



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Karen Rafaella da Silva Diniz

Investigação de mutações no gene *ATP13A2* como um fator de risco para a Doença de Parkinson em pacientes brasileiros

Rio de Janeiro

2010

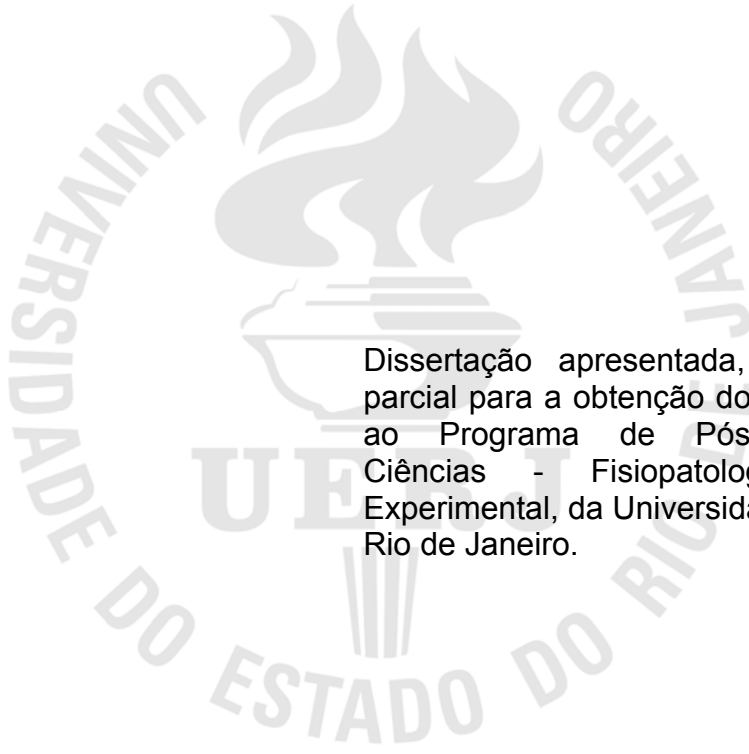
Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Karen Rafaella da Silva Diniz

**Investigação de mutações no gene *ATP13A2* como um fator de risco para a
Doença de Parkinson em pacientes brasileiros**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Coorientador: Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

D585 Diniz, Karen Rafaella da Silva
Investigação de mutações no gene *ATP13A2* como um
fator de risco para a Doença de Parkinson em
pacientes brasileiros / Karen Rafaella da Silva Diniz. – 2010.
120 f. : il.

Orientadora: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Coorientadora: Cíntia Barros Santos-Rebouças
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio
de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Parkinson – Genética – Teses. I. Pimentel, Márcia Mattos
Gonçalves. II. Santos-Rebouças, Cíntia Barros. III. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título

CDU 616.858-008.6:575

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Karen Rafaella da Silva Diniz

**Investigação de mutações no gene *ATP13A2* como um fator de risco para a
Doença de Parkinson em pacientes brasileiros**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de agosto de 2010.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Elie Cheniaux Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

A minha mãe, por todo amor dedicado, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu Salvador e Pai.

A meus pais por todo carinho e apoio, mesmo quando não entendiam, estavam sempre dispostos a me ouvir, pelo incentivo durante todos os meus estudos.

Meus irmãos por estarem sempre ao meu lado e transformarem minhas vitórias em suas também.

Ao Anderson por todos os ótimos momentos que me proporcionou em meio ao caos da escrita, por ter me entendido em todas as minhas crises e por ainda me amar (apesar de tudo, rsrsrs).

À Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel pela oportunidade e confiança de estar realizando este projeto e de fazer parte da sua equipe, pela orientação e conselhos durante o desenvolvimento deste projeto.

À Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos pela ajuda, atenção e esclarecimentos de dúvidas.

Aos meus irmãos em Cristo Jesus que oraram e se alegraram com as minhas vitórias.

Às minhas amigas da FFP Amanda, Camila e Luana por todo o incentivo e por me ouvirem ao longo desses dois anos.

À Cristiane e Adriana por toda a ajuda durante esses dois anos, por tudo que me ensinaram, pelos momentos divertidos na bancada e durante as aulas. Muito obrigada mesmo, vocês são participantes ativas da minha formação.

Ao Mário, Mariana e Natalia por todas as palavras de consolo nos momentos difíceis. Muito obrigada Nat pela ajuda nos experimentos, pelas ligações durante o fim de semana, pelas consultas indiretas na sua psicóloga (rsrs); Mariana obrigada por me ensinar que eu posso errar, por todas as vezes que conversou comigo; Mário, sua paciência é algo inexplicável, muito obrigado por ela, pelas análises, por ler minha dissertação, por me atender as inúmeras vezes que liguei.

À Claudia e Karla (Clauduxa e Miguxa), o que seria do SERVGEN sem vocês. Muito obrigada pela alegria que vocês transmitem por fazer de nosso ambiente de trabalho um lugar maravilhoso. O "lab" não tem graça sem vocês. Obrigada pelas conversas e atenção.

À Jussara, Richard, Flávia e Jussiara pelo apoio técnico neste e em outros trabalhos, por sempre estarem dispostos a transmitir seus conhecimentos, pelos conselhos nas horas difíceis e pela agradável companhia no dia-a-dia.

À Paloma, Marcela, Andressa, Bia, Fábio e Mariana Marinho pela amizade, pelo apoio e ajuda no dia-a-dia.

À Amélia por ter tido muita paciência comigo, por ter respondido meus inúmeros e-mails que mandei ao longo desses dois anos.

À Prof.^a Dra. Ana Carolina Paulo Vicente e à técnica Rosa, pelo auxílio e colaboração na realização do sequenciamento automático.

À Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA/PDTIS – FioCruz, pela utilização do Sistema de Sequenciamento Automático.

Ao CNPq, cujo apoio financeiro foi indispensável para a realização deste trabalho.

A todos os médicos e neurologistas, pela importante colaboração.

Aos pacientes e aos controles sem os quais este trabalho não teria sido realizado, e aos seus familiares, por entenderem a importância das investigações.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Clínica e Experimental, sem os quais, a minha formação não seria possível.

RESUMO

DINIZ, Karen Rafaella da Silva. *Investigação de mutações no gene ATP13A2 como um fator de risco para a Doença de Parkinson em pacientes brasileiros*. 2010, 112 f. Dissertação de Mestrado em Genética Humana – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A doença de Parkