao longo do tempo; em cada nó de Ranvier, novos potenciais de ação ocorrem, retardando o sinal, mas restaurando a força do sinal, num processo de “condução saltatória”, pois o sinal salta de nó em nó (Saladin, 2009). Uma vez propagado sobre uma determinada região da membrana plasmática, um outro potencial de ação não pode ser imediatamente induzido. A duração deste estado não excitável refere-se ao período refratário, e controla a frequência máxima a que os potenciais de ação podem ser conduzidos ao longo da membrana plasmática (Snell, 2010). Quanto maior a força do estímulo inicial, maior é a despolarização inicial e maior será a propagação do impulso às áreas circundantes da membrana plasmática (Snell, 2010).

1.5. Sinapses

O sistema nervoso consiste num número elevado de neurónios ligados entre si, de modo a formar vias de condução do estímulo. O local de contacto entre dois neurónios vizinhos, o neurónio pré-sináptico e o neurónio pós-sináptico, para que haja transmissão de informação, denomina-se sinapse. A comunicação numa sinapse, em condições fisiológicas, é unidirecional. O tipo mais comum de transmissão sináptica ocorre entre o axónio de um neurónio e a dendrite ou corpo celular de outro neurónio.

Existem dois tipos de sinapse: a química e a elétrica. Quando os neurónios comunicam apenas por potenciais de ação, designa-se por sinapse elétrica. Este tipo de sinapse apenas produz ações de curta duração, sendo mais rápida quando comparada com as sinapses químicas (Mader, 2004). As sinapses químicas representam a maioria das sinapses que ocorre no sistema nervoso. Neste tipo de transmissão, não existe um contacto direto entre os neurónios envolvidos, uma vez que entre eles existe a fenda sináptica, um espaço estreito de 20 a 30 nm de largura onde os axónios dos neurónios pré-sinápticos libertam substâncias químicas – os neurotransmissores –, que se vão ligar a uma molécula proteica na membrana pós-sináptica – o recetor –, estimulando-a ou inibindo-a (Snell, 2010, Kandel et al., 2000).

Os neurónios contêm muitas pequenas vesículas pré-sinápticas preenchidas com moléculas de neurotransmissores (Snell, 2010). Todos os neurotransmissores são libertados dos seus terminais nervosos quando um potencial de ação atinge as extremidades axonais pré-sinápticas. Isto resulta na abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}), o que provoca um aumento da concentração do ião no terminal pré-sináptico. Este fenómeno desencadeia a fusão das vesículas sinápticas com a membrana celular do neurónio pré-sináptico e o neurotransmissor é libertado para o fluido extracelular na fenda sináptica por um processo de exocitose

(Snell, 2010, Kandel et al., 2000). Uma vez neste local, o neurotransmissor difunde-se através da fenda em direção à membrana pós-sináptica, onde se vai ligar a recetores específicos na membrana do neurónio pós-sináptico. Esta ligação vai aumentar ou reduzir o potencial de repouso da membrana pós-sináptica por um curto período de tempo.

A interação entre os neurotransmissores e os recetores presentes na célula pós-sináptica desencadeia diferentes reações, dependendo do tipo de recetores: ionotrópicos e metabotrópicos. Ao ligarem os neurotransmissores, os recetores ionotrópicos sofrem uma alteração conformacional imediata, que provoca a abertura de canais iónicos, promovendo o movimento de iões através da membrana e gerando um impulso elétrico que é conduzido ao longo desse neurónio para uma posterior sinapse; a resposta é direta e rápida (Snell, 2010, Kandel et al., 2000). Outros recetores, os metabotrópicos, ligam o neurotransmissor e ativam um sistema de mensageiro secundário através de um transdutor molecular, uma proteína G, gerando uma resposta química, mais duradoura que a elétrica (Snell, 2010, Saladin, 2009).

A maioria dos neurónios produz e liberta apenas um transmissor principal em todos os seus terminais, como é exemplo a dopamina, libertada por neurónios da substância negra, enquanto a acetilcolina é utilizada em diferentes neurónios nas regiões central e periférica do sistema nervoso (Snell, 2010). Substâncias como a acetilcolina, norepinefrina, epinefrina, dopamina, glicina, serotonina, GABA (ácido γ -amino-butírico) e glutamato atuam como neurotransmissores (Snell, 2010). Nem todos eles atuam da mesma forma: enquanto uns excitam o sistema nervoso (excitatórios), outros inibem-no (inibitórios). O efeito produzido no neurónio pós-sináptico depende apenas das propriedades dos seus recetores. Para alguns neurotransmissores (como o glutamato), os recetores principais possuem efeitos excitatórios, ou seja, aumentam a probabilidade de a célula-alvo desencadear um potencial de ação. Para outros neurotransmissores (como o GABA), os principais recetores possuem efeitos inibitórios. No entanto, existem outros neurotransmissores (como a acetilcolina) que possuem os dois tipos de recetores.

1.6. Sistemas de Neurotransmissores

1.6.1. Aminas biogénicas

Transmissores de aminas biogénicas regulam diversas funções cerebrais, estando, também, ativas no Sistema Nervoso Periférico. Uma vez que as aminas biogénicas estão implicadas numa vasta gama de comportamentos (desde funções homeostáticas centrais até fenómenos cognitivos, como a atenção), não surpreende que deficiências na função destas moléculas se encontrem implicadas na maioria das desordens psiquiátricas (Purves et al., 2008).

Existem cinco neurotransmissores de aminas biogénicas bem estabelecidos: a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina (catecolaminas), a histamina e a serotonina. Todas as catecolaminas derivam do mesmo precursor – a tirosina, um aminoácido.

INTRODUÇÃO

1.6.1.1. Dopamina

A dopamina está presente em várias regiões cerebrais (figura 3), embora a área cerebral com maior conteúdo de dopamina seja o corpo estriado, que recebe maior fluxo da substância negra e desempenha um papel essencial na coordenação de movimentos corporais.

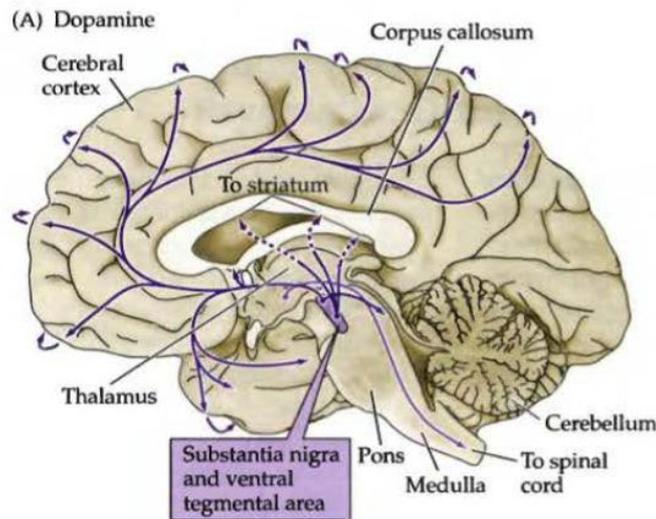


Figura 3 - Distribuição cerebral de neurónios e suas projeções contendo dopamina (Adaptado de (Purves et al., 2008)).

A dopamina é um importante neurotransmissor, produzido pelos neurónios dopaminérgicos na substância negra, cuja cor é conferida pela existência do pigmento neuromelanina que contêm. (Leentjens, 2004, Sienkiewicz-Jarosz et al., 2005). Estes neurónios atuam no cérebro, promovendo, entre outros efeitos, a sensação de prazer e a sensação de motivação, tendo um papel importante no chamado sistema de recompensa e vício (Leentjens, 2004, Sienkiewicz-Jarosz et al., 2005, Purves et al., 2008), que medeia os efeitos de recompensa de comida, água, jogo, sexo e drogas de abuso (Sienkiewicz-Jarosz et al., 2005). Este neurotransmissor é um precursor natural da adrenalina e da noradrenalina e, por conseguinte, tem como função a atividade estimulante do SNC. Comprometendo estas estruturas, o risco de depressão ver-se-ia aumentado (Leentjens, 2004).

Como a dopamina não tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, a sua síntese ocorre através da remoção de um grupo carboxilo do seu precursor, a L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), formada a partir da tirosina, um aminoácido. Uma vez no SNC, esta molécula lipófila é convertida em dopamina pela enzima DOPA descarboxilase, reação que exige a presença da vitamina B6, um co-fator. Após a síntese da amina no citoplasma dos terminais pré-sinápticos, a dopamina é armazenada em vesículas sinápticas. A sua ação na fenda sináptica é cessada pela sua recaptação nos terminais nervosos ou células da glia circundantes por um transportador da dopamina dependente de Na^+ (Purves et al., 2008) (figura 4).

A dopamina é fundamental para o normal funcionamento dos gânglios da base. A dopamina tem efeito pré-sináptico no estriado, que consiste em facilitar as projeções corticais para o estriado mais ativas, e inibir as projeções do córtex para o estriado menos ativas. Tem, também, o efeito de estimular os recetores D1 e inibir os recetores D2.

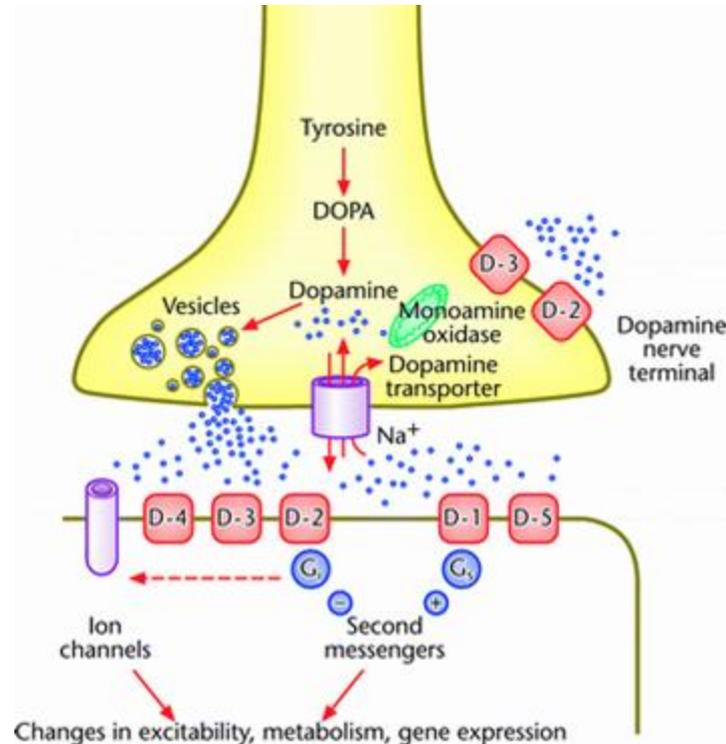


Figura 4 - Eventos na sinapse dopaminérgica
(fonte: http://www.ibibiobase.com/projects/db-drd4/drd4_synthesis.htm)

Como a maioria das substâncias ativas biologicamente, a dopamina, uma vez libertada na fenda sináptica, exerce os seus efeitos por ligação e ativação de recetores localizados na superfície das células. Em mamíferos, foram identificados cinco subtipos de recetores metabotrópicos da dopamina: D1, D2, D3, D4 e D5, sendo classificados segundo critérios anatómicos, farmacológicos e bioquímicos. Mais detalhadamente, os recetores da dopamina em mamíferos podem ser divididos em duas famílias: *D1-like* (recetores D1 e D5) e *D2-like* (recetores D2, D3 e D4). Os primeiros podem ter função excitatória, por abertura de canais de sódio, ou inibitória, via abertura de canais de potássio. No estriado, uma população de neurónios que expressa recetores D1 da dopamina projeta-se diretamente no globo pálido interno e na substância negra reticulada, constituindo a via direta (Siegel and Sapru, 2011). Já os *D2-like* têm, normalmente, uma função inibitória no neurónio alvo. No estriado, uma população de neurónios que expressa recetores D2 da dopamina projeta-se no globo pálido externo e participa na via indireta (Siegel and Sapru, 2011).

Consequentemente, pode-se descrever a dopamina como excitatória ou inibitória, dependendo do tipo de recetores se encontram na membrana do neurónio alvo. Os recetores D1 são os mais abundantes

INTRODUÇÃO

no SNC seguidos dos recetores D2; os recetores D3, D4 e D5 estão presentes em níveis significativamente mais baixos (Ferro and Pimentel, 2006, McNamara, 2011).

O recetor D3 da dopamina é uma proteína codificada pelo gene *DRD3*, nos humanos. Este recetor inibe a adenil-ciclase através de proteínas G inibitórias e é expresso em regiões cerebrais filogeneticamente mais velhas, sugerindo que desempenha um papel em funções cognitivas e emocionais (EntrezGene, 2013a).

1.6.1.2. Serotonina

Descrito pela primeira vez há mais de 60 anos, o sistema serotoninérgico desempenha um importante papel na modulação da atividade neuronal, estando implicado em vários processos fisiológicos essenciais para a perceção e avaliação do meio e para a capacidade de resposta aos estímulos ambientais. A serotonina parece ter diversas funções, como a regulação dos mecanismos de ansiedade, do humor, do ciclo sono-vigília e a resposta endocrinológica e motora ao *stress* e à dor (Ferro and Pimentel, 2006, Serretti et al., 2006).

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é encontrada primeiramente em grupos de neurónios na região da rafe que se projetam para outras regiões do cérebro (figura 5) (Purves et al., 2008).

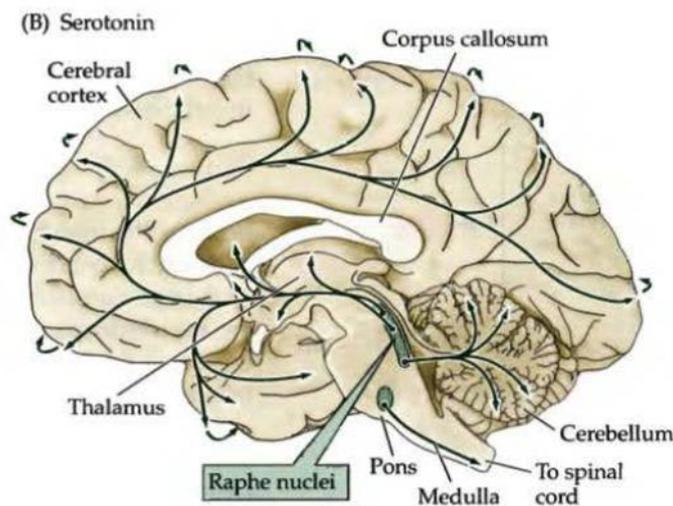


Figura 5 - Distribuição cerebral de neurónios e suas projeções contendo dopamina (Adaptado de (Purves et al., 2008))

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, requisito essencial da dieta alimentar. O triptofano é captado para o interior dos neurónios por um transportador membranar e é hidroxilado numa reação catalisada pela enzima triptofano-5-hidroxilase, um passo limitante para a síntese de serotonina (Purves et al., 2008). Esta é, de seguida, armazenada em vesículas sinápticas e posteriormente libertada na fenda sináptica, sempre que haja um estímulo do neurónio. A serotonina libertada no processo de neurotransmissão apresenta várias vias de atuação. (a) Liga-se aos seus recetores pós-sinápticos,

induzindo a transmissão de sinais; (b) Liga-se aos receptores pré-sinápticos, induzindo o feedback que regula a plasticidade do neurônio; (c) é recapturada da fenda para o neurônio pré-sináptico, através do transportador de serotonina sendo depois reaproveitada ou metabolizada pela monoamina oxidase (figura 6).

Um elevado número de receptores da 5-HT foram identificados. Das 7 subfamílias de receptores serotoninérgicos atualmente conhecidas (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) todos os subtipos (**5-HT₁**: 1A, 1B, 1D, 1E, 1F; **5-HT₂**: 2A, 2B, 2C; **5-HT₃**; **5-HT₄**, **5-HT₅**: 5A, 5B; **5-HT₆** e **5-HT₇**) são codificados por diferentes genes e têm padrões de distribuição distintos no SNC.

Estes receptores encontram-se localizados nas membranas sinápticas e controlam o fluxo de elétrons de forma a regular a resposta neuronal de excitação ou inibição. Alguns subtipos de receptores, como 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, estão também localizados pré-sinápticamente, onde funcionam como auto-receptores, atenuando o impulso neuronal e inibindo a liberação de 5-HT quando da sua ativação (Landolt and Wehrle, 2009).

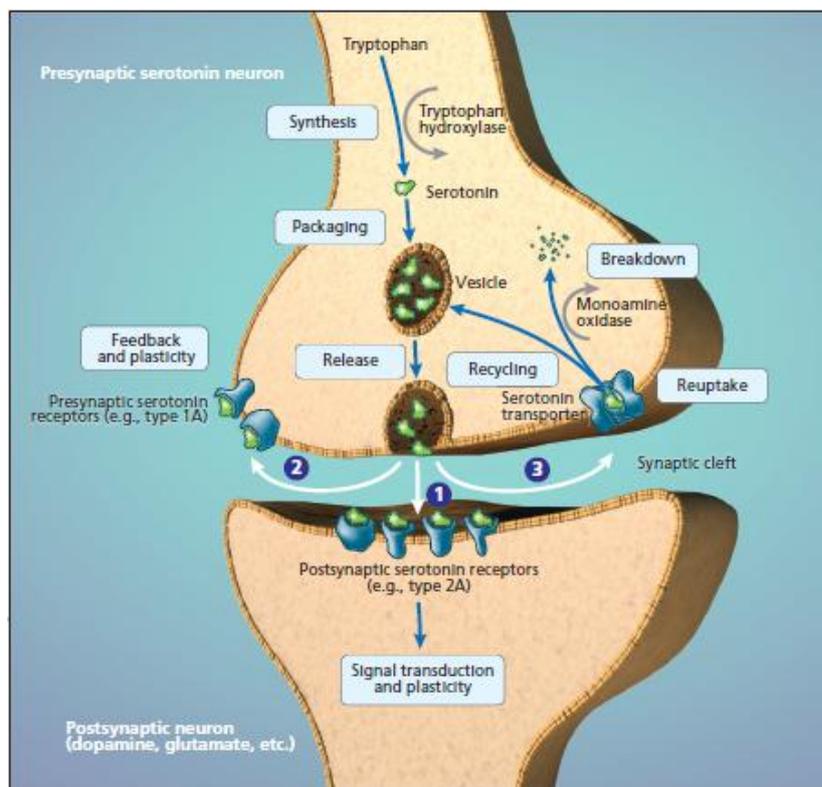


Figura 6 - Eventos na sinapse serotoninérgica (Adaptado de (aan het Rot et al., 2009))

Comprometimentos na função destes receptores têm sido implicados em diversas desordens psiquiátricas, como a depressão, desordens de ansiedade e esquizofrenia. Fármacos que atuam sobre os receptores da serotonina são terapêuticos efetivas para muitas destas condições, uma vez que controlam a ação da serotonina como neurotransmissor (Purves et al., 2008). Em geral, os indivíduos deprimidos têm níveis baixos de serotonina no SNC (Ferro and Pimentel, 2006). Neste caso, devem-se administrar inibidores

INTRODUÇÃO

da recaptação de serotonina pelos neurónios, resultando numa maior disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica. Como a serotonina tem a capacidade de inibir a libertação de dopamina estriatal, uma redução da atividade serotoninérgica é vista como um mecanismo funcional de compensação para a baixa disponibilidade de dopamina no corpo estriado (Leentjens, 2004).

1.6.2. Glutamato

O glutamato (Glu) é o neurotransmissor excitatório mais importante na função cerebral normal dos mamíferos. Quase todos os neurónios excitatórios (70%) no SNC são glutamatérgicos, e estima-se que mais de metade das sinapses cerebrais liberta esta substância (Purves et al., 2008). Este neurotransmissor desempenha um importante papel na manutenção de aspetos funcionais do cérebro, como a cognição, aprendizagem, memória e controlo motor (Bakiri et al., 2009). Além disso, é, ainda, fundamental no desenvolvimento do SNC, em fenómenos como a indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (Platt, 2007).

O glutamato é um aminoácido não essencial incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, necessita de ser sintetizado nos neurónios a partir de precursores locais. O precursor mais abundante para a síntese do glutamato é a glutamina, libertada pelas células da glia. Uma vez libertada, a glutamina é captada pelos terminais pré-sinápticos e metabolizada pela enzima mitocondrial glutaminase em glutamato, que vai ser armazenado em vesículas sinápticas (Purves et al., 2008).

Quando ocorre a despolarização dos terminais sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra armazenado nas vesículas sinápticas é libertado para a fenda sináptica, onde irá ativar os seus recetores, que estão localizados nas membranas pré- e pós-sinápticas neuronais, bem como nas membranas das células da glia (Danbolt, 2001, Purves et al., 2008). O glutamato é captado por transportadores localizados nas células da glia (EAATs, *Excitatory Amino-Acid Transporters* ou transportadores de aminoácidos excitatórios) que possuem a função de cessar o sinal excitatório através da recaptação do glutamato que se encontra na fenda sináptica. Quando captado por estes transportadores, o glutamato é reconvertido em glutamina (pela enzima glutamina sintetase), que, por sua vez, vai ser transportada para o exterior das células da glia e para o interior dos terminais nervosos. Desta forma, os terminais sinápticos e as células da glia cooperam entre si para a manutenção dos níveis de glutamato. Esta sequência de eventos denomina-se ciclo glutamato-glutamina (Purves et al., 2008) (figura 7).

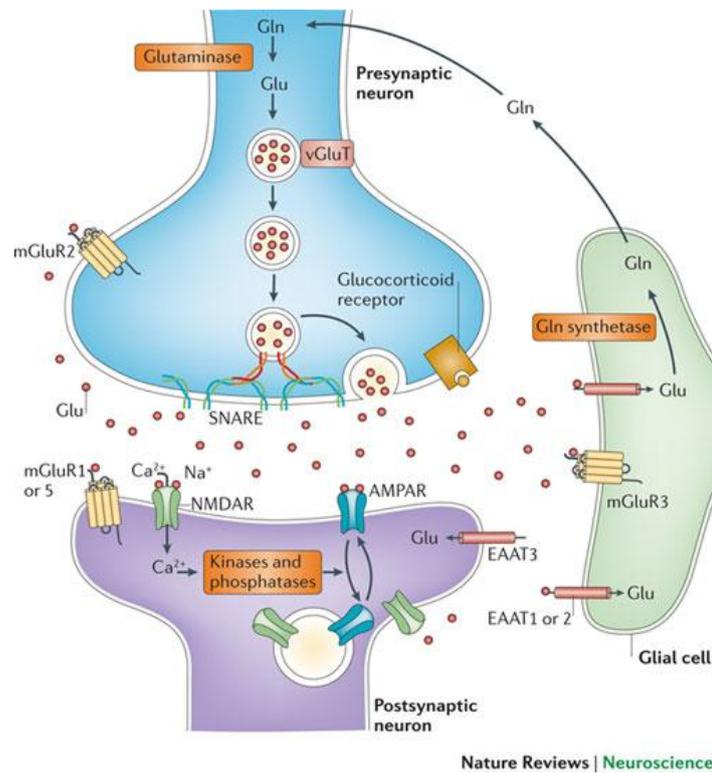


Figura 7 - Eventos na sinapse glutamatérgica (Adaptado de (Popoli et al., 2012))

O efeito do glutamato é mediado por receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os receptores ionotrópicos são classificados em três subtipos, de acordo com os agonistas que os ativam: receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA), receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato (AMPA) e receptores de ácido caixênico (KA) (Kew and Kemp, 2005, Platt, 2007, Purves et al., 2008). Todos os receptores de glutamato ionotrópicos são canais catiónicos não-seletivos, permitindo a passagem de Na^+ e K^+ (Purves et al., 2008). De todos os receptores, os NMDA são os que possuem maior afinidade para o glutamato. Este tipo de receptores tem elevada permeabilidade ao Ca^{2+} e baixa permeabilidade aos iões Na^+ e K^+ (Purves et al., 2008, Bressan et al., 2003). A neurotransmissão mediada por este recetor ocorre lentamente por um período de tempo prolongado, sendo, por isso, fundamental para fenômenos neurofisiológicos complexos, como a memória e a aprendizagem (Bressan et al., 2003).

Quanto aos receptores metabotrópicos, são conhecidos 8 tipos de receptores, subdivididos em três grupos. Estes receptores, que modulam canais iônicos pós-sinápticos indiretamente, diferem nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal e na sua sensibilidade a agentes farmacológicos (Ferraguti and Shigemoto, 2006, Purves et al., 2008). Estes receptores desencadeiam respostas pós-sinápticas mais lentas, que tanto podem aumentar como diminuir a excitabilidade das células pós-sinápticas (Purves et al., 2008).

O glutamato desempenha um papel especialmente importante na neurologia clínica, uma vez que concentrações elevadas de glutamato extracelular, libertado como resultado de uma lesão cerebral, são

INTRODUÇÃO

tóxicas para os neurónios (Purves et al., 2008). Este excesso de glutamato também pode resultar de uma disfunção do ciclo glutamato-glutamina.

Os transportadores do glutamato são essenciais na proteção celular, uma vez que evitam a acumulação de glutamato no meio extracelular. Porém, sob certas condições, como insuficiência na captação de glutamato ou despolarização prolongada da terminação nervosa, o glutamato pode acumular-se na fenda sináptica e desencadear um processo excitotóxico. Durante este processo, ocorre uma ativação excessiva dos recetores glutamatérgicos nas células pós-sinápticas, levando a uma consequente entrada de iões Na^+ e Ca^{2+} , principalmente por ação dos recetores NMDA (Waring, 2005). Esta hiperativação desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, como a ativação de enzimas líticas mediadas pelo Ca^{2+} , formação de radicais livres e lesão mitocondrial, levando à lise e morte celular (Forder and Tymianski, 2009, Barbosa et al., 2006).

Lesões em algumas regiões cerebrais e deficiências nos sistemas de neurotransmissores dão origem às mais variadas patologias, como é exemplo a Doença de Parkinson, em que a substância negra está afetada, bem como os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico.

2. A DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico James Parkinson (Parkinson, 2002), é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois da doença de Alzheimer, e afeta mais de 1% da população mais idosa em todo o mundo (Aarsland et al., 2012, Mosley et al., 2012, Nakabayashi et al., 2008, McNamara, 2011). É uma doença progressiva e crónica do sistema nervoso, de etiologia complexa, envolvendo os gânglios da base e resultando em perturbações do movimento, do tónus muscular e da postura (Nakabayashi et al., 2008), que contribuem significativamente para uma qualidade de vida reduzida, uma vez que interferem com as atividades do quotidiano (Dissanayaka et al., 2011, Kano et al., 2011). A DP engloba tanto sintomas motores como não motores. Os sintomas não motores incluem disfunção autonómica, perda do olfato, dor, distúrbios do humor, problemas de sono e comprometimento cognitivo, bem como depressão, apatia, ansiedade e ataques de pânico, alucinações e psicose (McNamara, 2011, Schapira, 2011). As manifestações motoras desta doença incluem tremor, bradicinesia (movimentos lentos), perda de reflexos posturais e rigidez (Barrero et al., 2005, Tom and Cummings, 1998, Wolters et al., 2008). O tremor designa-se por tremor de repouso, pois está presente quando o indivíduo não está a realizar qualquer movimento. O doente apresenta um tremor que geralmente começa nos membros superiores e, mais raramente, nos inferiores. Nos estádios precoces da doença, o tremor é inconstante e torna-se mais evidente nas situações de *stress* físico ou emocional (Ferro and Pimentel, 2006, McNamara, 2011, Schapira, 2011). A bradicinesia é a diminuição da velocidade e da amplitude do movimento (Ferro and Pimentel, 2006), manifestando-se em diversas formas, como um caminhar lento, uma redução na

frequência do pestanejar (McNamara, 2011, Schapira, 2011) e perda da expressão facial (Schapira, 2011). A rigidez consiste no aumento do tônus muscular, sentida pelo observador como uma resistência aumentada durante os movimentos passivos. Muitas vezes, a rigidez é assimétrica, sendo um elemento importante no diagnóstico da DP (Ferro and Pimentel, 2006, McNamara, 2011, Schapira, 2011). Já a instabilidade postural revela-se pela dificuldade de equilíbrio e pela ocorrência de quedas frequentes; ocorre em fases mais avançadas da doença (Ferro and Pimentel, 2006, McNamara, 2011, Schapira, 2011).

Os sintomas resultam da degeneração e morte celular dos neurónios dopaminérgicos na substância negra (Ferro and Pimentel, 2006, Tom and Cummings, 1998). De uma perspectiva neurológica, as principais características desta patologia são a perda destes neurónios e a presença de inclusões citoplasmáticas conhecidas como corpos de Lewy, cujo maior componente é uma proteína denominada α -sinucleína. A α -sinucleína é uma pequena proteína lipofílica abundante no sangue e altamente expressa no SNC (Ruiperez et al., 2010), e pensa-se que estará envolvida com as vesículas pré-sinápticas de neurotransmissores no cérebro (Goldin, 2010) e com a manutenção da integridade da membrana celular. A degradação proteica é realizada pelo sistema ubiquitina-proteossoma; porém, a ubiquitinação e a degradação da α -sinucleína não ocorre neste sistema, o que leva à sua acumulação em corpos de Lewy (Schapira, 2011). Agregados de α -sinucleína estão associados com doenças cerebrais resultantes do aumento da idade (Goldin, 2010).

A DP existe nas formas familiar (5-10% dos casos), que possui uma base hereditária, e idiopática, que se aplica a doentes sem uma causa evidente para a doença (Schapira, 2011).

A etiologia da doença ainda não está esclarecida, mas propõe-se que tanto fatores genéticos como ambientais estejam na sua origem (Schapira, 2011, Ferro and Pimentel, 2006). Relativamente à predisposição genética, foram encontradas algumas formas familiares atribuídas a diferentes mutações genéticas. As mutações com hereditariedade autossómica recessiva mais frequentes são as dos genes PARK 2 e 6, e com hereditariedade autossómica dominante as do gene PARK 8, sendo conhecidas outras mutações que constituem uma causa rara de doença de Parkinson. Foi encontrado que a presença de mutações em heterozigotia no gene da glucocerebrosidase constituem um importante risco para o aparecimento da doença de Parkinson. A maioria dos casos de doença de Parkinson é, no entanto, idiopática. Quanto aos fatores ambientais, em 1982 foi identificado um grupo de indivíduos que utilizava a heroína sintética MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) e que vieram a desenvolver um quadro de parkinsonismo. A substância foi identificada como o agente causador. Acompanhados clinicamente, verificou-se que o quadro evoluiu de forma idêntica à que ocorre na DP, provocando lesões cerebrais idênticas às da DP idiopática. Uma vez que a molécula é muito semelhante à molécula do paraquato (muito utilizado na composição de alguns herbicidas e pesticidas), a hipótese tóxica ambiental foi reforçada (Ferro and Pimentel, 2006, Schapira, 2011). A hipótese bioquímica também foi proposta, uma vez que estudos bioquímicos levaram à identificação de disfunção mitocondrial e *stress* oxidativo como importantes componentes da patogénese da doença; a inflamação e o processamento proteico foram reconhecidos

INTRODUÇÃO

como contribuidores para a perda neuronal. A descoberta de mutações na α -sinucleína como causa da DP e a sua importância na composição dos corpos de Lewy focou a atenção para a agregação proteica como contribuidor da DP (Schapira, 2011).

Embora a causa da DP seja vista como uma cascata multifatorial de eventos, a evidência mais proeminente aponta o *stress oxidativo*, decréscimos na função mitocondrial, mau processamento ou agregação proteica e excitotoxicidade como potenciais fatores causadores, e a morte celular programada como a primeira forma de morte celular na DP (Caudle and Zhang, 2009, Schapira, 2011).

Sendo uma doença neurodegenerativa e progressiva, na DP há morte dos neurónios secretores de dopamina na substância negra, presente na base do mesencéfalo, que têm importantes projeções para o estriado, onde a presença de dopamina é fundamental para o normal funcionamento dos circuitos dos gânglios da base e para o movimento normal.

Quando está diminuída (figura 8), como na Doença de Parkinson, a via direta está menos ativa e a via indireta está hiperativa, o que leva à inibição do tálamo motor, que, por sua vez, não facilita o movimento iniciado pelo córtex.

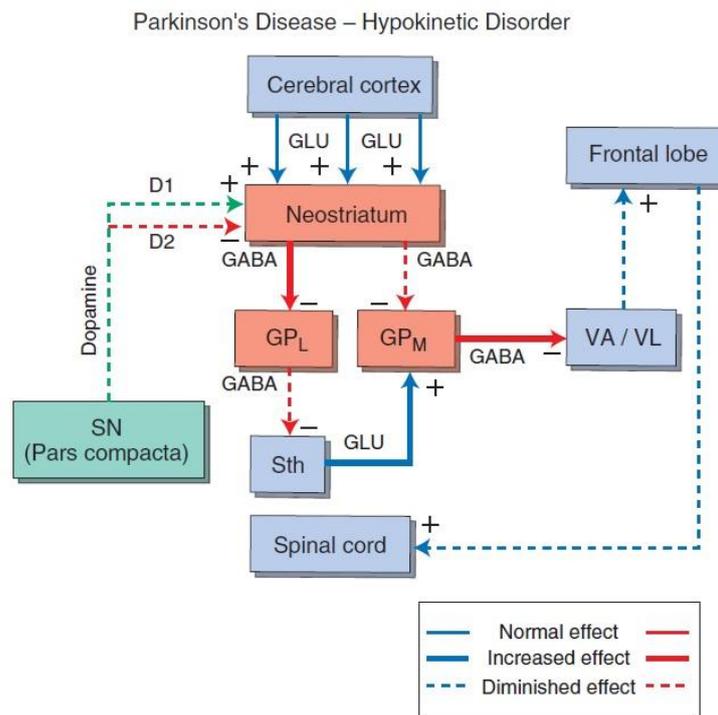


Figura 8 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a Doença de Parkinson. A vermelho estão as vias inibitórias (usam o GABA como neurotransmissor) e a azul estão as vias excitatórias (usam o glutamato como neurotransmissor) (Adaptado de (Siegel and Sapru, 2011)).

Uma vez que os neurónios dopaminérgicos da substância negra degeneram, levam a uma disfunção motora característica da doença (Purves et al., 2008) e a uma diminuição dos níveis da dopamina no cérebro. De facto, em estudos *post mortem*, observou-se que, em indivíduos com DP, a substância negra

perdia a sua pigmentação escura (apresentava palidez) como resultado da morte das suas células nervosas, enquanto a de um indivíduo saudável se apresentava sem alterações (Ferro and Pimentel, 2006).

Assim, havendo uma redução da atividade da dopamina no cérebro destes doentes, o tratamento clínico da DP envolve a administração de fármacos com vista a compensar esta perda, referidos como terapia de substituição de dopamina (Ambermoon et al., 2011). Entre eles está a L-DOPA, um precursor da dopamina (Ambermoon et al., 2011).

Esta terapia reduz os sintomas motores e não motores da DP, mas está associada a efeitos colaterais motores e não motores (Ambermoon et al., 2011). Nos últimos anos, tem sido dada importância crescente à ocorrência de perturbação do controlo de impulsos e abuso da medicação dopaminérgica (Ambermoon et al., 2011, Cilia et al., 2011) como uma das complicações não motoras que ocorrem na DP (Merims and Giladi, 2008, Weintraub, 2008, Weintraub, 2009, Wolters et al., 2008).

2.1. Perturbação no controlo de impulsos

Na DP, o sistema de recompensa e vício está comprometido. A degeneração do sistema dopaminérgico, em conjunto com uma exposição de longa duração a fármacos dopaminérgicos, provoca um mau funcionamento do sistema de recompensa, que se pode manifestar como adição à L-DOPA e distúrbios comportamentais associados ao sistema de controlo de impulsos (Merims and Giladi, 2008). A perturbação no controlo de impulsos (PCI), um conjunto de desordens comportamentais complexas, ocorre mais vulgarmente em doentes com DP do que na população em geral (Vilas et al., 2012), tendo sido descrita uma prevalência de 13,6% nestes doentes (Vilas et al., 2012, Voon et al., 2011). Esta perturbação é definida como um insucesso ou incapacidade em resistir a um impulso, força ou tentação de executar um ato que é prejudicial à pessoa ou aos outros (Ambermoon et al., 2011, Katzenschlager, 2011, Vilas et al., 2012, Wolters et al., 2008, van den Heuvel et al., 2010) devido à sua natureza excessiva (Weintraub, 2008). São exemplos o vício patológico no jogo (Ambermoon et al., 2011, Cilia et al., 2011, Katzenschlager, 2011), comer compulsivamente, hipersexualidade, compras compulsivas (Ambermoon et al., 2011, Katzenschlager, 2011, Merims and Giladi, 2008, Vilas et al., 2012, Weintraub, 2008, Weintraub, 2009, Wolters et al., 2008), cleptomania (Brewer and Potenza, 2008), piromania (van den Heuvel et al., 2010) e *punding* (Djamshidian et al., 2011, Katzenschlager, 2011, Vilas et al., 2012). O problema do jogo é caracterizado por uma preocupação em jogar, com o aumento das quantias de dinheiro, tentativas sem sucesso de controlar ou parar de jogar e na persistência destes comportamentos apesar dos impactos negativos na vida do doente (Ambermoon et al., 2011). O aumento da severidade do vício no jogo foi associado com uma disfunção progressiva em áreas cerebrais envolvidas na estimativa de riscos e inibição de comportamentos de procura de recompensa (Cilia et al., 2011). Quanto à hipersexualidade, os pacientes manifestam uma preocupação acrescida com pensamentos sexuais, fazendo demasiadas exigências por sexo aos parceiros, um acrescido uso de pornografia, procurando prostitutas, enveredando pelo exibicionismo e parafilia, uma líbido

INTRODUÇÃO

aumentada e aumento na frequência de ereção (Ambermoon et al., 2011, Merims and Giladi, 2008). Comer compulsivamente envolve comer quantidades de comida maiores do que as necessárias para aliviar a fome, resultando frequentemente num ganho de peso prejudicial, podendo também incluir compulsão alimentar (um consumo impulsivo de grandes quantidades de carbo-hidratos ou alimentos ricos em gordura num curto período de tempo). Comprar compulsivamente pode ser definido como fazer compras excessivas incontroláveis de bens, que podem levar a uma angústia psicológica e endividamento substancial (Ambermoon et al., 2011). O *punding* é definido como comportamentos estereotipados e repetitivos, incluindo uma fascinação intensa, inapropriada e não produtiva por objetos comuns com movimentos sem sentido, como manipulações de equipamento técnico: recolha, reparação e/ou desmontagem (relógios e rádios), contínua organização de objetos comuns (rochas), passatempos excessivos tais como o uso interminável do computador e da *internet*, condução sem sentido, limpeza e lavagem, e jardinagem (Djamshidian et al., 2011, Weintraub, 2008, Weintraub, 2009, Wolters et al., 2008).

2.2. Polimorfismos associados à Doença de Parkinson e à Perturbação no Controlo de Impulsos

Possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos em doentes com Doença de Parkinson são o uso de agonistas da dopamina em substituição da levodopa, a idade mais precoce de início da DP, e PCI pré-existentes e/ou desordens de uso de substâncias, ser do sexo masculino, impulsividade e depressão (Brewer and Potenza, 2008, Merims and Giladi, 2008, Vilas et al., 2012, Wolters et al., 2008).

O porquê de algumas alterações de comportamento ocorrerem apenas numa fração – 13,6% – de doentes com DP poderá ser explicado pela existência de polimorfismos genéticos no sistema dopaminérgico, que predis põem o doente às propriedades aditivas do fármaco, tornando-o mais suscetível a essas alterações comportamentais. Uma administração crónica de fármacos dopaminérgicos em pacientes com um sistema de recompensa anormal pode aumentar o risco de ocorrências destas alterações (Merims and Giladi, 2008).

2.2.1. DRD3

O gene *DRD3* está localizado no cromossoma 3q13.3 e é composto por 8 exões, possuindo um comprimento total de mais de 70 kb e codifica uma proteína, o recetor D3 da dopamina, que é encontrado no cérebro. Esta proteína responde ao neurotransmissor dopamina para despoletar sinais no sistema nervoso, incluindo sinais envolvidos na produção de movimentos físicos (Reference, 2013).

Neste gene, existe uma variação de base única, o polimorfismo c.25A>G (rs6280). Este é um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) *missense*, que provoca uma alteração na sequência do codão, originando uma substituição aminoacídica de uma serina para uma glicina (p.S9G). Esta alteração pode resultar numa proteína não funcional. Assim, a afinidade de ligação do recetor à dopamina pode estar afetada (Lee et al.,

2009). Foi descrito que a variante p.S9G (genótipo AA) confere baixa afinidade de ligação do recetor à dopamina, que permanece livre na fenda sináptica, reduzindo, então, a possibilidade da propagação do estímulo nervoso. Assim, sistema de recompensa e vício fica comprometido, podendo esta variante ter um efeito sinérgico nas consequências das alterações neurodegenerativas no circuito mesocorticolímbico (Lee et al., 2009).

2.2.2. GRIN2B

O gene que codifica a subunidade 2B do recetor NMDA do glutamato (*GRIN2B*) (Lee et al., 2009) está localizado no cromossoma 12p12 e é composto por 13 exões, possuindo um comprimento total de mais de 419 kb.

Neste gene, existe a variante alélica c.366C>G (rs7301328), localizada no exão 2, que corresponde a um SNP silencioso, não ocorrendo qualquer modificação na sequência aminoacídica do recetor.

Estes recetores são uma classe de recetores de glutamato ionotrópicos, envolvidos na mediação da morte celular excitotóxica por glutamato, e cujo canal parece estar envolvido numa potenciação a longo-termo. Esta potenciação a longo-termo é um aumento da transmissão de sinal, de longa duração, entre dois neurónios, que resulta da sua estimulação de forma síncrona. Este aumento parece estar envolvido na eficiência da transmissão sináptica, que se pensa estar na base de certos tipos de memória e aprendizagem (EntrezGene, 2013b, Cooke and Bliss, 2006).

Relativamente à subunidade 2B do recetor NMDA, sugere-se que antagonistas da mesma podem fornecer neuroprotecção, uma vez que a sua administração crónica mostrou reduzir a neurodegeneração. Assim, propõe-se que a ativação de recetores NMDA contribui para a neurodegeneração na DP, e que o bloqueio destes recetores pode ser uma estratégia terapêutica por abrandar a neurodegeneração em doentes com DP (Johnson et al., 2009).

2.2.3. HTR2A

O gene que codifica este recetor está localizado no cromossoma 13q14-q21 e é composto por 3 exões, possuindo um comprimento total de mais de 65 kb. O *HTR2A* possui dois polimorfismos de base única (SNPs), o c.-1438G>A e o c.102 T>C, com potencial associação a várias doenças neuropsiquiátricas (Costa et al., 2007).

O polimorfismo c.102T>C (rs6313) é um SNP silencioso (não ocorre qualquer modificação na sequência aminoacídica do recetor), localizado no exão 1, perto da região promotora. Esta localização pode influenciar a estrutura secundária do transcrito, alterando a sua estabilidade e atividade traducional. A metilação do nucleótido C tem sido proposta como um eventual mecanismo de bloqueio/redução da expressão do gene (Clifford and Nunez, 1996).

INTRODUÇÃO

Em relação a este sistema neurotransmissor, Lee *et al.* (Lee et al., 2012) estudaram o papel da variante c.102T>C do gene do recetor 2A da serotonina (*HTR2A*) (rs6313) no desenvolvimento de PCI em indivíduos com doses baixas de fármacos dopaminérgicos. Foi reportado por outros autores que o alelo T está relacionado com uma maior expressão do recetor, aumentando a sua atividade, e encontra-se associado ao controlo do impulso e comportamentos repetitivos na DP. No estudo de Lee *et al.*, embora os resultados não tenham sido consistentes para todo o grupo com DP, sugere-se que esta variante genética pode ter um efeito gene-dosagem significativo em pacientes com uma toma baixa de dose de equivalente de levodopa, havendo um risco maior nos portadores CT e TT. Os autores mostraram, ainda, que o *HTR2A* pode ser um gene de suscetibilidade genética para o desenvolvimento de PCI na população de doentes de Parkinson que apresentava ausência de um efeito de dosagem alta (Lee et al., 2012).

Embora na população de doentes com DP estes casos sejam pouco frequentes, tem interesse serem estudados, pois quando ocorrem são devastadores para a sua vida e a das suas famílias. Assim, a relevância deste projeto no âmbito forense prende-se com a questão da atribuição de inimizabilidade a doentes de Parkinson com perturbações no controlo de impulsos, uma vez que estes não têm qualquer controlo sobre os seus atos impulsivos, mesmo tendo consciência do que é correto ou errado.

Para além dos SNPs até agora referidos, muitas vezes associada ao parkinsonismo está a Doença de Gaucher.

3. A DOENÇA DE GAUCHER

Os lisossomas são organelos de dupla membrana, que possuem no seu interior várias enzimas hidrolíticas solúveis que controlam a digestão intracelular de macromoléculas (Alberts et al., 2008). Estão envolvidos em vários mecanismos biológicos, incluindo endocitose, fagocitose e autofagia (Dehay et al., 2013). Os lisossomas contêm cerca de 40 tipos de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases. Para uma atividade ótima, as hidrolases requerem um meio ácido, que o lisossoma providencia ao possuir um pH de 4,5-5,0 no seu interior. Assim, a dupla membrana do lisossoma e o seu pH ácido, protegem o organismo das suas enzimas lisossomais hidrolíticas, uma vez que não atuam a um pH citosólico de 7,2 (Alberts et al., 2008, Schroder et al., 2007).

A deficiência em qualquer uma destas enzimas resulta na acumulação de substrato não degradado, originando uma doença lisossomal de sobrecarga.

Sendo nos lisossomas o local onde ocorre a degradação proteica (Yap et al., 2011), é, também, aí que a α -sinucleína é degradada (Aharon-Peretz et al., 2005, Dehay et al., 2013).

A Doença de Gaucher (DG) é a mais comum das doenças lisossomais de sobrecarga (Almeida Mdo, 2012, Neumann et al., 2009, Sidransky, 2004). É uma doença autossômica recessiva, causada por mutações no gene *GBA*, mapeado no cromossoma 1q21 (Aharon-Peretz et al., 2005, Almeida Mdo, 2012, Neumann et al., 2009), de que resulta a deficiência da enzima lisossomal glucocerebrosidase (GCase) (Aharon-Peretz et al., 2005, Almeida Mdo, 2012, Lesage et al., 2011, Neumann et al., 2009, Sidransky, 2004), que é responsável pela degradação da glucosilceramida em glucose e ceramida (Almeida Mdo, 2012, Sidransky, 2004, Yap et al., 2011).

A 16 kb a jusante do gene *GBA*, existe uma sequência com 96% de homologia com a sequência exónica (Almeida Mdo, 2012, Neumann et al., 2009) do gene *GBA*, denominado de pseudogene (Sidransky, 2004), que foi descrito e caracterizado por Horowitz *et al*, em 1989 (Horowitz et al., 1989).

Na DG, verifica-se a acumulação do substrato da enzima lisossomal GCase no lisossoma, a glucosilceramida, nomeadamente nos macrófagos/monócitos, baço, fígado e neurónios (Aharon-Peretz et al., 2005, Neumann et al., 2009). Os macrófagos, células resultantes da diferenciação de monócitos, têm a capacidade de atravessar os tecidos (diapedese) e de fagocitar microrganismos, substâncias estranhas e tecido danificado (Mader, 2004). Estes acumulam glucosilceramida (daí a DG ser referida como uma doença de armazenamento), verificando-se um aumento de volume e originando as denominadas “células de Gaucher” (figura 9); conseqüentemente, os órgãos onde estão presentes também aumentam de volume, fenómeno denominado por organomegalia.

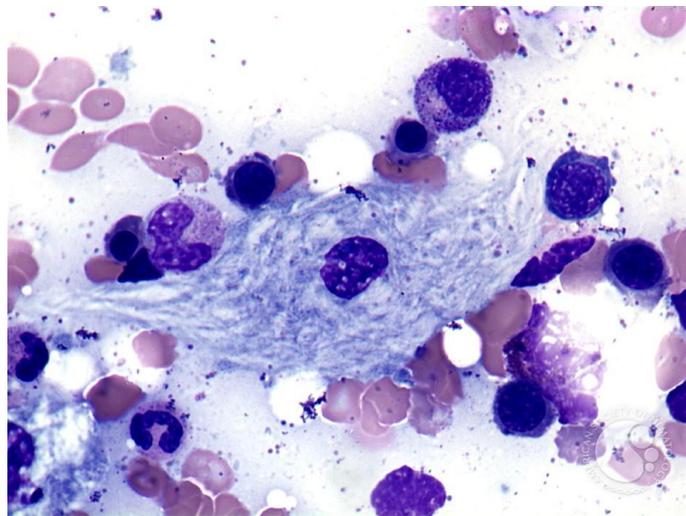


Figura 9 - Célula de Gaucher: célula de volume aumentado devido à acumulação de glicolipidos (glucocerebroside).
(fonte: <http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1169&AssetType=Image>)

Como principais sintomas da DG destaca-se o cansaço, a apatia relacionada com a anemia, hemorragia nasal, fraturas espontâneas, aumento do fígado e do baço, fibrose e dor abdominal.

A DG divide-se em três tipos, de acordo com a ausência (tipo 1) ou presença (tipos 2 e 3) de manifestações neurológicas e a sua taxa de progressão (Lesage et al., 2011, Sidransky, 2004), sendo altamente variável e correlacionada com a atividade enzimática residual (Neumann et al., 2009) (figura 10).

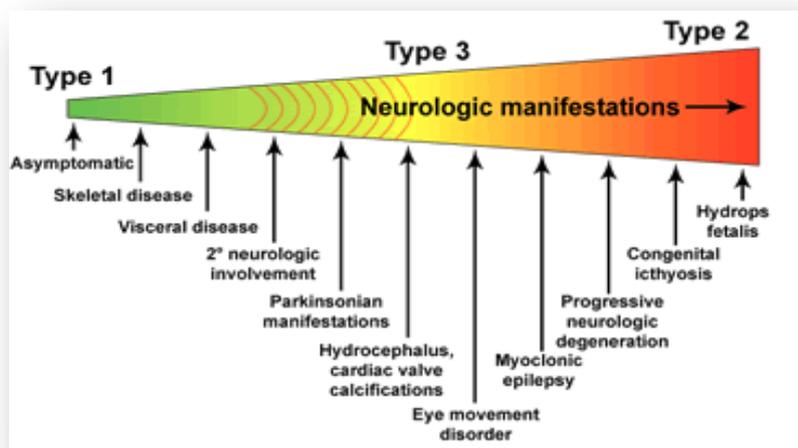


Figura 10 - Representação do espectro da Doença de Gaucher (fonte: <http://www.childrensgaucher.org/about-gaucher/gaucher-basics/>)

A DG do tipo 1 (ou forma adulta) é de início tardio e não apresenta envolvimento neurológico. Neste tipo, existe uma atividade enzimática residual suficiente para prevenir a acumulação elevada de glucosilceramida nas células, exceto nos macrófagos, que estão sujeitos a uma sobrecarga maior de glucosilceramida, devido ao seu papel na fagocitose; estes macrófagos “carregados” de lípidos (células de Gaucher) infiltram-se no fígado, baço e medula óssea, e os pacientes podem apresentar esplenomegalia e enfarte ósseo (Almeida Mdo, 2012, Neumann et al., 2009).

A DG do tipo 2 (ou forma infantil) tem início na infância, e é a forma mais severa, onde há acumulação de glucosilceramida numa variedade de tipos de células, incluindo neurónios, o que leva rapidamente a uma doença neurodegenerativa fatal (Neumann et al., 2009). A idade de morte pode variar entre as 48h e os 5 anos de idade.

A DG do tipo 3 (ou forma juvenil) tende a progredir mais lentamente do que a do tipo 2, e aparece, geralmente, na adolescência. Os indivíduos afetados podem sobreviver até aos seus 30 anos (Almeida Mdo, 2012).

A maioria das enzimas lisossomais é endereçada para o lisossoma via manose-6-fosfato. No entanto, o mesmo não acontece com a enzima lisossomal GCCase, que é transportada para o lisossoma através de uma proteína integrante da membrana do lisossoma, a LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein Type 2*) (Reczek et al., 2007). A interação entre as duas proteínas é muito mais forte em pH neutro do que em pH ácido, tipicamente encontrado nos lisossomas. Assim, a LIMP-2 liga-se à GCCase no retículo endoplasmático (RE), transportando a enzima até ao lisossoma, onde o pH ácido favorece a dissociação do complexo (Balreira et al., 2008). A ausência desta proteína em ratinhos *LIMP-2 knockout* causa alterações urinárias e neurológicas, como obstrução da junção pélvica uretérica, surdez e neuropatia periférica (Reczek et al., 2007). No entanto, observaram-se diferenças específicas de tecido, tanto ao nível da atividade da GCCase como ao nível da acumulação do seu substrato, a glucosilceramida: foram encontrados níveis

aumentados do glicolípido no fígado e nos pulmões dos ratinhos deficientes em LIMP-2, não tendo sido encontrados níveis anormais no baço, rim ou cérebro (Balreira et al., 2008).

Resumindo, uma deficiência no transportador da GCase resulta numa diminuição da enzima no lisossoma, levando a uma redução da sua atividade em algumas células; já uma deficiência na própria enzima GCase resulta numa diminuição da sua atividade no lisossoma de todas as células. Apesar de os fenótipos serem distintos, qualquer uma das deficiências vai originar uma deficiência em GCase, embora com consequências menos severas no caso do transportador LIMP-2. Tal fenómeno sugere que uma certa quantidade da GCase chega ao lisossoma de algumas células mesmo na ausência de LIMP-2 por um mecanismo ainda não identificado, ou indiretamente, por endocitose (Balreira et al., 2008).

3.1. O gene da Glucocerebrosidase

Como referido anteriormente, o gene *GBA* codifica a enzima GCase, uma proteína associada à membrana lisossomal (Van Weely et al., 1988), constituída por 497 resíduos e 59700 Da (Yap et al., 2011).

Na DG, mutações no gene *GBA* resultam numa enzima deficiente por inatividade, conformação errada e/ou incapacidade de esta chegar ao lisossoma, levando à acumulação de glucosilceramida dentro dos lisossomas (Aharon-Peretz et al., 2005, Neumann et al., 2009).

Até à data, estão descritas cerca de 300 mutações do gene *GBA*, cujas frequências variam de acordo com a etnia (Almeida Mdo, 2012). Mutações no gene *GBA* incluem mutações pontuais, inserções, deleções, mudanças de *frameshift*, alterações no local de *splice* e alelos recombinantes (Velayati et al., 2010). No entanto, as mutações mais comuns são a N370S e a L444P. A mutação N370S está associada exclusivamente à DG tipo 1, de grau moderado, e representa cerca de 70% dos alelos mutantes (Sidransky et al., 2009). Localiza-se no exão 9 e é caracterizada pela troca de uma adenina por uma guanina na posição 1226 da região codificante do gene funcional (c.1226A>G; posição 5841A>G do DNA genómico; OMIM 606463.0003). Já a mutação L444P em homozigotia está associada às formas neurológicas (tipos 2 e 3) (Alcalay et al., 2012). Esta localiza-se no exão 10 e é caracterizada pela troca de uma timina por uma citosina na posição 1448 da região codificante do gene funcional (c.1448T>C; posição 6433T>C do DNA genómico; OMIM 606463.0001).

Vários estudos sugerem uma estreita ligação entre a atividade da GCase e a acumulação de α -sinucleína (Dehay et al., 2013, Schapira and Gegg, 2013).

Yap *et al* propuseram uma ligação física entre a enzima GCase e a α -sinucleína no lisossoma. Quando mutada, a GCase pode contribuir para a agregação aberrante da α -sinucleína e aumentar os níveis intracelulares da mesma. Mutações no gene *GBA* podem resultar na ausência da enzima, numa enzima instável marcada para degradação, ou numa enzima estável com atividade reduzida. Todas as formas mutadas da enzima estão associadas a um risco aumentado de DP (Yap et al., 2011). Duas teorias, de ganho ou perda de função, foram propostas: a GCase pode contribuir para a agregação de α -sinucleína através de

INTRODUÇÃO

um aumento da agregação proteica (ganho de função) ou como consequência da deficiência na própria GCase (perda de função) (Velayati et al., 2010, Yap et al., 2011). A acumulação de enzimas mutantes com conformação incorreta pode contribuir para a patogênese da DP por comprometer a função lisossomal (Yap et al., 2011). Assim, a enzima GCase pode interferir com vias celulares relacionadas com a eliminação da α -sinucleína celular (Neumann et al., 2009). Uma alteração dos mecanismos essenciais de degradação pode resultar num desequilíbrio da homeostasia da α -sinucleína, promovendo a sua agregação (Yap et al., 2011) e acumulação celular, dando origem a patologias de corpos de Lewy (Lesage et al., 2011), resultando em manifestações parkinsonianas. Tendo isto em conta, os resultados implicam que uma interação α -sinucleína-glucocerebrosidase alterada no lisossoma pode promover a progressão da DP (Yap et al., 2011).

3.2. Doença de Parkinson e Doença de Gaucher

Nos últimos 17 anos, vários autores reportaram associações entre a DP e mutações do gene *GBA* (Anheim et al., 2012, Choi et al., 2012, Goker-Alpan et al., 2004, Goker-Alpan et al., 2010, Halperin et al., 2006, Lwin et al., 2004, Sidransky et al., 2009).

Sidransky *et al* (2009) (Sidransky et al., 2009), num estudo multicêntrico internacional de 5691 casos de DP (dos quais 780 eram judeus Ashkenazi) e 4898 controlos (dos quais 387 eram judeus Ashkenazi), verificaram que 6,9% dos doentes com doença de Parkinson possuíam mutações (de perda de função) no gene *GBA* vs. 1,3% na população controlo (Risco Relativo=5).

Em 2011, Lesage *et al* (Lesage et al., 2011) analisaram a frequência de várias mutações do gene *GBA*, entre as quais a N370S e a L444P, em três subgrupos: 1) 786 doentes com DP de 525 famílias não relacionadas, 2) 605 doentes com DP esporádica e 3) 391 controlos. Na totalidade dos doentes com DP, foi observada que a frequência de mutações no gene *GBA* foi de 6,7% vs. 1% na população controlo. Estas frequências são idênticas às descritas por Sidransky *et al* (Sidransky et al., 2009). Relativamente aos doentes com DP familiar, a frequência observada foi de 8,4% vs. 5,3% nos casos esporádicos. As mutações N370S e L444P representaram 70% das mutações encontradas.

Desde 1996, tem sido reportado que doentes portadores de mutações do gene *GBA* apresentam uma forma de DP mais severa e precoce (Brockmann et al., 2011, Clark et al., 2007, Neudorfer et al., 1996, Neumann et al., 2009).

Estudos recentes encontraram que doentes com DP e portadores destas mutações apresentam mais frequentemente alterações cognitivas e demência (Alcalay et al., 2012, Brockmann et al., 2011, Goker-Alpan et al., 2008, Neumann et al., 2009), bem como maior frequência de depressão, apatia e ansiedade (Brockmann et al., 2011). No estudo conduzido por Alcalay *et al* em 33 indivíduos com DP e mutações do gene *GBA*, e 60 indivíduos com DP e sem mutações no gene *GBA*, observou-se que os indivíduos com DP e mutações apresentam maior risco de comprometimento cognitivo moderado ou demência (Alcalay et al., 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Explorar o papel de polimorfismos genéticos dos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgico e glutamatérgico no desenvolvimento da Doença de Parkinson e características clínicas.

Analisar a associação de algumas variáveis clínicas e demográficas no grupo de doentes com o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos.

Explorar o papel de polimorfismos genéticos dos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgico e glutamatérgico no desenvolvimento da perturbação do controlo de impulsos na Doença de Parkinson.

Estudar a frequência das mutações N370S e L444P do gene *GBA* numa série de doentes com DP, comparando com frequências já descritas. Procurar correlações entre a presença dessas mutações e a progressão da DP ou eventual existência de alterações cognitivas nesses doentes.

Objetivos Específicos:

1 – Analisar a associação entre variantes alélicas do gene *DRD3* e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos num grupo de doentes com doença de Parkinson.

Hipótese: O *odds ratio* de ter perturbação no controlo de impulsos na DP é superior em doentes com as variantes alélicas *DRD3* p.S9G, controlando para a dose de equivalente de L-DOPA e para o uso de agonistas dopaminérgicos.

2 – Analisar a associação entre variantes alélicas do gene *HTR2A* e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos num grupo de doentes com doença de Parkinson.

Hipótese: O *odds ratio* de ter perturbação no controlo de impulsos na DP é superior em doentes com as variantes alélicas *HTR2A* c.102T>C, controlando para a dose de equivalente de L-DOPA e para o uso de agonistas dopaminérgicos.

3 – Analisar a associação entre variantes alélicas do gene *GRIN2B* e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos num grupo de doentes com doença de Parkinson.

Hipótese: O *odds ratio* de ter perturbação no controlo de impulsos na DP é superior em doentes com as variantes alélicas *GRIN2B* c.366C>G, controlando para a dose de equivalente de L-DOPA e para o uso de agonistas dopaminérgicos.

4 – Analisar a associação entre as mutações N370S e L444P do gene *GBA* com a progressão da DP e com a existência de alterações cognitivas nesses doentes.

Hipótese: O *odds ratio* de ter uma DP com progressão mais rápida ou de ter alterações cognitivas é superior em doentes com as mutações N370S e/ou L444P.

OBJETIVOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Populações em estudo

1.1. População de doentes

Foram estudados 100 doentes (50F, 50M; idade=68±10,1 anos (36 – 89 anos)) com diagnóstico de Doença de Parkinson de acordo com os critérios do *UK PD Society Brain Bank*. Os doentes fazem parte de um estudo transversal que está a decorrer com doentes com doença de Parkinson da consulta de Doenças do Movimento do Hospital de Santo António-Centro Hospitalar do Porto (HSA-CHP), sendo estudadas as primeiras 100 amostras biológicas recebidas no ICBAS.

1.2. População controlo

Como população controlo foi utilizado um conjunto de 100 a 274 indivíduos (170F, 104M; idade=38±13 anos (17 – 67)) sem doença neurológica conhecida, da mesma etnia que a população de doentes em estudo, e provenientes da mesma região geográfica.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Porto e todos os indivíduos deram consentimento informado.

2. Estudos genéticos

2.1. Estudo caso vs. controlo

No presente trabalho, foi feito um estudo de associação caso-controlo. Neste tipo de estudos, o objetivo é avaliar se determinadas variantes genéticas são mais frequentes num determinado grupo.

2.2. SNP – Single Nucleotide Polymorphism

Todos os seres humanos são praticamente idênticos a nível genético, e o conjunto completo de genes da sequência do nosso DNA (*Deoxyribonucleic Acid*; ácido desoxirribonucleico) são essencialmente os mesmos. Alterações na sequência de DNA vão originar diferenças entre indivíduos, permitindo diferenciá-los uns dos outros. Podem ser mutações ou polimorfismos. Os polimorfismos são definidos como variações genéticas que estão presentes na população numa frequência superior a 1%, enquanto variações na sequência de DNA presentes numa frequência inferior a 1% são denominadas mutações (Costa et al., 2007, Mamotte, 2006).

Os polimorfismos mais frequentes que ocorrem no genoma humano são os chamados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), caracterizados pela alteração de um único nucleótido e podem ocorrer em qualquer região do genoma.

3. Procedimentos

3.1. Clínicos

De cada doente, além das informações e avaliações que fazem parte de estudo do HSA-CHP, foram colhidos os dados demográficos, a idade de início e a duração da doença, a medicação que o doente está a fazer. Foi feita avaliação dos doentes com a *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) I a IV, sendo a parte motora (UPDRS III) feita com o doente sem medicação desde a véspera e, novamente, após o efeito da primeira toma da medicação matinal habitual do doente. Foi realizada avaliação cognitiva (utilizadas as escalas: *Dementia Rating Scale – II*, *Fluência Verbal Categórica*, *Fluência Verbal Literal*, *Wisconsin Card Sorting Test*, *Trail Making Test*) e foi feito um questionário sobre perda de controlo de impulsos (*Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in PD*, QUIP-RS). A avaliação motora foi realizada por dois neurologistas com experiência na Doença de Parkinson e a avaliação cognitiva por duas neuropsicólogas com experiência na avaliação de doentes com Doença de Parkinson.

3.2. Laboratoriais

O procedimento laboratorial realizado neste estudo está sumariado na figura 11, sendo cada etapa apresentada em detalhe ao longo deste capítulo.

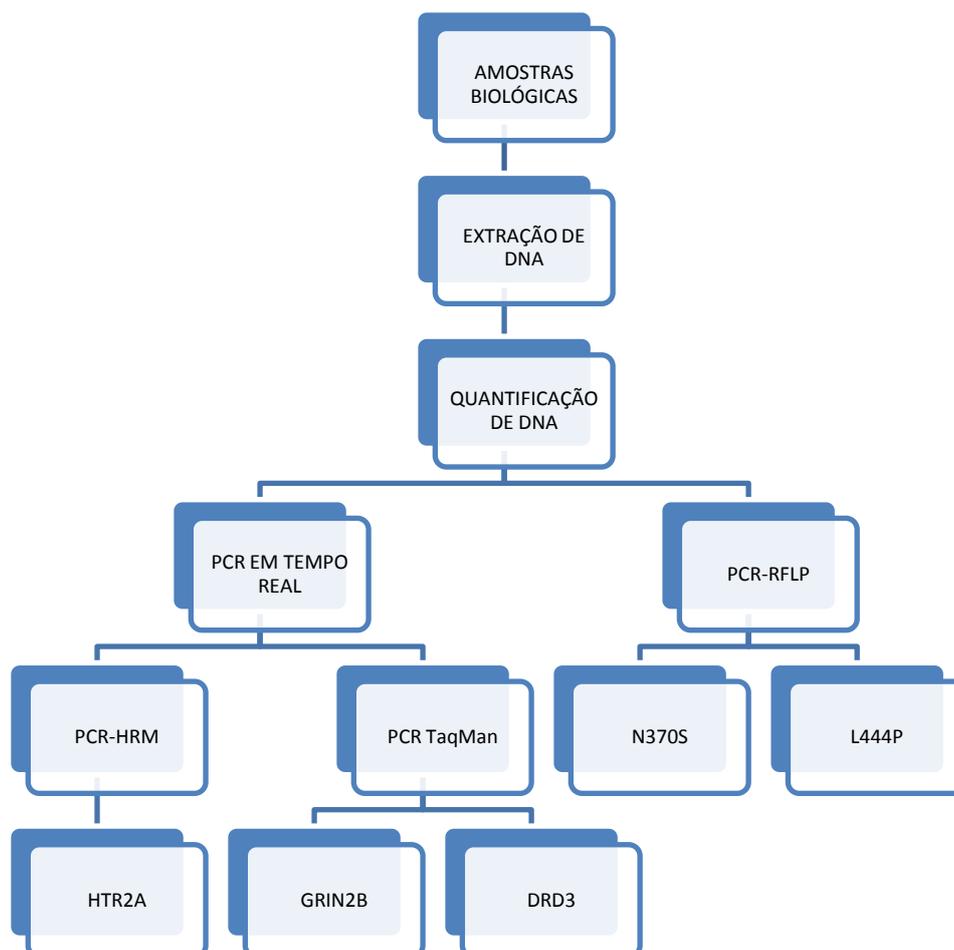


Figura 11 - Esquema representativo do procedimento laboratorial realizado ao longo do estudo.

3.2.1. Amostras biológicas

A cada indivíduo estudado, foram recolhidos 10 mL de sangue periférico através de punção venosa, para tubos de colheita *Vacutainer*, já preparados com 1 mL de anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilendiamina tetra-acético) 5%.

3.2.2. Extração de DNA

O DNA genómico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, utilizando uma modificação do método clássico de “salting out”, descrito por Miller *et al.*, em 1988 (Miller *et al.*, 1988). Este método, baseado na baixa solubilidade das proteínas na presença de elevadas concentrações de sais, permite a extração de um grande quantidade de DNA, revelando-se uma importante vantagem sempre que se pretende armazenar e conservar o DNA.

A primeira etapa consistiu em isolar as células mononucleares (leucócitos), centrifugando as amostras de sangue a 490 g, durante 10 minutos, usando a centrífuga Universal 30F (*Hettich Zentrifugen*). Após centrifugação, obteve-se uma fase celular constituída por eritrócitos e *buffy coat* (anel de leucócitos), e uma fase líquida, correspondente ao plasma. Retirou-se o plasma e o *buffy coat* (com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo *Falcon* de 50 mL, aos quais se adicionou RCLB (*Red Cell Lysis Buffer* – tampão de lise de eritrócitos que contém 1M de Tris-HCl a pH 7.2, 5M de NaCl e 1M de MgCl₂) a uma temperatura ambiente, até perfazer o volume de 50 mL, para lisar os eritrócitos; homogeneizou-se a solução por inversão e incubou-se durante 10 minutos à temperatura. Posteriormente, procedeu-se a uma centrifugação a 828 g, durante 10 minutos, a 4°C, usando a centrífuga Heraeus Megafuge 16R (*Thermo Scientific*), para separar os componentes em duas fases distintas – uma sólida e uma líquida. Rejeitou-se o sobrenadante (composto por glóbulos vermelhos e outros componentes celulares) e o *pellet* de leucócitos obtido foi submetido a novas lavagens com RCLB frio (4°C) e consecutivas centrifugações (com os mesmos parâmetros), até se obter um *pellet* completamente branco e um sobrenadante completamente límpido. Na fase seguinte, adicionaram-se ao *pellet* 3,5 mL de tampão TE₂ (Tris-EDTA 2x – tampão com 1M de Tris-HCl a pH 7.2, 5M de NaCl e 0.5M de EDTA) e 200 µL de SDS 10% (*Sodium Dodecyl Sulfate*, um detergente que promove a lise da membrana celular, possibilitando a libertação do DNA e das proteínas intracelulares). Após agitação no vórtex, adicionaram-se 10 µL da enzima Proteinase K (50 mg/mL), cuja função é degradar as proteínas presentes na solução, impedindo que haja atividade metabólica.

Após este passo, a amostra foi incubada de um dia para o outro num banho-maria a 42°C, com uma agitação lenta, promovendo a digestão enzimática sobre as células lisadas. Uma vez digerida, a amostra foi transferida para um tubo cónico de 15 mL, ao qual se adicionou 1 mL de NaCl (Cloreto de Sódio) 6M. Este tampão salino tem maior afinidade para a água do que para as proteínas, precipitando-as. Assim, as proteínas são separadas do DNA, que é libertado para a solução. Depois de agitada vigorosamente no vórtex, a solução foi submetida a uma agitação lenta num oscilador (*Stuart Scientific – Platform Shaker STR6*), durante 15 minutos, até que a mistura apresentasse um aspeto leitoso, resultante da precipitação

MATERIAL E MÉTODOS

proteica. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 1923 g, durante 30 minutos, a 23°C (usando a centrífuga da Heraeus Megafuge 16R), permitindo separar o sobrenadante, que continha o DNA, do precipitado de proteínas. Assim, transferiu-se o sobrenadante para um *Falcon* de 15 mL e desprezou-se o conteúdo proteico, tendo-se promovido a precipitação de DNA ao adicionar 20 mL de etanol absoluto frio (-20°C) ao sobrenadante do tubo, invertendo-o várias vezes. O etanol desidrata a molécula de DNA, fazendo com que saia da solução, possibilitando, assim, a formação de um novelo de DNA. Depois de lavado com 5 mL de etanol a 70% frio (-20°C), o novelo de DNA é ressuscitado em tampão TE (Tris-EDTA – tampão com 10 mM de Tris-HCl a pH 7.2 e 1 mM de EDTA) num *epENDORF* de 1,5 mL. O volume de TE utilizado para ressuscitar o DNA foi determinado pela observação empírica do tamanho do novelo extraído. Numa etapa final, deixou-se o DNA durante algumas horas num agitador rotativo (*Stuart Scientific – Blood Tube Rotator SB1*), para que pudesse entrar em solução.

3.2.3. Quantificação de DNA

O DNA obtido foi quantificado por determinação da densidade ótica, utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop* (ND-1000 V3.6.0, *Thermo Scientific*) a um comprimento de onda de 260 nm. Foram, também, avaliados os valores obtidos no comprimento de onda de 230 nm e 280 nm: razões de absorvância 260/230 e 260/280 com valores que se encontram entre 1,8-2,0 são indicadores da pureza e qualidade do DNA, ou seja, indicam-nos que a amostra está livre de contaminação quer por sais orgânicos, quer por proteínas, respetivamente.

A partir das soluções originais, foram obtidas soluções de trabalho a uma concentração de 50 ng/μL, por diluição com água bidestilada estéril *Braun* (*Braun*), bem como placas de trabalho com uma concentração final de 12,5 ng/μL.

3.2.4. Seleção dos SNPs a analisar

Após uma revisão de literatura sobre genes de suscetibilidade para a perturbação no controlo de impulsos, e tendo em conta o papel importante das monoaminas no possível desenvolvimento desta patologia, foram selecionados genes que, de alguma forma, estejam implicados no sistema monoaminérgico.

3.2.5. Técnicas utilizadas

Neste estudo, foram utilizadas diferentes técnicas de genotipagem, englobando diferentes técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase), apresentadas detalhadamente em seguida, sendo elas a PCR-HRM, a tecnologia *TaqMan* e a técnica PCR-RFLP.

A PCR, introduzida por Mullis *et al.*, em 1986 (Mullis *et al.*, 1986), consiste na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, de forma exponencial, mimetizando o processo de replicação do DNA no ciclo celular que ocorre *in vivo*. Esta reação é caracterizada por um conjunto de ciclos que compreendem

3 etapas: desnaturação da cadeia dupla de DNA, *annealing* dos *primers* específicos para posterior amplificação da região de interesse, e a extensão de DNA através da enzima *Taq* DNA Polimerase.

Para que a reação possa ocorrer adequadamente, é necessário juntar ao DNA *template* uma mistura de reação composta por reagentes com concentrações bem definidas, entre os quais um par de *primers* (*forward* e *reverse*), que reconhecem regiões complementares específicas de DNA e flanqueiam a região de interesse; os dNTPS, necessários para a síntese de novas cadeias de DNA, servindo de substrato para a *Taq* DNA Polimerase; e um *buffer* que contenha $MgCl_2$, co-fator da *Taq* DNA Polimerase (enzima termoestável) e sem o qual esta não consegue exercer a sua função (Kubista et al., 2006).

A desnaturação ocorre a temperaturas elevadas (95°C), permitindo que as cadeias de DNA se separem por quebra das pontes de hidrogénio (Kubista et al., 2006). A temperatura de *annealing* é bastante mais baixa que a temperatura de desnaturação e varia de acordo com as propriedades de *melting* dos *primers* e da sequência de DNA (Kubista et al., 2006) (sequências mais ricas em conteúdo GC vão necessitar de uma temperatura de *annealing* superior, pois a temperatura de *melting* é mais elevada). Por último, a fase de extensão ocorre a 72°C, temperatura ótima de atuação da enzima de polimerização (Kubista et al., 2006). Estas etapas são repetidas consecutivamente em vários ciclos (de 30 a 45) de forma a serem obtidas, no final da reação, quantidades significativas da sequência pretendida.

3.2.5.1. Real Time-PCR

A PCR em tempo real (Real Time-PCR), originalmente desenvolvida em 1993 por Higuchi *et al.* (Higuchi et al., 1993), provocou alterações significativas nas metodologias de quantificação de ácidos nucleicos, nomeadamente no que se refere à simplicidade, sensibilidade e reprodutibilidade desta técnica. As potencialidades desta metodologia na investigação molecular têm sido evidentes, particularmente na deteção e quantificação de ácidos nucleicos e na caracterização de mutações e polimorfismos (Arya et al., 2005).

A particularidade desta tecnologia prende-se com o facto de o processo de amplificação ser monitorizado em tempo real, através da quantificação da fluorescência de corantes ou sondas introduzidos na reação (Kubista et al., 2006), levando à obtenção de curvas de fluorescência. Podem ser agentes intercalantes de DNA de cadeia dupla (como, por exemplo, ocorre na metodologia HRM), ou sondas de hibridação específicas marcadas com fluoróforos (como as sondas *TaqMan*) (Kubista et al., 2006). Esta metodologia pode ser usada para a caracterização de SNPs.

3.2.5.2. PCR-HRM

Para a análise do polimorfismo no gene que codifica o recetor 2A da serotonina (*HTR2A*) (c.102T>C, rs6313), foi usada a técnica de *High Resolution Melting* (HRM), que utiliza um termociclador com um

MATERIAL E MÉTODOS

fluorímetro incorporado, capaz de detetar a fluorescência emitida em tempo real. Neste estudo, o termociclador usado foi o Rotor-Gene™ 6000 Series (Rcorbett).

Os *primers* usados para a análise da alteração referida foram desenhados e sintetizados, estando a sequência apresentada na tabela 1.

A técnica de *Melting* de Alta Resolução (HRM – *High Resolution Melting*) foi descrita e desenvolvida em 2003 por Gundry *et al.* (Gundry *et al.*, 2003) e permite a análise do produto de PCR em tempo real, mediante emissão de fluorescência. A análise HRM inicia-se com uma amplificação por PCR da região de interesse, na presença de um corante que se intercala no DNA de cadeia dupla (dsDNA), como o *Syto 9*, usado neste trabalho. Quando ligado ao dsDNA, este corante possui elevada fluorescência, que baixa à medida que a temperatura aumenta e a quantidade de dsDNA diminui, uma vez que ocorre a desnaturação da molécula. A amplificação é seguida por um passo de *melting* de alta resolução, utilizando equipamentos capazes de captar um elevado número de pontos de fluorescência por alterações na temperatura, com bastante precisão. Quando o dsDNA se dissocia em cadeias simples, o corante é libertado, provocando uma diminuição da fluorescência. A temperatura de *melting* (T_m) e o perfil obtido dependem do conteúdo em GC, dimensão e sequência do produto de PCR. Como resultado, obtém-se um perfil de curvas de *melting*, característico de cada amplificação (Applied Biosystems, 2010), permitindo a genotipagem de cada sequência amplificada (figura 12).

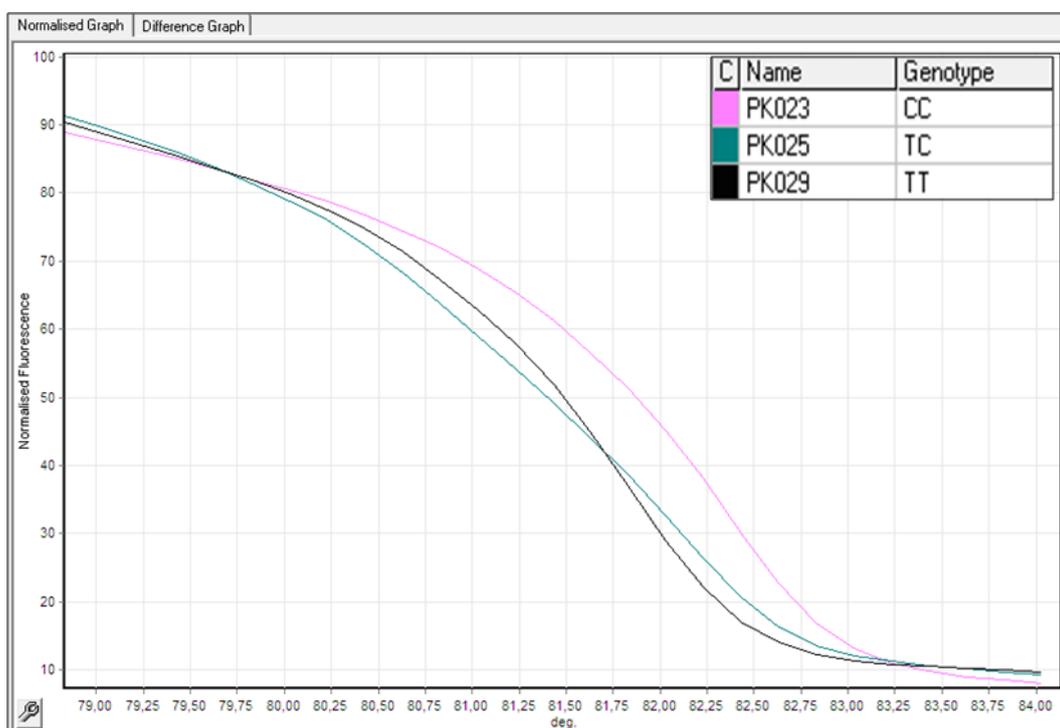


Figura 12 - Curva dos perfis de *melting* obtidos por PCR-HRM para amostras de DNA de doentes com Parkinson (cada curva representa um genótipo).

Através da comparação das diferenças do perfil da curva de *melting* entre dois ou mais amplificações, e utilizando um *software* específico, é possível detetar alterações até um par de bases ao nível da sequência

do DNA. Este método pode ser utilizado em diferentes aplicações, tais como genotipagem e rastreio de mutações, apresentando uma elevada sensibilidade e especificidade, bem como um baixo custo, quando comparado com outras tecnologias.

A Mastermix da reação foi preparada para um volume final de 9 μ L e continha água bidestilada estéril *Braun* (*Braun*), 1x da mistura de amplificação comercial *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), que contém todos os reagentes necessários à realização da PCR e 0,20 μ M de cada um dos primers (tabela 1). A mistura foi agitada e distribuída num volume de 8 μ L em tubos de reação de 25 μ L (*Corbett Research*), aos quais de adicionaram, posteriormente, 50 ng de DNA. As condições da solução de reação encontram-se apresentadas na tabela 2, e o perfil térmico utilizado está descrito na tabela 3.

Em cada protocolo, foram utilizados três controlos positivos (cada um correspondente a cada genótipo) e um controlo negativo (água bidestilada *Braun*).

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos primers para amplificação do polimorfismo c.102T>C e tamanho do produto de PCR

Gene	Polimorfismo	Sequência de primers	Tamanho do fragmento
<i>HTR2A</i>	c.102T>C	F1: 5'-TGATGACACCAGGCT-3'	105 bp
		R1: 5'-CAGGAAAGGTTGGTTCGATT-3'	

Tabela 2 – Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem do polimorfismo c.102T>C por Real Time-PCR

Solução	Concentração Stock	Concentração da Reação
MasterMix (<i>Rotor-Gene Probe PCR</i>)	2x	1x
Primer F1	10 μ M	0,20 μ M
Primer R1	10 μ M	0,20 μ M
Syto9	50 μ M	1,50 μ M
DNA	50 ng/ μ L	50 ng
H ₂ O	-	-

Tabela 3 – Perfil térmico utilizado para a amplificação do polimorfismo c.102T>C, no Rotor-Gene[™] 6000 Series (*Rcorbett*)

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
90	10 min	1
96	30 seg	40
56	30 seg	
72	1 min	
Passagem de 75°C para 90°C		
Aumento de 0,2°C por cada passo		
Espera de 90 seg de condição <i>pre-melt</i> no primeiro passo		
Espera de 2 seg até à passagem ao passo seguinte		

3.2.5.3. Tecnologia *TaqMan*

Para a análise dos polimorfismos nos genes que codificam o recetor D3 da dopamina (*DRD3*) (c.25A>G, rs6280) e a subunidade 2B do recetor NMDA do glutamato (*GRIN2B*) (c.366C>G, rs7301328), foi usada a metodologia das sondas *TaqMan*, recorrendo-se a kits *TaqMan*[®] da *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*. Para a análise do rs6280, foi utilizado o kit C___949770_10; para a análise do rs7301328, foi utilizado o kit C__25472761_30.

Esta metodologia, descrita pela primeira vez por Holland *et al.*, em 1991 (Holland et al., 1991), é um método quantitativo que se baseia na ação exonucleotídica 5'→3' da enzima *Taq* DNA Polimerase, que promove a quebra da sonda híbrida durante a polimerização, criando um sinal de fluorescência. Para este efeito, são necessárias duas sondas *TaqMan* que irão diferir no local polimórfico: uma será complementar do alelo ancestral e a outra da sua variante. Estas duas sondas são marcadas com dois fluoróforos diferentes, para a diferenciação do alelo presente. O fluoróforo está covalentemente ligado à sonda na extremidade 5' – o *reporter* –, enquanto na extremidade 3' está ligado um *quencher*. O *quencher* é uma molécula que capta a energia emitida pela molécula *reporter* e a dissipa em forma de calor. Enquanto as sondas se mantêm intactas, o *quencher* e o *reporter* mantêm-se próximos um do outro, pelo que o primeiro absorve a fluorescência emitida pelo segundo, inibindo qualquer sinal (Premier Biosoft, Mamotte, 2006).

Durante a PCR, as sondas *TaqMan* hibridam com DNA em cadeia simples no local do polimorfismo, entre os *primers forward* e *reverse*. À medida que a *Taq* DNA Polimerase procede à extensão dos *primers* e sintetiza a nova cadeia, a sonda encontra-se ligada ao produto de PCR de cadeia simples complementar; quando a enzima atinge a sonda, esta é hidrolisada pela atividade exonucleotídica 5'→3' da *Taq* DNA Polimerase, a molécula *reporter* é clivada e o fluoróforo é libertado. Esta degradação afasta o fluoróforo da molécula *quencher*, impedindo-a de absorver a fluorescência emitida pela molécula *reporter* e levando a um aumento do sinal de fluorescência (figura 13), detetada pelo *software* do equipamento (Arya et al., 2005, Holland et al., 1991, Premier Biosoft, Mamotte, 2006). A fluorescência detetada será diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e à quantidade de DNA presente na PCR.

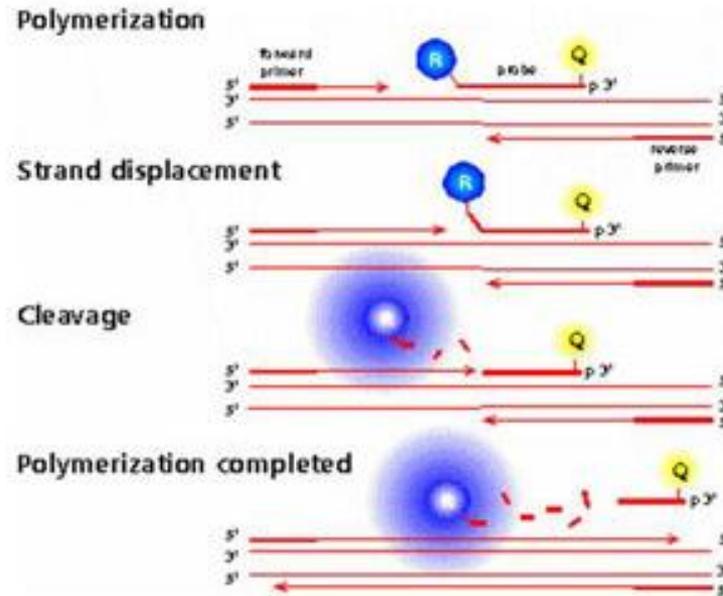


Figura 13 - Metodologia de detecção de SNPs com sondas *TaqMan*.
(fonte: <http://documents.plant.wur.nl/pri/biointeractions/images/slide12.jpg>)

No caso da genotipagem de SNPs, o procedimento a realizar passa por uma reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação do fragmento que contém o polimorfismo, usando sondas que hibridem especificamente na região pretendida, e às quais se encontra acoplado um fluoróforo, que emitem fluorescência em diferentes canais, mediante o alelo presente.

À medida que a amplificação do fragmento contendo o SNP ocorre, a análise da fluorescência emitida é efetuada através do equipamento Rotor-Gene™ 6000 Series (*Rcorbett*), um termociclador com um fluorímetro incorporado. Mediante a intensidade da fluorescência em cada canal, as amostras são classificadas em homozigóticas (para cada alelo) ou heterozigóticas: um aumento do sinal de fluorescência de um dos fluoróforos indica homozigotia para o alelo correspondente, enquanto o aumento das duas cores será indicativo da presença de uma heterozigotia (Mamotte, 2006).

A Mastermix da reação foi preparada para um volume final de 8 μL e continha água bidestilada estéril *Braun* (*Braun*), 1x da mistura de amplificação comercial *TaqMan*® Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), que contém todos os reagentes necessários à realização da PCR e 1x de *TaqMan Gene SNP Assay* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), que contém os primers e as sondas específicas. A mistura foi agitada e distribuída num volume de 7 μL em tubos de reação de 25 μL (*Corbett Research*), aos quais se adicionaram, posteriormente, 12,5 ng de DNA. As condições da solução de reação encontram-se apresentadas na tabela 4, e o perfil térmico utilizado está descrito na tabela 5.

Em cada protocolo, foram utilizados três controlos positivos (cada um correspondente a cada genótipo) e um controlo negativo (água bidestilada *Braun*).

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4 – Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem dos polimorfismos c.25A>G e c.366C>G pela metodologia *TaqMan*

Solução	Concentração Stock	Concentração da Reação
<i>TaqMan</i> Universal PCR MasterMix	2x	1x
<i>TaqMan</i> Gene SNP Assay	40x	1x
DNA	50 ng/μL	12,5 ng
H ₂ O	-	-

Tabela 5 – Perfil térmico utilizado para amplificação dos polimorfismos c.25A>G e c.366C>G, no Rotor-Gene™ 6000 Series (*Rcorbett*)

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
95	10 min	1
92	15 seg	
58	40 seg	40
72	20 seg	

3.2.5.4. PCR-RFLP

Para a análise das mutações no gene que codifica a enzima lisossomal glucocerebrosidase (*GBA*) – N370S (exão 9) (c.1226A>G; posição 5841A>G do DNA genómico) e L444P (exão 10) (c.1448T>C; posição 6433T>C do DNA genómico) –, foi usada a técnica PCR-RFLP.

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é uma das técnicas mais antigas utilizadas para a deteção de polimorfismos, nomeadamente de SNPs. Consiste na amplificação por PCR da sequência a analisar, seguida de digestão enzimática, que produz fragmentos de tamanhos distintos, pela ação de enzimas de restrição. Estas enzimas são endonucleases que reconhecem sequências de DNA específicas de 4-6 pares de bases e clivam-nas numa posição nucleotídica específica e conhecida. A mistura de fragmentos de DNA é aplicada num gel (agarose ou poliacrilamida) e submetida a um campo elétrico (Mamotte, 2006). Sendo o DNA uma molécula com carga negativa, devido à presença de grupos fosfato, a migração ocorre do polo negativo para o polo positivo. Nessas condições, os fragmentos movem-se a velocidades inversamente proporcionais ao seu tamanho, ou seja, os fragmentos menores deslocam-se mais que os maiores, uma vez que, devido às suas menores dimensões, conseguem incorporar-se melhor nos poros da malha do gel e deslocam-se mais em direção ao polo. Quando o campo elétrico é desligado, fragmentos de mesmo tamanho, que percorrem a mesma distância, encontram-se juntos numa determinada posição do gel, originando uma banda. Através da análise do padrão de bandas resultante da restrição é possível detetar a presença ou ausência do polimorfismo estudado (Costa et al., 2007).

Os *primers* usados para a amplificação de cada uma das mutações, bem como o tamanho do produto de PCR obtido, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Sequência nucleotídica dos primers para amplificação dos dois SNPs e tamanho dos respectivos produtos de PCR

Gene	Polimorfismo	Sequência de primers	Tamanho do fragmento
GBA	c.1226A>G	F: 5'-GCCTTTGCTCTTACCCTCGA-3'	125 bp
		R: 5'-CTACAATGATGGGACTGTCTG-3'	
	c.1448T>C	F: 5'-CCAATTGGGTGCGTAACTTT-3'	700 bp
		R: 5'-GAGGCACATCCTTAGAGGAG-3'	

Na amplificação das sequências correspondentes às mutações c.1226A>G e c.1448T>C, foi utilizada uma solução-mãe de reação (*Mastermix*), para um volume final de 25 µL, resumida nas tabelas 7 e 8, respectivamente, utilizando água livre de nucleases, fornecida com a mistura de enzimas. A *High Fidelity PCR Enzyme Mix* combina a *Taq* DNA Polimerase e uma DNA Polimerase termoestável com atividade *proofreading*.

Tabela 7 - Reagentes da Mix usada para a amplificação e genotipagem da mutação c.1226A>G por PCR-RFLP

Solução (<i>Fermentas - High Fidelity</i>)	Concentração Stock	Concentração da Reação
High Fidelity PCR Buffer	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,4 mM
Primer F	10 µM	0,4 µM
Primer R	10 µM	0,4 µM
High Fidelity PCR Enzyme Mix	5 U/µL	0,2 U/µL
H ₂ O	-	-

A cada tubo de PCR adicionaram-se 800 ng de DNA.

Tabela 8 - Reagentes da Mix usada para amplificação e genotipagem da mutação c.1448T>C por PCR-RFLP

Solução (<i>Fermentas - High Fidelity</i>)	Concentração Stock	Concentração da Reação
High Fidelity PCR Buffer	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM
dNTPs	10 mM	0,4 mM
Primer F	10 µM	0,48 µM
Primer R	10 µM	0,48 µM
High Fidelity PCR Enzyme Mix	5 U/µL	0,1 U/µL
H ₂ O	-	-

A cada tubo de PCR adicionaram-se 150 ng de DNA.

As soluções foram amplificadas no termociclador *MyCycler (Bio-Rad)*, utilizando o mesmo programa de PCR, cujo perfil térmico utilizado está apresentado na tabela 9.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 9 – Perfil térmico utilizado para amplificação das mutações c.1226A>G e c.1448T>C, no termociclador *MyCycler* (Bio-Rad)

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
95	10 min	1
95	1 min	
54	1 min	29
72	2 min	
72	10 min	1
4		∞

A cada produto amplificado adicionou-se 1 µL de *Loading Buffer* (5x *Green GoTaq Flexi Buffer*) e foi feita a sua visualização em gel de agarose *Lonza* a 2% (p/v) em eletroforese horizontal, comprovada na figura 14.

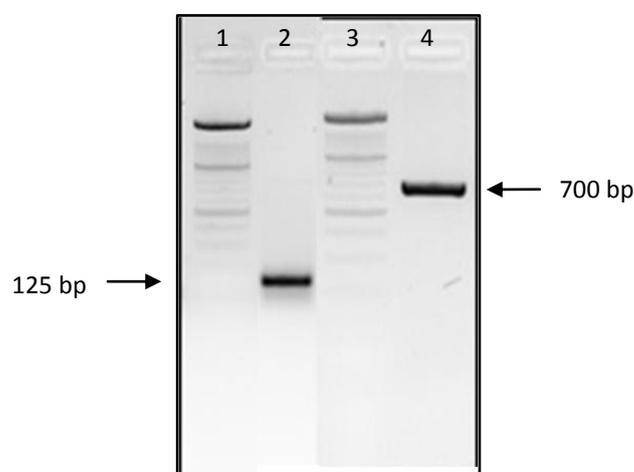


Figura 14 – Imagem do gel obtido para a amplificação inicial dos fragmentos para as mutações c.1226A>G (125 bp) e c.1448T>C (700 bp). Legenda: poços 1 e 3 – *ladder* 100 bp (Roche); poço 2 – fragmento resultante da amplificação inicial para a mutação c.1226A>G; poço 4 – fragmento resultante da amplificação inicial para a mutação c.1448T>C.

Depois de comprovada a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma digestão com as respectivas enzimas de restrição (tabela 11), de acordo com a bula, cujas misturas se apresentam na tabela 10.

Tabela 10 - Mastermix para a digestão enzimática para cada uma das mutações

Solução	Concentração Stock	N370S: Concentração da Reação	L444P: Concentração da Reação
<i>Buffer</i> da enzima a usar	10 x	0,97x	0,93x
Produto de PCR	1000 ng/µL	806,5 ng/µL	465,1 ng/µL
H ₂ O	-	-	-
Enzima de restrição	10 U/µL	0,97 U/µL	0,70 U/µL

Tabela 11 - Enzima de restrição e respetivo *buffer* utilizados para a digestão enzimática de cada uma das mutações

Polimorfismo	Enzima de restrição	Buffer	Local de reconhecimento e corte
c.1226A>G	<i>XhoI</i>	R (red)	C/TCGAG
c.1448T>C	<i>NciI/BclI</i>	Tango	CC/SGG

A solução final foi colocada a incubar em banho-maria a 37°C (temperatura ótima para a atuação de ambas as enzimas), durante 2 horas para a mutação c.1226A>G e 3 horas para a mutação c.1448T>C.

A cada amostra adicionou-se 1µL de *Loading Buffer* (5x *Green GoTaq Flexi Buffer*) e a visualização do produto digerido foi feita em gel de agarose *Lonza* a 4% (p/v) em eletroforese horizontal. O tamanho das bandas digeridas foi analisado pelo uso de um marcador de peso molecular de 20 bp (*ladder IV*, *NZYTech*), como apresentado na figura 15.

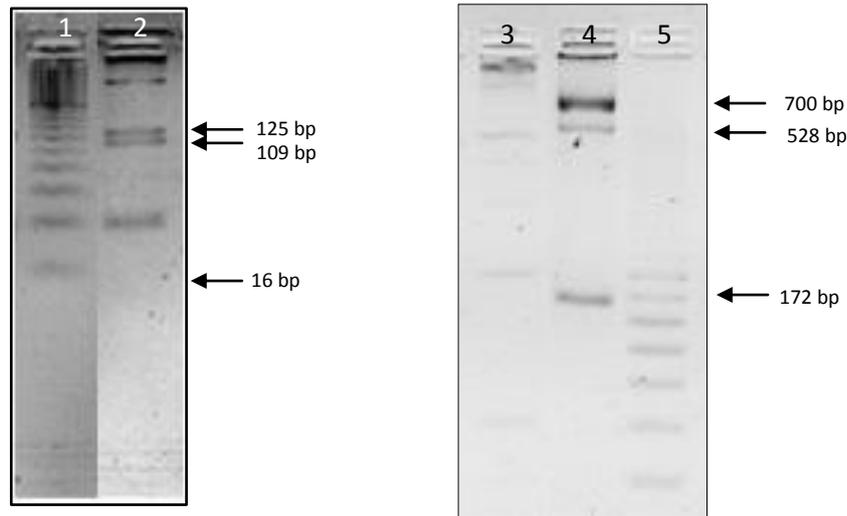


Figura 15 – Gel de agarose obtido com o resultado da digestão enzimática das mutações N370S (1-2) e L444P (3-5) em gel de agarose Lonza a 4%, com a enzima *XhoI* e *BclI*, respetivamente. Legenda: poços 1 e 5 – ladder IV; poço 2 – padrão de restrição para um indivíduo com o genótipo AG (125 bp + 109 bp + 16 bp); poço 3 – ladder 100 bp (Roche); poço 4 – padrão de restrição para um indivíduo com o genótipo TC (700 bp + 528 bp + 172 bp).

O padrão de restrição esperado para cada genótipo está apresentado na tabela 12.

Tabela 12 - Padrão de restrição esperado para cada genótipo das mutações analisadas

Fragmentos de restrição esperados (bp)	c.1226A>G (N370S)	c.1448T>C (L444P)
<i>wt</i>	125	700
Homozigótico	109+16	528+172
Heterozigótico	125+109+16	700+528+172

Em cada protocolo, foram utilizados um controlo positivo (correspondente ao genótipo de heterozigotia) e dois controlos negativos (correspondentes a um branco de água bidestilada e a um indivíduo não portador das mutações).

MATERIAL E MÉTODOS

4. Análise Estatística

Foi utilizada uma regressão logística binária para calcular os *odds ratios*.

As frequências genótípicas e alélicas para cada polimorfismo na população de doentes com Parkinson e na população controlo foram obtidas por contagem direta.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado nos polimorfismos estudados utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2).

A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS (*Statistics Package for Social Sciences*) versão 21 (SPSS, Chicago Illinois, USA).

Para a análise das frequências dos genótipos em ambas as populações foi utilizado o Teste de χ^2 ou o Teste Exato de Fisher, conforme apropriado. O *Odd Ratio* (OR) foi calculado como uma aproximação ao Risco Relativo, que quantifica a probabilidade de um indivíduo com um determinado alelo desenvolver a doença quando comparado com indivíduos que não o possuem. Um OR de aproximadamente 1 indica que não existem diferenças significativas; abaixo da unidade indica que poderá ser um fator protetor; e acima da unidade indica que há associação, predisposição ou suscetibilidade para a característica em estudo.

Para avaliar a independência dos polimorfismos estudados, aplicou-se o método de regressão logística binária *stepwise forward*, onde as variáveis independentes foram sendo introduzidas, até que a adição de uma nova variável independente não acrescentasse mais informação ao modelo. Este método permite avaliar as relações de dependência de uma variável dependente a partir do comportamento de uma ou várias variáveis independentes. Considerou-se como estatisticamente significativo, valores de $p < 0,05$ (intervalo de confiança de 95%).

O teste *t-student* foi utilizado para avaliar variáveis contínuas.

RESULTADOS

RESULTADOS

As frequências dos genótipos das variações genéticas em estudo não se desviaram de modo significativo do equilíbrio Hardy-Weinberg, pelo que foram consideradas para a análise estatística.

1. SNPs e o desenvolvimento da Doença de Parkinson

Os resultados apresentados resultam de uma comparação entre a população de doentes (PK; n=100) e a população controlo (PC; n=100, exceto para o rs6313, com n=274).

1.1. *DRD3* - Polimorfismo (c.25A>G) do sistema dopaminérgico na Doença de Parkinson

Após a comparação das frequências genotípicas deste polimorfismo entre a população de doentes e a população controlo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas (**TT**: 35% PK vs. 42% PC; p=n. s.; OR=1; **TC**: 45% PK vs. 42% PC; p=n. s.; OR=1,286 (IC 95%=[0,695 – 2,378]); e **CC**: 20% PK vs. 16% PC; p=n. s.; OR=1,5 (IC 95%=[0,677 – 3,324]), figura 16).

Relativamente às frequências alélicas, observou-se que as diferenças também não se mostraram estatisticamente significativas (**T**: 57,5% PK vs. 63% PC; p=n. s.; OR=0,795 (IC 95%=[0,532 – 1,187]); **C**: 42,5% PK vs. 37% PC; p=n. s.; OR=1,259 (IC 95%=[0,843 – 1,880]) – figura 16).

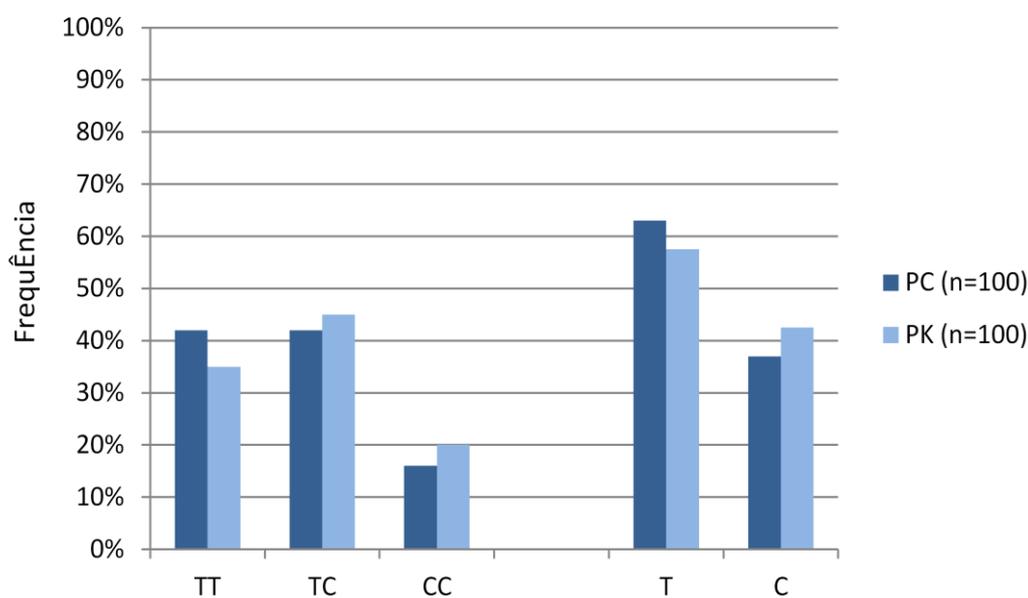


Figura 16 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.25A>G do gene *DRD3* na população controlo (PC) e no grupo de doentes com Parkinson (PK).

RESULTADOS

1.2. *HTR2A* - Polimorfismo (c.102T>C) do sistema serotoninérgico na Doença de Parkinson

As frequências genotípicas e alélicas deste SNP para as duas populações em estudo estão resumidas na figura 17.

Para este polimorfismo, as frequências observadas foram idênticas entre as duas populações (**TC**: 48,4% PK vs. 44% PC; p=n. s.; OR=1,313 (IC 95%=[0,726 – 2,374])); **TT**: 21,7% PK vs.25,8% PC; p=n. s.; OR=1; e **CC**: 29,9% PK vs. 30,2% PC; p=n. s.; OR=1,196 (IC 95%=[0,627 – 2,280])).

Quanto às frequências alélicas, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (**T**: 45,9% PK vs.47,8% PC; p=n. s.; OR=0,925 (IC 95%=[0,666 – 1,284])); **C**: 54,1% PK vs. 52,2% PC; p=n. s.; OR=1,081 (IC 95%=[0,779 – 1,501])).

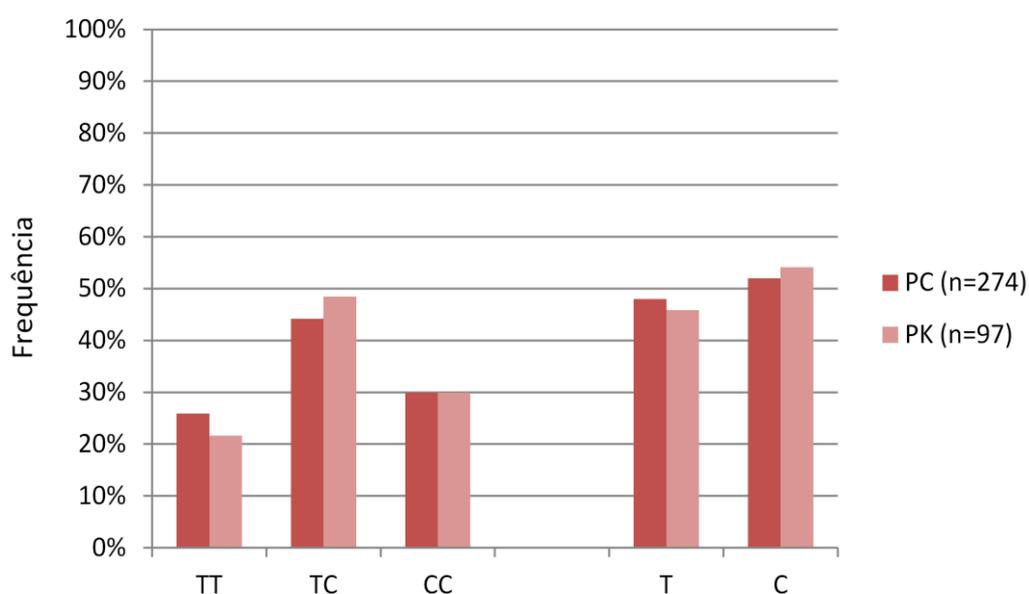


Figura 17 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.102T>C do gene *HTR2A* na população controle (PC) e no grupo de doentes com Parkinson (PK).

1.3. *GRIN2B* - Polimorfismo (c.366C>G) do sistema glutamatérgico na Doença de Parkinson

Os resultados obtidos para o polimorfismo c.366C>G, na região codificante do gene da subunidade 2B do recetor NMDA (N-metil-D-aspartato) do glutamato (*GRIN2B*), encontram-se apresentados na figura 18.

Tal como para os SNPs anteriores, para este polimorfismo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas entre as duas populações. Observou-se que a frequência do genótipo CC foi de 16% na PK e de 8% na PC (16% PK vs. 8% PC; p=n. s.; OR=2,205 (IC 95%=[0,850 – 5,719])) e que as frequências dos genótipos CG e GG foram idênticas nas duas populações

(45% PK vs. 50% PC; $p=n. s.$; $OR=1,013$ (IC 95%=[0,560 – 1,832]) e 39% PK vs.42% PC; $p=n. s.$; $OR=1$, respetivamente).

Quanto às frequências alélicas, as diferenças encontradas também não foram estatisticamente significativas (**C**: 38,5% PK vs. 33% PC; $p=n. s.$; $OR=1,271$ (IC 95%=[0,884 – 1,915]); **G**: 61,5% PK vs. 67% PC; $p=n. s.$; $OR=0,787$ (IC 95%=[0,522 – 1,185]).

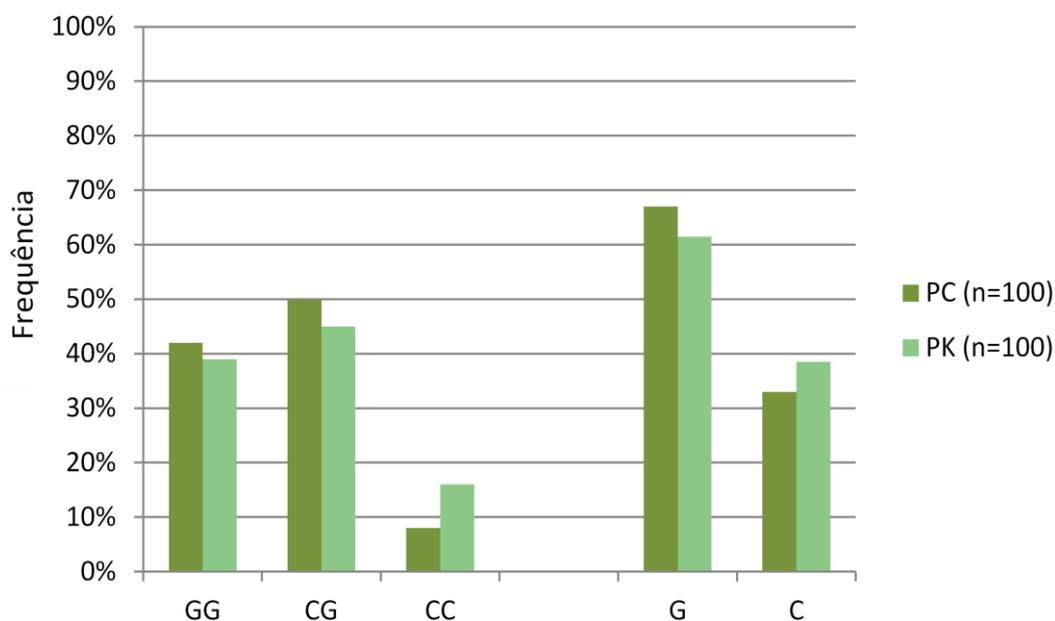


Figura 18 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.366C>G do gene *GRIN2B* na população controlo (PC) e no grupo de doentes com Parkinson (PK).

1.4. *GBA* - Mutações N370S (c.1226A>G) e L444P (c.1448T>C) do gene *GBA* na Doença de Parkinson

Assim como aconteceu para os polimorfismos anteriormente referidos, para as mutações da Doença de Gaucher não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências entre doentes e população controlo. As frequências genotípicas e alélicas desta mutação para as duas populações estão resumidas na figura 19.

Para a análise estatística da mutação N370S, foi utilizada como população controlo a população estudada por Lacerda *et al* (Lacerda *et al.*, 1994). Analisando os dados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas entre as duas populações. Observou-se que a frequência dos genótipos AG e AA na PK foram idênticas às observadas na PC (2% PK vs. 0,85% PC; $p=n. s.$; $OR=2,381$ (IC 95%=[0,542 – 10,449]) e 98% PK vs. 99,15% PC; $p=n. s.$; $OR=0,420$ (IC 95%=[0,096 – 1,844]), respetivamente). Em ambas as populações, não foram identificados indivíduos com o genótipo GG (homozigotia do alelo mutado).

RESULTADOS

Quanto às frequências alélicas, também não se registaram diferenças estatisticamente significativas (**A**: 99% PK vs. 99,6% PC; $p=n. s.$; $OR=0,423$ (IC 95%=[0,097 – 1,842]); **G**: 1% PK vs. 0,4% PC; $p=n. s.$; $OR=2,367$ (IC 95%=[0,543 – 10,315])).

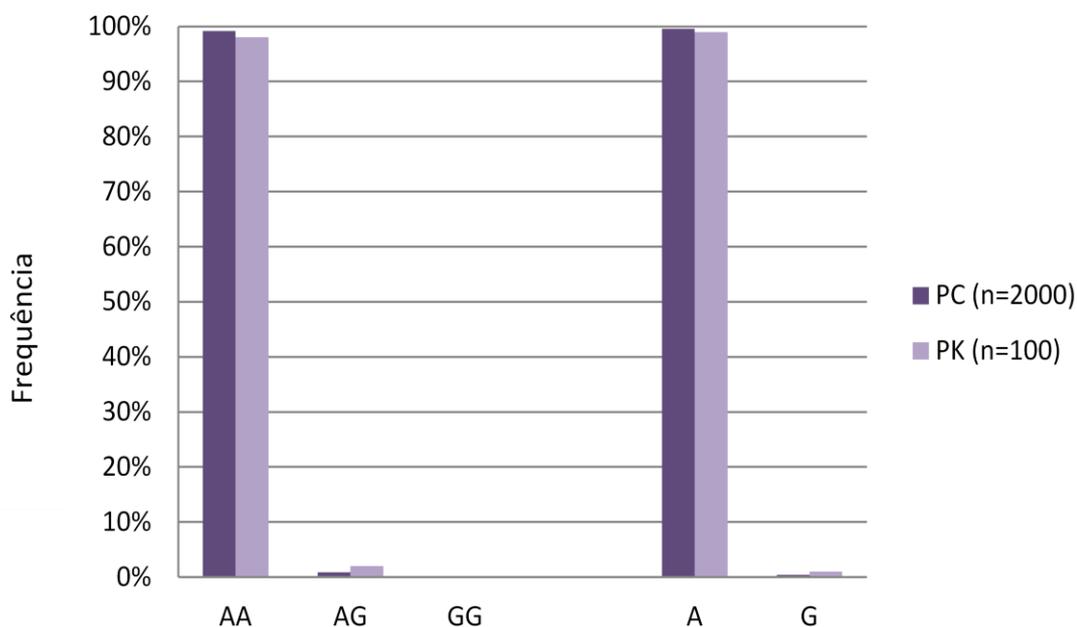


Figura 19 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas da mutação N370S do gene GBA na população controle (PC) e no grupo de doentes com Parkinson (PK).

Os resultados obtidos durante o procedimento laboratorial estão apresentados na figura 20.

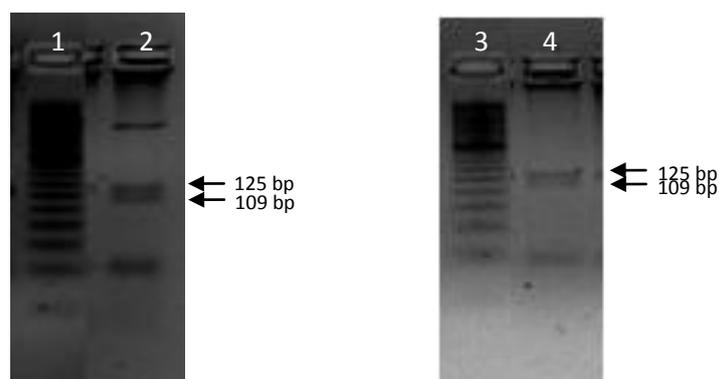


Figura 20 - Géis com os resultados da digestão enzimática das amostras PK022 (poço 2) e PK092 (poço 4), para a mutação N370S; os poços 1 e 3 correspondem ao marcador molecular *ladder IV*.

Para os dois indivíduos para os quais se identificou um alelo mutado, correspondente à mutação N370S, procedeu-se à confirmação do seu genótipo (AG) por sequenciação (figuras 21 a 23). Para tal, as amostras foram enviadas para a empresa *Stab Vida* (<http://www.stabvida.com/>). No entanto, a sequenciação da amostra PK022 com o *primer R* falhou, não tendo sido possível repeti-la em tempo útil.

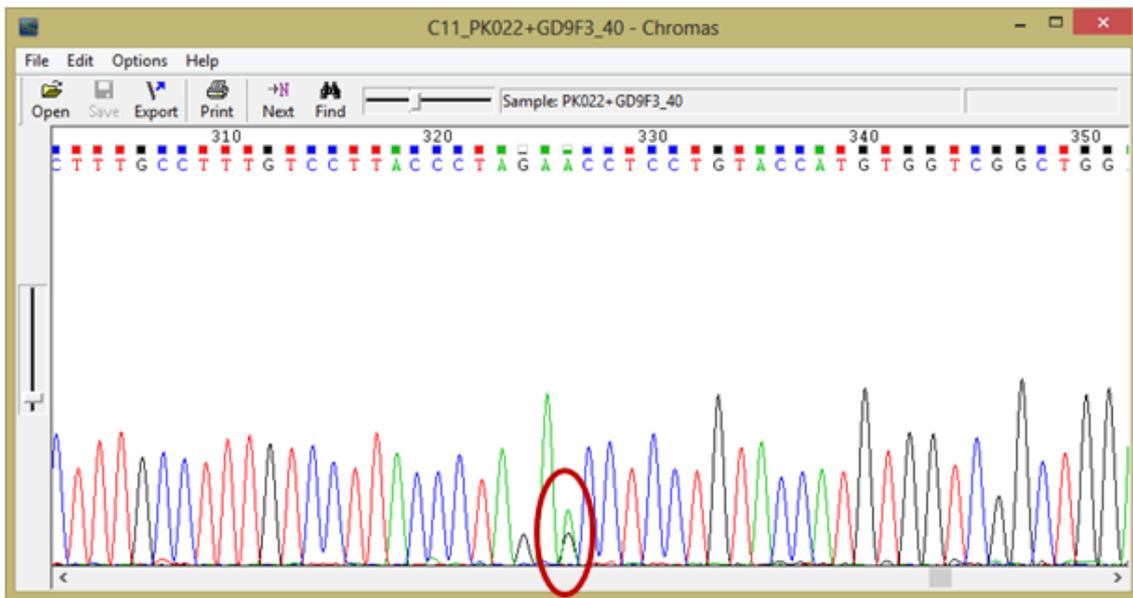


Figura 21 - Resultado da sequenciação da amostra PK022 com o primer F (genótipo AG - heterozigótico), para a mutação N370S.



Figura 22 - Resultado da sequenciação da amostra PK092 com o primer F (genótipo AG - heterozigótico), para a mutação N370S.

RESULTADOS

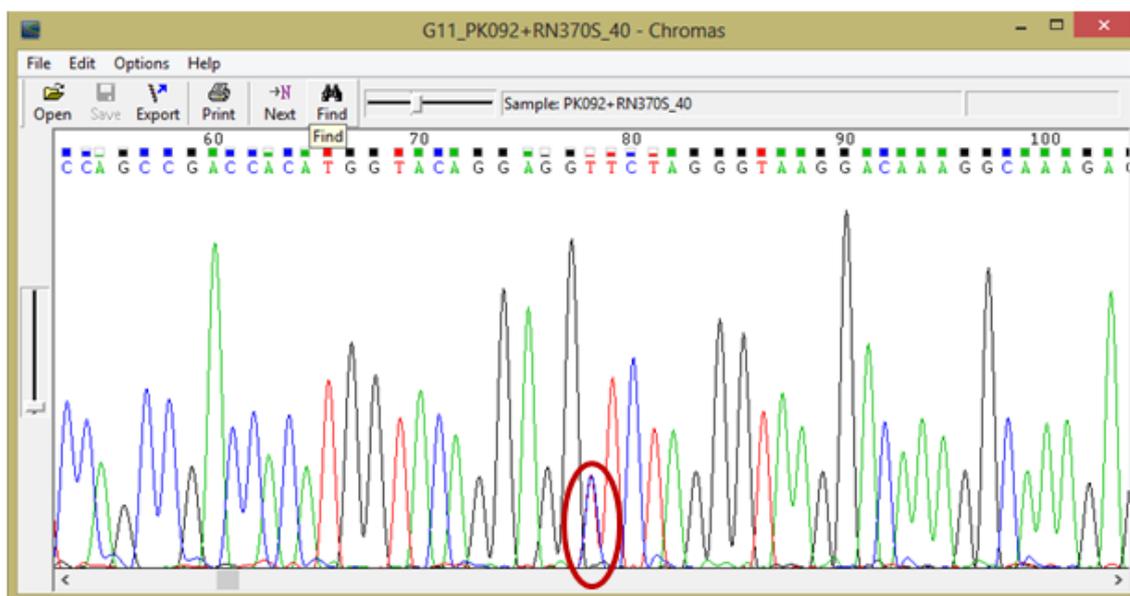


Figura 23 - Resultado da sequenciação da amostra PK092 com o *primer* R (genótipo AG - heterozigótico), para a mutação N370S.

Relativamente à mutação L444P, não foram identificados quaisquer alelos mutados na população de doentes em estudo, diferindo do estudo de Brás *et al* (Bras et al., 2009), que obteve uma frequência de 1,3% para a sua população de doentes, apenas em heterozigotia alélica, e de 0% para a sua população controle.

2. SNPs e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos

Foram consideradas duas subpopulações de doentes a partir da população de doentes inicial (n=98): uma incluiu doentes com Doença de Parkinson com algum tipo de perturbação no controlo de impulsos (PK com PCI; n=24; 10F, 14M; idade = $63 \pm 9,9$ anos (45-81 anos)); a outra incluiu os doentes com Doença de Parkinson que não apresentavam esta perturbação (PK sem PCI; n=74; 38F, 36M; idade = $69 \pm 9,5$ anos (35-86 anos)). Os resultados obtidos referem-se à comparação entre estas duas subpopulações.

2.1. Sexo

Considerando o sexo dos doentes em estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres nos dois subgrupos ($p=0,410$; $OR=1,478$ (IC 95%=[0,583 – 3,748])). No grupo de doentes com PCI, observou-se uma frequência de 41,7% de mulheres e de 58,3% de homens, enquanto no grupo de doentes sem PCI se verificou que 51,4% eram mulheres e 48,6% eram homens.

2.2. Idade

Comparando as idades entre os dois grupos, observou-se que os doentes com PCI apresentavam uma idade mais jovem que os doentes sem PCI ($63,46 \pm 10,1$ anos PK com PCI vs. $68,69 \pm 9,6$ anos PK sem PCI; $p=0,024$).

2.3. Idade de início dos sintomas e duração da Doença de Parkinson

Tendo em conta as idades de início dos sintomas, verificou-se que as médias entre os dois subgrupos diferem entre si, sendo que os doentes com PCI possuem um início mais precoce da doença do que os doentes sem PCI ($53,8 \pm 11,4$ anos PK com PCI vs. $62,1 \pm 9,6$ anos PK sem PCI ($p=0,001$)).

Considerando a duração da Doença de Parkinson, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nas médias dos dois grupos, sendo que os doentes com PCI apresentam uma doença mais prolongada que os doentes sem perturbação ($9,67 \pm 5,9$ anos PK com PCI vs. $6,61 \pm 4,1$ anos PK sem PCI; $p=0,024$).

2.4. PCI e Escalas de Sono/Fadiga (NMS – *Non Motor Symptoms*), Demência (DRS-2 – *Dementia Rating Scale II*), Ansiedade e Depressão (HADS)

Avaliando os resultados para as escalas de teste de sono/fadiga (NMS), demência (ajustada para a idade e escolaridade de cada doente) (DRS-2), ansiedade e depressão (HADS), foi possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias das duas subpopulações de doentes (tabela 13).

Tabela 13 - Resultados médios de cada subpopulação para cada escala de avaliação.

Subpopulação em Estudo	Médias dos Resultados para cada uma das Escalas			
	NMS	DRS-2	HADS (Ansiedade)	HADS (Depressão)
PK sem PCI	5,72	-1,5447	4,118	3,919
PK com PCI	7,29	-1,5554	3,751	2,777
Valor de p obtido	0,344	0,986	0,736	0,222

2.5. Dose de medicação e PCI

Tendo em conta a dose de equivalente de levodopa administrada aos doentes e a existência de algum tipo de perturbação no controlo de impulsos, observou-se que as médias entre os dois subgrupos diferem entre si, embora marginalmente, sendo que doentes com PCI tomam, em média, doses mais elevadas quando comparados com doentes sem PCI ($1028 \pm 716,6$ mg/dia PK com PCI vs. $709,28 \pm 427,2$ mg/dia PK sem PCI ($p=0,048$)).

RESULTADOS

2.6. Fármacos e PCI

Considerando dois grupos de medicação administrada aos doentes (agonistas dopaminérgicos vs. não agonistas dopaminérgicos), não se verificaram diferenças significativas entre as duas subpopulações de doentes com e sem PCI. Dos 4 doentes que tomam agonistas dopaminérgicos, nenhum apresenta a perturbação. Doentes com PCI tomam doses de equivalente de levodopa mais elevadas, incluindo não agonistas dopaminérgicos do que doentes sem PCI ($1028 \pm 716,6$ mg/dia PK com PCI vs. $736,5 \pm 422,5$ mg/dia PK sem PCI, $p=0,070$).

2.7. Idade de início dos sintomas e SNPs

Considerando a relação de cada um dos polimorfismos e a idade de início dos sintomas da Doença de Parkinson, foi possível observar diferenças significativas entre as médias dos três genótipos do rs6280 (*DRD3* c.25A>G) ($p=0,031$) (figura 24). Quanto aos outros polimorfismos (*HTR2A* c.102T>C e *GRIN2B* c.366C>G) e correspondentes genótipos, verificou-se que não existe qualquer associação entre os mesmos e a idade de início dos sintomas (*HTR2A*: $p=0,982$; *GRIN2B*: $p=0,530$) (figuras 25 e 26).

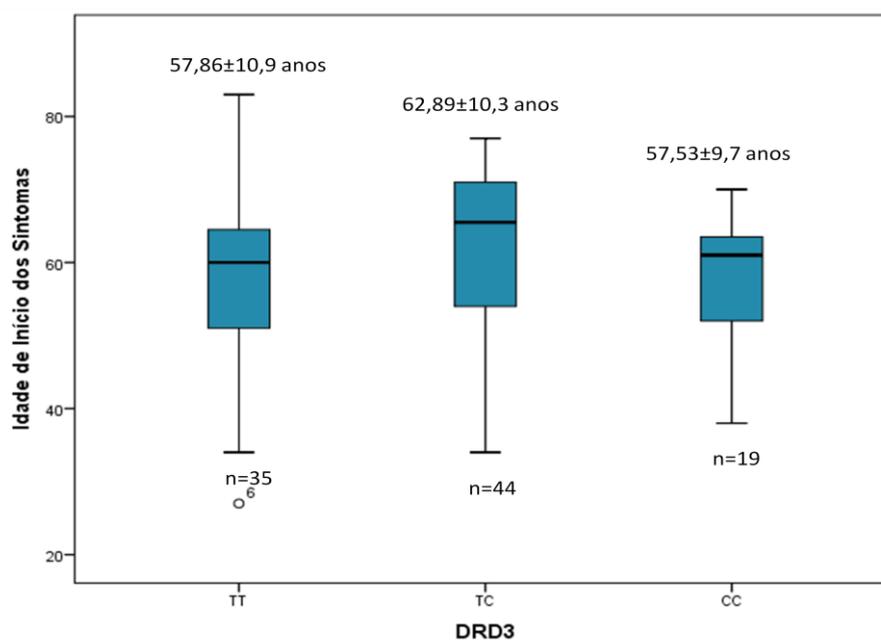


Figura 24 – Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas para cada um dos genótipos do polimorfismo do gene *DRD3* e respetivas médias.

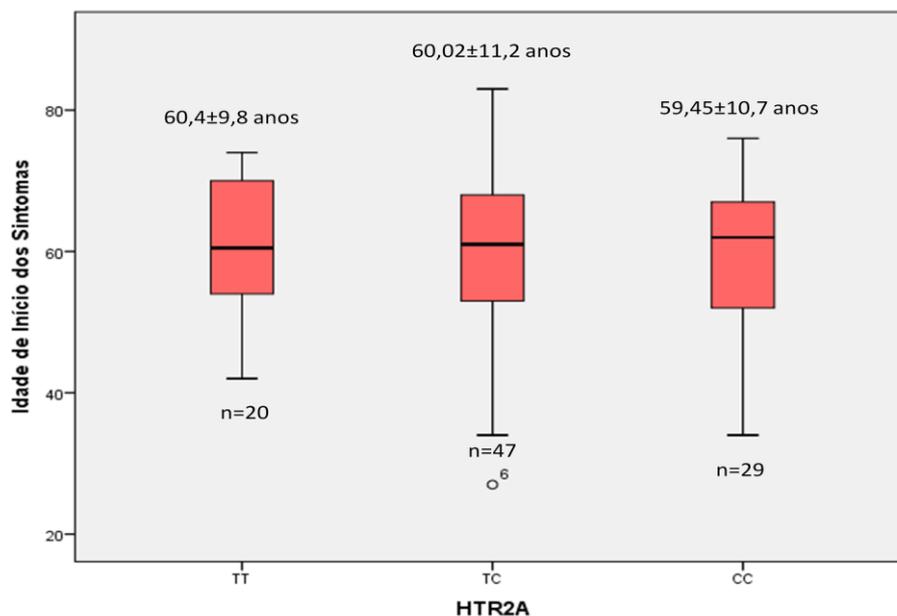


Figura 25 – Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas para cada um dos genótipos do polimorfismo do gene *HTR2A* e respectivas médias.

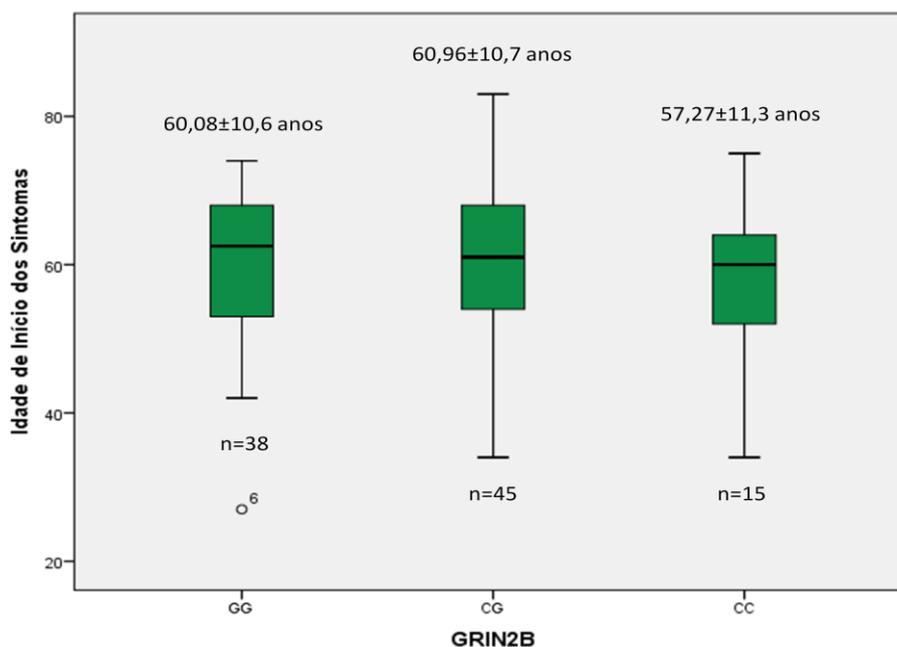


Figura 26 – Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas para cada um dos genótipos do polimorfismo do gene *GRIN2B* e respectivas médias.

2.8. *DRD3* - Polimorfismo (c.25A>G) do sistema dopaminérgico na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controle de Impulsos

As frequências genóticas e alélicas deste SNP para as duas subpopulações estão resumidas na figura 27.

RESULTADOS

Após a comparação das duas subpopulações de doentes (com e sem perturbações no controlo de impulsos), verificou-se que as frequências genotípicas deste polimorfismo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,252$).

Relativamente às frequências alélicas, as diferenças também não se mostraram significativas (**T**: 52,1% PK com PCI vs. 60,1% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=1,388$ (IC 95%=[0,721 – 2,672]); **C**: 47,9% PK com PCI vs. 39,9% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,721$ (IC 95%=[0,374 – 1,387])).

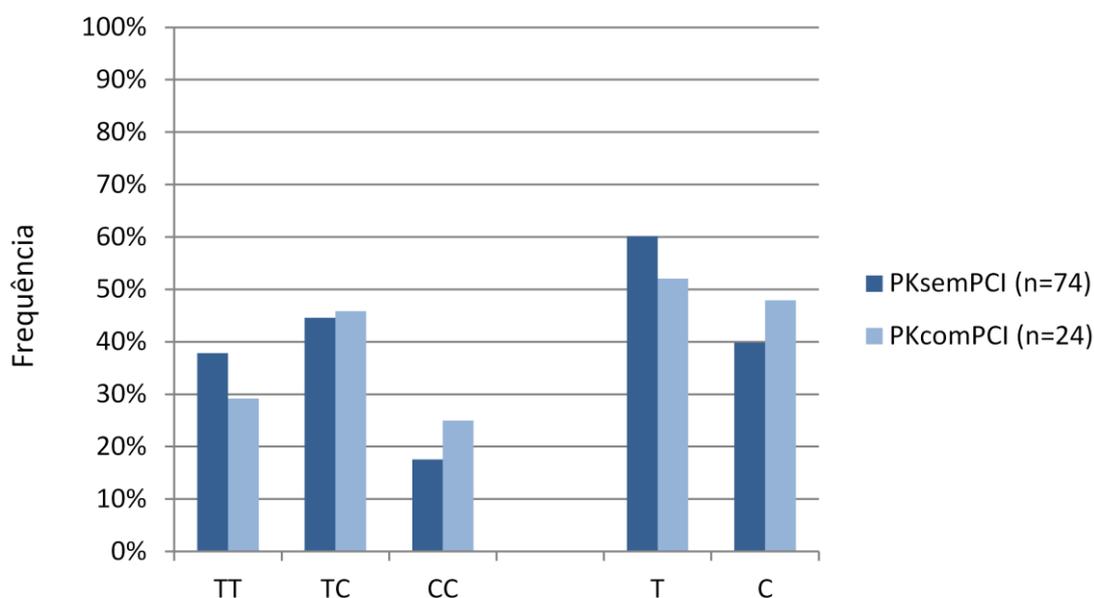


Figura 27 - Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.25A>G do gene *DRD3* na subpopulação de doentes sem perturbação no controlo de impulsos (PK sem PCI) e na subpopulação de doentes com perturbação no controlo de impulsos (PK com PCI).

2.9. *HTR2A* - Polimorfismo (c.102T>C) do sistema serotoninérgico na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos

Os resultados obtidos para o polimorfismo c.102T>C, na região codificante do gene do recetor 2A da serotonina (*HTR2A*), encontram-se apresentados na figura 28.

Para este polimorfismo, as frequências observadas foram idênticas, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações ($p=0,310$). Observou-se que a frequência do genótipo TC foi de 58,3% na PK com PCI, enquanto tomou o valor de 45,8% na PK sem PCI (58,3% PK com PCI vs. 45,8% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,575$ (IC 95%=[0,226 – 1,460])). As frequências dos genótipos TT e CC mostraram-se similares em ambas as populações (12,5% PK com PCI vs. 23,6% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=2,088$ (IC 95%=[0,555 – 7,858])); e 29,2% PK com PCI vs. 30,6% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=1,027$ (IC 95%=[0,374 – 2,825])), respetivamente).

Quanto às frequências alélicas, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (**T**: 41,7% PK com PCI vs. 46,5% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=1,158$ (IC 95%=[0,599 – 2,238]); **C**: 58,3% PK com PCI vs. 53,5% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,821$ (IC 95%=[0,424 – 1,589])).

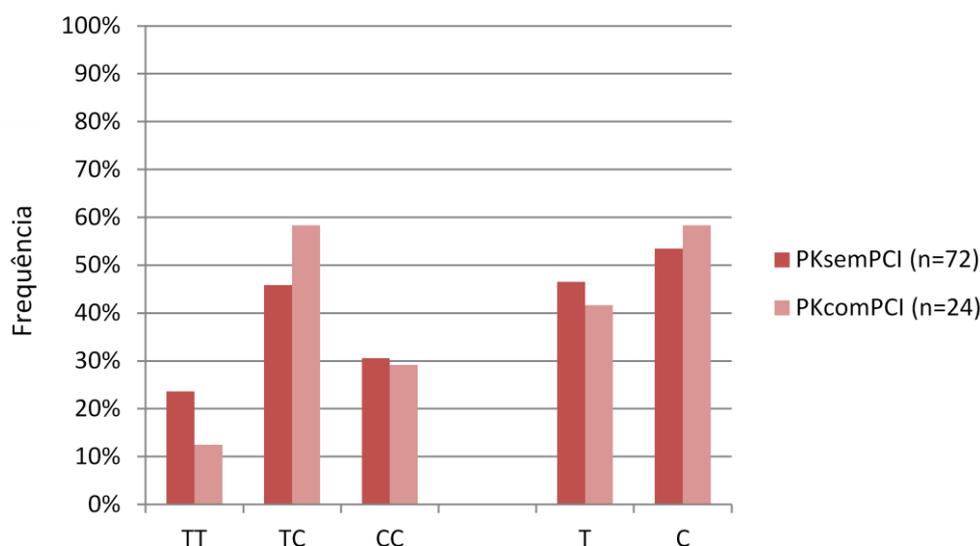


Figura 28 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.102T>C do gene *HTR2A* na subpopulação de doentes sem perturbação no controlo de impulsos (PK sem PCI) e na subpopulação de doentes com perturbação no controlo de impulsos (PK com PCI).

2.10. *GRIN2B* - Polimorfismo (c.366C>G) do sistema glutamatérgico na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos

Tal como para os SNPs anteriores, para este polimorfismo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas entre as duas populações. Observou-se que a frequência do genótipo CC foi de 4,2% na PK com PCI e de 18,9% na PK sem PCI (4,2% PK com PCI vs. 18,9% PK sem PCI; $p=0,112$; $OR=0,175$ (IC 95%=[0,667 – 43,171])) e que as frequências dos genótipos GG e CG foram idênticas nas duas populações (45,8% PK com PCI vs. 36,5% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,679$ (IC 95%=[0,267 – 1,724]) e 50% PK com PCI vs. 44,6% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,805$ (IC 95%=[0,320 – 2,024]), respetivamente).

Quanto às frequências alélicas, as diferenças encontradas também não foram estatisticamente significativas (**C**: 29,2% PK com PCI vs. 41,2% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=1,703$ (IC 95%=[0,843 – 3,440]); **G**: 70,8% PK com PCI vs. 58,8% PK sem PCI; $p=n. s.$; $OR=0,587$ (IC 95%=[0,291 – 1,186])).

As frequências genotípicas e alélicas deste SNP para as duas populações estão resumidas na figura 29.

RESULTADOS

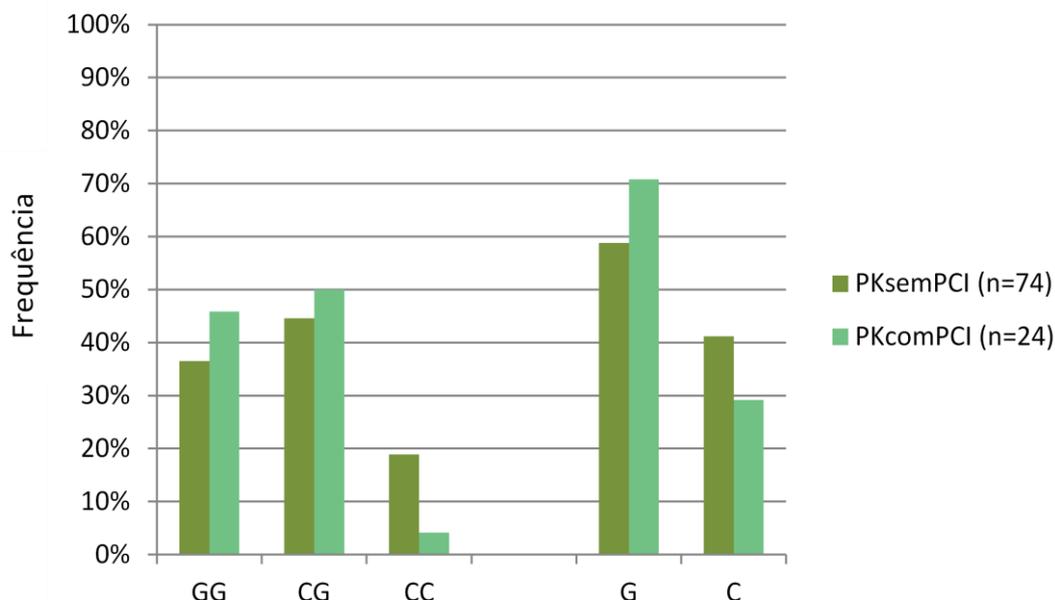


Figura 29 – Gráfico de distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.366C>G do gene *GRIN2B* na subpopulação de doentes sem perturbação no controlo de impulsos (PK sem PCI) e na subpopulação de doentes com perturbação no controlo de impulsos (PK com PCI).

2.11. GBA – Mutação (N370S) do gene da glucocerebrosidase na Doença de Parkinson e suscetibilidade para a Perturbação no Controlo de Impulsos

Analisando os dois doentes para os quais foi identificada a presença da mutação N370S em heterozigotia, e comparando-os com os outros 96 doentes, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos parâmetros de sono/fadiga, de demência, de ansiedade e depressão, bem como de idade de início dos sintomas e duração da doença ($p=0,235$; $p=0,417$; $p=0,351$; $p=0,838$; $p=0,312$ e $p=0,390$, respetivamente).

Comparando estes dois doentes entre si, observou-se que apenas um deles (PK022) apresenta algum tipo de perturbação no controlo de impulsos. Outros valores de interesse encontram-se apresentados na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados dos dois doentes com a mutação N370S e valores obtidos para algumas escalas de avaliação.

	Idade de início da doença	UPDRS II		UPDRS III		Hoehn & Yahr		Dose equivalente de levodopa	DRS-2
		On	Off	On	Off	On	Off		
PK022	42 anos	1	7	12	27	2	2	700 mg/dia	-0,35
PK092	63 anos	1	7	15,5	23,5	2	2	610 mg/dia	-0,39

UPDRS III – escala de avaliação motora; On: doente com medicação; Off: doente sem medicação.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A perturbação no controlo de impulsos (PCI), um conjunto de desordens comportamentais complexas (como o vício patológico no jogo, comer compulsivamente, hipersexualidade, compras compulsivas, cleptomania, piromania e *punding*), ocorre mais vulgarmente em doentes com Doença de Parkinson do que na população geral, tendo sido descrita uma prevalência de 13,6% nestes doentes.

Possíveis fatores de risco para o desenvolvimento desta perturbação em doentes com DP são o uso de agonistas da dopamina em substituição da levodopa, a idade mais precoce de início da DP e PCI pré-existentes e/ou desordens de uso de substâncias, ser do sexo masculino, impulsividade e depressão.

O que origina este tipo de comportamento em apenas uma pequena fração de doentes com DP poderá ser explicado pela existência de polimorfismos genéticos em sistemas de neurotransmissores.

Embora pouco frequentes, é importante estudar estes casos, uma vez que, quando ocorrem, são devastadores para a vida do doente e da sua família. Assim, a relevância deste projeto no âmbito forense prende-se com a questão da atribuição de inimizabilidade a doentes com Doença de Parkinson com perturbações no controlo de impulsos, uma vez que estes não têm qualquer controlo sobre os seus atos impulsivos, mesmo tendo consciência do que é correto ou errado.

Do nosso conhecimento, este projeto foi o primeiro a analisar todos estes polimorfismos e mutações num só estudo na população portuguesa, embora com uma coorte relativamente reduzida.

1. SNPs e o desenvolvimento da Doença de Parkinson

Após a análise dos resultados, foi possível inferir que nenhum dos SNPs analisados (o *DRD3* c.25A>G, o *HTR2A* c.102T>C e o *GRIN2B* c.366C>G) parece estar associado ao desenvolvimento da Doença de Parkinson, pelo menos na população portuguesa estudada.

Do nosso conhecimento, existem dois estudos que investigaram a associação do polimorfismo *DRD3* c.25A>G (rs6280) com o risco de desenvolver a Doença de Parkinson. Em nenhum deles foi encontrada qualquer associação (Keeling et al., 2009, McGuire et al., 2011); no entanto, num desses estudos (McGuire et al., 2011), os autores observaram uma diminuição de 60% no risco de DP, mas apenas entre os indivíduos brancos hispânicos homocigóticos para o alelo rs6280G. Os resultados obtidos neste trabalho, referentes a este polimorfismo, estão de acordo com os acima descritos. Relativamente aos outros dois polimorfismos analisados (c.102T>C do gene *HTR2A* e c.366C>G do gene *GRIN2B*), e para os quais também não se encontrou associação com a DP, não se conhecem publicações que os associem ao desenvolvimento da doença, pelo que outros estudos são necessários para validar as nossas observações.

2. Dados clínicos, SNPs e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos

Considerando o papel de cada um dos SNPs no desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos, até ao momento apenas se conhece um estudo em doentes com Doença de Parkinson para cada um dos polimorfismos analisados. Estes estudos foram realizados pelo mesmo autor (Lee et al., 2012, Lee et al., 2009) numa coorte coreana com 404 doentes com Doença de Parkinson e 559 indivíduos saudáveis.

No nosso estudo, após a análise dos grupos principais (doentes e controlos), dividiu-se a população de doentes em dois subgrupos: um, que engloba os doentes com algum tipo de perturbação no controlo de impulsos, e outro, que engloba os doentes que não as apresentam. Assim, foi possível comparar as frequências genotípicas e alélicas dos dois subgrupos, permitindo inferir a existência ou inexistência de uma associação entre os SNPs e a perturbação.

Tendo em conta os parâmetros demográficos nas duas subpopulações, verificou-se que existem diferenças significativas nas médias das idades, das idades de início dos sintomas, da duração da Doença de Parkinson e da dose de medicação total administrada. Assim, podemos inferir que doentes mais jovens e, conseqüentemente, com uma maior duração da doença, bem como doentes com uma dose mais elevada de medicação total, aparentam ter um maior risco de desenvolver algum tipo de perturbação no controlo de impulsos. Isto indica que estes doentes, possuindo um tempo superior de progressão da doença, poderão sofrer mais alterações morfológicas e bioquímicas a nível do SNC, que poderão culminar no desenvolvimento de perturbações associadas, como a perturbação no controlo de impulsos. De facto, sabe-se que alterações no sistema dopaminérgico, encontradas na DP, podem levar ao aparecimento de PCI. Em condições fisiológicas, a libertação fásica de dopamina ocorre no momento da antecipação da recompensa e receção de uma recompensa inesperada (Fiorillo et al., 2003). A supressão fásica ocorre quando uma recompensa é esperada mas não recebida (Pessiglione et al., 2006). Na DP, esta resposta fisiológica normal pode estar comprometida devido a doses excessivas de dopamina, resultantes de tratamento. Níveis elevados de dopamina podem ser explicados por um comprometimento da recaptção de dopamina, originada por degeneração de neurónios pré-sinápticos. Adicionalmente, os agonistas dopaminérgicos provocam a estimulação de recetores dopaminérgicos pós-sinápticos, o que também pode explicar a alteração desta resposta fisiológica (Lee et al., 2009).

No presente estudo foi, ainda, observado que os doentes que possuem perturbações no controlo de impulsos estão sujeitos a uma dose mais elevada de equivalente de levodopa quando comparados com os que não as possuem, podendo indicar que doentes que tomam doses mais elevadas de medicação possuem um maior risco de desenvolver a PCI.

Quanto ao sexo dos doentes e aos resultados obtidos para as escalas de sono/fadiga (NMS), demência (DRS-2), ansiedade e depressão (HADS), bem como ao tipo de fármacos administrados (agonistas dopaminérgicos vs. não agonistas), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. No entanto, é de referir que a frequência do sexo masculino no grupo de doente com PCI

(58,3%) foi superior à do grupo de doentes sem PCI (48,6%), embora no presente estudo não se tenha obtido significado estatístico; estes resultados vão ao encontro dos descritos por outros autores (Brewer and Potenza, 2008, Merims and Giladi, 2008, Vilas et al., 2012, Wolters et al., 2008), onde se considera o sexo masculino como um fator de risco para o desenvolvimento da PCI em doentes com DP.

Considerando a relação de cada um dos polimorfismos e a idade de início dos sintomas da Doença de Parkinson, apenas se observaram diferenças entre as médias de idade do genótipo TC (62,89±10,3 anos) e dos genótipos TT (57,86±10,9 anos) e CC (57,53±9,7 anos) do polimorfismo do gene *DRD3*. Com estes dados, poderemos afirmar que deficiências no sistema dopaminérgico estão associadas a um desenvolvimento mais precoce da doença de Parkinson, podendo ser um fator de risco para o desenvolvimento de PCI.

Relativamente às variantes genéticas analisadas e o desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos, não foram observadas quaisquer diferenças entre as frequências genotípicas e alélicas dos dois subgrupos, para cada um dos polimorfismos. Assim, para a nossa população, presume-se que estes SNPs não estarão envolvidos no desenvolvimento da perturbação no controlo de impulsos em indivíduos com a Doença de Parkinson.

Estes resultados estão em discordância com os estudos de Lee *et al.* (Lee et al., 2012, Lee et al., 2009). No estudo de 2009 (Lee et al., 2009), foi observado que o alelo A da variante *DRD3* c.25A>G era mais comum nos doentes com perturbações no controlo de impulsos do que nos doentes não afetados ($p=0,0234$). Após ajuste para idade e sexo, foi encontrada uma associação significativa entre o genótipo AA (no nosso estudo, corresponde ao genótipo TT) e o desenvolvimento de perturbações no controlo de impulsos para a população coreana ($p=0,0094$; OR=2,21 (IC 95%=[1,22 – 4,03])). Para a variante *GRIN2B* (c.366C>G), os autores (Lee et al., 2009) verificaram que o alelo C estava mais representado nos doentes com perturbações no controlo de impulsos do que nos doentes não afetados ($p=0,0011$), tendo sido encontrada uma associação significativa entre o genótipo CC e o desenvolvimento de perturbações no controlo de impulsos ($p=0,0087$; OR=2,14 (IC 95%=[1,21 – 3,78])). No estudo de 2012 (Lee et al., 2012), Lee *et al.* encontraram, para o polimorfismo do gene *HTR2A*, uma associação entre o alelo T e o aparecimento de comportamentos impulsivos, embora com uma significância marginal ($p=0,055$).

As divergências constatadas para cada um dos polimorfismos analisados podem, eventualmente, ser explicadas pela existência de um *background* genético diferente entre as populações portuguesa e coreana. O *background* genético consiste no conjunto de todos os alelos únicos de uma determinada população ou espécie, que num dado momento ocupam uma determinada área geográfica e que trocam livremente entre si os seus genes. Estando as populações portuguesa e coreana tão distantes uma da outra, será de esperar que cada uma delas possua um *background* genético característico que as diferencia entre

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

si. Além disso, a influência de fatores ambientais e a sua relação com os fatores genéticos devem ser sempre considerados, sobretudo em patologias multifatoriais e complexas como é o caso da DP.

3. Mutações da Doença de Gaucher e a sua influência na expressão clínica de doentes com Parkinson

Quanto às mutações associadas à Doença de Gaucher, pretendeu-se estudar a sua influência na progressão e severidade da Doença de Parkinson, tendo por base os valores obtidos para as escalas de avaliação da doença.

Relativamente à mutação N370S, no nosso estudo, foram encontrados dois doentes portadores (genótipo AG), representando uma frequência de 2% na população de doentes em estudo. Estes resultados assemelham-se aos descritos por Brás *et al.* (Bras et al., 2009), cuja frequência observada para esta mutação foi de 2,17% (5/230).

Não nos foi possível pesquisar as outras mutações analisadas no estudo de Brás *et al.*, sendo um objetivo em análises futuras.

A presença desta mutação em dois dos 100 indivíduos analisados, levou-nos a questionar se estaria associada a um perfil particular de expressão clínica, baseado nas características avaliadas (severidade da doença, dose de equivalente de levodopa e resultados para a DRS-2). No entanto, essas características são idênticas para ambos os doentes.

Relativamente à mutação L444P, no nosso estudo, não foi encontrada a mutação na população de doentes, muito possivelmente devido ao reduzido número de indivíduos da amostra. De facto, a frequência desta mutação nos doentes (n=230) no estudo de Brás *et al.* (Bras et al., 2009) é de 1,3%, pelo que a sua ausência na nossa população de doentes não é diferente da reportada.

Concluindo, na nossa população em estudo, não foi encontrada qualquer associação entre as variações genéticas estudadas e o desenvolvimento da Doença de Parkinson.

Considerando o grupo de doentes com e sem PCI, verificou-se que as variações estudadas não estão associadas ao desenvolvimento de perturbações no controlo de impulsos. Porém, foram observadas algumas diferenças estatisticamente significativas entre as duas subpopulações, para os parâmetros clínicos como a idade de início da doença e a dose de medicação total administrada, indicando que uma doença com um início mais precoce e uma dose mais elevada de equivalente de levodopa são fatores de risco para o desenvolvimento da PCI.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O reduzido número de indivíduos analisados neste trabalho torna-o limitativo e confere-lhe um baixo poder estatístico. Assim, será importante replicar este estudo, em populações mais alargadas, para esclarecer a importância destas variações genéticas no desenvolvimento de PCI em doentes com DP.

Um melhor conhecimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento destas complicações nos doentes com DP poderá, no âmbito forense, contribuir para esclarecer questões de atribuição ou não do estatuto de inimputabilidade a estes doentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAN HET ROT, M., MATHEW, S. J. & CHARNEY, D. S. 2009. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*, 180, 305-13.
- AARSLAND, D., PAHLHAGEN, S., BALLARD, C. G., EHRT, U. & SVENNINGSSON, P. 2012. Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol*, 8, 35-47.
- AHARON-PERETZ, J., BADARNY, S., ROSENBAUM, H. & GERSHONI-BARUCH, R. 2005. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology*, 65, 1460-1.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*, New York, Garland Science Publishing.
- ALCALAY, R. N., CACCAPPOLO, E., MEJIA-SANTANA, H., TANG, M., ROSADO, L., ORBE REILLY, M., RUIZ, D., ROSS, B., VERBITSKY, M., KISSELEV, S., LOUIS, E., COMELLA, C., COLCHER, A., JENNINGS, D., NANCE, M., BRESSMAN, S., SCOTT, W. K., TANNER, C., MICKEL, S., ANDREWS, H., WATERS, C., FAHN, S., COTE, L., FRUCHT, S., FORD, B., REZAK, M., NOVAK, K., FRIEDMAN, J. H., PFEIFFER, R., MARSH, L., HINER, B., SIDEROWF, A., PAYAMI, H., MOLHO, E., FACTOR, S., OTTMAN, R., CLARK, L. N. & MARDER, K. 2012. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology*, 78, 1434-40.
- ALMEIDA MDO, R. 2012. Glucocerebrosidase involvement in Parkinson disease and other synucleinopathies. *Front Neurol*, 3, 65.
- AMBERMOON, P., CARTER, A., HALL, W. D., DISSANAYAKA, N. N. & O'SULLIVAN, J. D. 2011. Impulse control disorders in patients with Parkinson's disease receiving dopamine replacement therapy: evidence and implications for the addictions field. *Addiction*, 106, 283-93.
- ANHEIM, M., ELBAZ, A., LESAGE, S., DURR, A., CONDROYER, C., VIALLET, F., POLLAK, P., BONAÏTI, B., BONAÏTI-PELLIE, C. & BRICE, A. 2012. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology*, 78, 417-20.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 2010. *High-Resolution Melting for Genotyping Applications* [Online].
- ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N. & PATEL, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5, 209-19.
- BAKIRI, Y., BURZOMATO, V., FRUGIER, G., HAMILTON, N. B., KARADOTTIR, R. & ATTWELL, D. 2009. Glutamatergic signaling in the brain's white matter. *Neuroscience*, 158, 266-74.
- BALREIRA, A., GASPAR, P., CAIOLA, D., CHAVES, J., BEIRAO, I., LIMA, J. L., AZEVEDO, J. E. & MIRANDA, M. C. 2008. A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet*, 17, 2238-43.
- BARBOSA, L. F., MEDEIROS, M. H. G. & AUGUSTO, O. 2006. Danos Oxidativos e Neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Química Nova*, 29, 1352-1360.
- BARRERO, F. J., AMPUERO, I., MORALES, B., VIVES, F., DE DIOS LUNA DEL CASTILLO, J., HOENICKA, J. & GARCIA YEBENES, J. 2005. Depression in Parkinson's disease is related to a genetic polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1). *Pharmacogenomics J*, 5, 135-41.
- BRAS, J., PAISAN-RUIZ, C., GUERREIRO, R., RIBEIRO, M. H., MORGADINHO, A., JANUARIO, C., SIDRANSKY, E., OLIVEIRA, C. & SINGLETON, A. 2009. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiol Aging*, 30, 1515-7.
- BRESSAN, R. A., ERLANDSSON, K., MULLIGAN, R. S., GUNN, R. N., CUNNINGHAM, V. J., OWENS, J., ELL, P. J. & PILOWSKY, L. S. 2003. Evaluation of NMDA receptors in vivo in schizophrenic patients with [123I]CNS 1261 and SPET: preliminary findings. *Ann N Y Acad Sci*, 1003, 364-7.
- BREWER, J. A. & POTENZA, M. N. 2008. The neurobiology and genetics of impulse control disorders: relationships to drug addictions. *Biochem Pharmacol*, 75, 63-75.
- BROCKMANN, K., SRULIJES, K., HAUSER, A. K., SCHULTE, C., CSOTI, I., GASSER, T. & BERG, D. 2011. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology*, 77, 276-80.
- CAUDLE, W. M. & ZHANG, J. 2009. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp Neurol*, 220, 230-3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOI, J. M., KIM, W. C., LYOO, C. H., KANG, S. Y., LEE, P. H., BAIK, J. S., KOH, S. B., MA, H. I., SOHN, Y. H., LEE, M. S. & KIM, Y. J. 2012. Association of mutations in the glucocerebrosidase gene with Parkinson disease in a Korean population. *Neurosci Lett*, 514, 12-5.
- CILIA, R., CHO, S. S., VAN EIMEREN, T., MAROTTA, G., SIRI, C., KO, J. H., PELLECCIA, G., PEZZOLI, G., ANTONINI, A. & STRAFELLA, A. P. 2011. Pathological gambling in patients with Parkinson's disease is associated with fronto-striatal disconnection: a path modeling analysis. *Mov Disord*, 26, 225-33.
- CLARK, L. N., ROSS, B. M., WANG, Y., MEJIA-SANTANA, H., HARRIS, J., LOUIS, E. D., COTE, L. J., ANDREWS, H., FAHN, S., WATERS, C., FORD, B., FRUCHT, S., OTTMAN, R. & MARDER, K. 2007. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 69, 1270-7.
- CLIFFORD, C. P. & NUNEZ, D. J. 1996. 5HT2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia. *The Lancet*, 347, 1830-1832.
- COOKE, S. F. & BLISS, T. V. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129, 1659-73.
- COSTA, A. P. P., GARCIA, A. H. C., COPRESKI, B. & BRUNONI, D. 2007. Estudo de Polimorfismos de DNA Associados aos Distúrbios do Desenvolvimento. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, São Paulo*, 7, 112-131.
- DANBOLT, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65, 1-105.
- DEHAY, B., MARTINEZ-VICENTE, M., CALDWELL, G. A., CALDWELL, K. A., YUE, Z., COOKSON, M. R., KLEIN, C., VILA, M. & BEZARD, E. 2013. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28, 725-32.
- DISSANAYAKA, N. N., O'SULLIVAN, J. D., SILBURN, P. A. & MELLICK, G. D. 2011. Assessment methods and factors associated with depression in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 310, 208-10.
- DJAMSHIDIAN, A., AVERBECK, B. B., LEES, A. J. & O'SULLIVAN, S. S. 2011. Clinical aspects of impulsive compulsive behaviours in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 310, 183-8.
- ENTREZGENE. 2013a. *DRD3 dopamine receptor D3* [Online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1814>. [Accessed August 2013].
- ENTREZGENE. 2013b. *GRIN2B glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B* [Online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2904>. [Accessed August 2013].
- FERRAGUTI, F. & SHIGEMOTO, R. 2006. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, 326, 483-504.
- FERRO, J. & PIMENTEL, J. 2006. *Neurologia - Princípios, Diagnóstico e Tratamento*, Lisboa, Lidel.
- FIORILLO, C. D., TOBLER, P. N. & SCHULTZ, W. 2003. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science*, 299, 1898-902.
- FORDER, J. P. & TYMIANSKI, M. 2009. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience*, 158, 293-300.
- GOKER-ALPAN, O., LOPEZ, G., VITHAYATHIL, J., DAVIS, J., HALLETT, M. & SIDRANSKY, E. 2008. The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol*, 65, 1353-7.
- GOKER-ALPAN, O., SCHIFFMANN, R., LAMARCA, M. E., NUSSBAUM, R. L., MCINERNEY-LEO, A. & SIDRANSKY, E. 2004. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet*, 41, 937-40.
- GOKER-ALPAN, O., STUBBLEFIELD, B. K., GIASSON, B. I. & SIDRANSKY, E. 2010. Glucocerebrosidase is present in alpha-synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, 120, 641-9.
- GOLDIN, E. 2010. Gaucher disease and parkinsonism, a molecular link theory. *Mol Genet Metab*, 101, 307-10.
- GUNDRY, C. N., VANDERSTEEN, J. G., REED, G. H., PRYOR, R. J., CHEN, J. & WITTEWER, C. T. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*, 49, 396-406.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HALPERIN, A., ELSTEIN, D. & ZIMRAN, A. 2006. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 426-8.
- HENKEL, J. 1998. Parkinson's disease. New treatments slow onslaught of symptoms. *FDA Consum*, 32, 13-8.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. & GELFAND, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7276-80.
- HOROWITZ, M., WILDER, S., HOROWITZ, Z., REINER, O., GELBART, T. & BEUTLER, E. 1989. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, 4, 87-96.
- JOHNSON, K. A., CONN, P. J. & NISWENDER, C. M. 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 8, 475-91.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. 2000. *Principles of Neural Science*, Appleton & Lange.
- KANO, O., IKEDA, K., CRIDEBRING, D., TAKAZAWA, T., YOSHII, Y. & IWASAKI, Y. 2011. Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011, 143547.
- KATZENSCHLAGER, R. 2011. Dopaminergic dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 310, 271-5.
- KEELING, B. H., VILARINO-GUELL, C., ROSS, O. A., WSZOLEK, Z. K., UITTI, R. J. & FARRER, M. J. 2009. DRD3 Ser9Gly and HS1BP3 Ala265Gly are not associated with Parkinson disease. *Neurosci Lett*, 461, 74-5.
- KEW, J. N. & KEMP, J. A. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 179, 4-29.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A. & ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- LACERDA, L., AMARAL, O., PINTO, R., OLIVEIRA, P., AERTS, J. & SA MIRANDA, M. C. 1994. Gaucher disease: N370S glucocerebrosidase gene frequency in the Portuguese population. *Clin Genet*, 45, 298-300.
- LANDOLT, H. P. & WEHRLE, R. 2009. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *Eur J Neurosci*, 29, 1795-809.
- LEE, J. Y., JEON, B. S., KIM, H. J. & PARK, S. S. 2012. Genetic variant of HTR2A associates with risk of impulse control and repetitive behaviors in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18, 76-8.
- LEE, J. Y., LEE, E. K., PARK, S. S., LIM, J. Y., KIM, H. J., KIM, J. S. & JEON, B. S. 2009. Association of DRD3 and GRIN2B with impulse control and related behaviors in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24, 1803-10.
- LEENTJENS, A. F. 2004. Depression in Parkinson's disease: conceptual issues and clinical challenges. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 17, 120-6.
- LESAGE, S., ANHEIM, M., CONDRUYER, C., POLLAK, P., DURIF, F., DUPUIITS, C., VIALLET, F., LOHMANN, E., CORVOL, J. C., HONORE, A., RIVAUD, S., VIDAILHET, M., DURR, A. & BRICE, A. 2011. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 20, 202-10.
- LWIN, A., ORVISKY, E., GOKER-ALPAN, O., LAMARCA, M. E. & SIDRANSKY, E. 2004. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab*, 81, 70-3.
- MADER, S. S. 2004. *Understanding Human Anatomy and Physiology*, McGraw-Hill.
- MAMOTTE, C. D. 2006. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin Biochem Rev*, 27, 63-75.
- MCGUIRE, V., VAN DEN EEDEN, S. K., TANNER, C. M., KAMEL, F., UMBACH, D. M., MARDER, K., MAYEUX, R., RITZ, B., ROSS, G. W., PETROVITCH, H., TOPOL, B., POPAT, R. A., COSTELLO, S., MANTHRIPRAGADA, A. D., SOUTHWICK, A., MYERS, R. M. & NELSON, L. M. 2011. Association of DRD2 and DRD3 polymorphisms with Parkinson's disease in a multiethnic consortium. *J Neurol Sci*, 307, 22-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MCNAMARA, P. 2011. *The Cognitive Neuropsychiatry of Parkinson's Disease*, Massachusetts Institute of Technology.
- MERIMS, D. & GILADI, N. 2008. Dopamine dysregulation syndrome, addiction and behavioral changes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 14, 273-80.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 1215.
- MOSLEY, R. L., HUTTER-SAUNDERS, J. A., STONE, D. K. & GENDELMAN, H. E. 2012. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a009381.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- NAKABAYASHI, T. I. K., CHAGAS, M. H. N., CORREA, A. C. L., TUMAS, V., LOUREIRO, S. R. & CRIPPA, J. A. 2008. Prevalência de depressão na doença de Parkinson. *Rev Psiquiatr*, 35, 219-27.
- NEUDORFER, O., GILADI, N., ELSTEIN, D., ABRAHAMOV, A., TUREZKITE, T., AGHAI, E., RECHES, A., BEMBI, B. & ZIMRAN, A. 1996. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM*, 89, 691-4.
- NEUMANN, J., BRAS, J., DEAS, E., O'SULLIVAN, S. S., PARKKINEN, L., LACHMANN, R. H., LI, A., HOLTON, J., GUERREIRO, R., PAUDEL, R., SEGARANE, B., SINGLETON, A., LEES, A., HARDY, J., HOULDEN, H., REVESZ, T. & WOOD, N. W. 2009. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*, 132, 1783-94.
- PARKINSON, J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14, 223-36; discussion 222.
- PESSIGLIONE, M., SEYMOUR, B., FLANDIN, G., DOLAN, R. J. & FRITH, C. D. 2006. Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans. *Nature*, 442, 1042-5.
- PLATT, S. R. 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J*, 173, 278-86.
- PREMIER BIOSOFT. *TaqMan Probes: Introduction, functioning and applications* [Online]. Available: http://premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html [Accessed in 20-09-2013].
- PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., HALL, W. C., LAMANTIA, A., MCNAMARA, J. O. & WHITE, L. E. 2008. *Neuroscience*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- RECZEK, D., SCHWAKE, M., SCHRODER, J., HUGHES, H., BLANZ, J., JIN, X., BRONDYK, W., VAN PATTEN, S., EDMUNDS, T. & SAFTIG, P. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*, 131, 770-83.
- REFERENCE, G. H. 2013. *DRD3* [Online]. Available: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DRD3#normalfunction> [Accessed 17-10-2013].
- RUIPEREZ, V., DARIOS, F. & DAVLETOV, B. 2010. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res*, 49, 420-8.
- SALADIN, K. S. 2009. *Anatomy & Physiology: The Unit of Form and Function*, McGraw-Hill.
- SCHAPIRA, A. H. 2011. *Parkinson's Disease*, Oxford University Press.
- SCHAPIRA, A. H. & GEGG, M. E. 2013. Glucocerebrosidase in the pathogenesis and treatment of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 3214-5.
- SCHRODER, B., WROCKLAGE, C., PAN, C., JAGER, R., KOSTERS, B., SCHAFFER, H., ELSASSER, H. P., MANN, M. & HASILIK, A. 2007. Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic*, 8, 1676-86.
- SEELEY, R. R., SETPHENS, T. D. & TATE, P. 2003. *Anatomia & Fisiologia*, Loures, Lusociência.
- SERRETTI, A., CALATI, R., MANDELLI, L. & DE RONCHI, D. 2006. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets*, 7, 1659-69.
- SIDRANSKY, E. 2004. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab*, 83, 6-15.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SIDRANSKY, E., NALLS, M. A., AASLY, J. O., AHARON-PERETZ, J., ANNESI, G., BARBOSA, E. R., BAR-SHIRA, A., BERG, D., BRAS, J., BRICE, A., CHEN, C. M., CLARK, L. N., CONDROYER, C., DE MARCO, E. V., DURR, A., EBLAN, M. J., FAHN, S., FARRER, M. J., FUNG, H. C., GAN-OR, Z., GASSER, T., GERSHONI-BARUCH, R., GILADI, N., GRIFFITH, A., GUREVICH, T., JANUARIO, C., KROPP, P., LANG, A. E., LEE-CHEN, G. J., LESAGE, S., MARDER, K., MATA, I. F., MIRELMAN, A., MITSUI, J., MIZUTA, I., NICOLETTI, G., OLIVEIRA, C., OTTMAN, R., ORR-URTREGER, A., PEREIRA, L. V., QUATTRONE, A., ROGAEVA, E., ROLFS, A., ROSENBAUM, H., ROZENBERG, R., SAMII, A., SAMADDAR, T., SCHULTE, C., SHARMA, M., SINGLETON, A., SPITZ, M., TAN, E. K., TAYEBI, N., TODA, T., TROIANO, A. R., TSUJI, S., WITTSTOCK, M., WOLFSBERG, T. G., WU, Y. R., ZABETIAN, C. P., ZHAO, Y. & ZIEGLER, S. G. 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 361, 1651-61.
- SIEGEL, A. & SAPRU, H. N. 2011. *Essential Neuroscience*, Lippincott Williams & Wilkins.
- SIENKIEWICZ-JAROSZ, H., SCINSKA, A., KURAN, W., RYGLEWICZ, D., ROGOWSKI, A., WROBEL, E., KORKOSZ, A., KUKWA, A., KOSTOWSKI, W. & BIENKOWSKI, P. 2005. Taste responses in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 40-6.
- SNELL, R. S. 2010. *Clinical Neuroanatomy*, Lippincott Williams & Wilkins.
- TOM, T. & CUMMINGS, J. L. 1998. Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. *Drugs Aging*, 12, 55-74.
- VAN DEN HEUVEL, O. A., VAN DER WERF, Y. D., VERHOEF, K. M., DE WIT, S., BERENDSE, H. W., WOLTERS, E., VELTMAN, D. J. & GROENEWEGEN, H. J. 2010. Frontal-striatal abnormalities underlying behaviours in the compulsive-impulsive spectrum. *J Neurol Sci*, 289, 55-9.
- VAN WEELY, S., AERTS, J. M., VAN LEEUWEN, M., PETERSON, M. E., GOLDBLATT, J., TAGER, J. M., BARRANGER, J. A. & SCHRAM, A. W. 1988. Molecular Properties of Lysosomal Glucocerebrosidase. *Lipid Storage Disorders*, 150, 51-56.
- VELAYATI, A., YU, W. H. & SIDRANSKY, E. 2010. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10, 190-8.
- VILAS, D., PONT-SUNYER, C. & TOLOSA, E. 2012. Impulse control disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S80-4.
- VOON, V., GAO, J., BREZING, C., SYMMONDS, M., EKANAYAKE, V., FERNANDEZ, H., DOLAN, R. J. & HALLETT, M. 2011. Dopamine agonists and risk: impulse control disorders in Parkinson's disease. *Brain*, 134, 1438-46.
- WARING, P. 2005. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys*, 434, 33-42.
- WEINTRAUB, D. 2008. Dopamine and impulse control disorders in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 64 Suppl 2, S93-100.
- WEINTRAUB, D. 2009. Impulse control disorders in Parkinson's disease: prevalence and possible risk factors. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 3, S110-3.
- WOLTERS, E., VAN DER WERF, Y. D. & VAN DEN HEUVEL, O. A. 2008. Parkinson's disease-related disorders in the impulsive-compulsive spectrum. *J Neurol*, 255 Suppl 5, 48-56.
- YAP, T. L., GRUSCHUS, J. M., VELAYATI, A., WESTBROEK, W., GOLDIN, E., MOAVEN, N., SIDRANSKY, E. & LEE, J. C. 2011. Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J Biol Chem*, 286, 28080-8.

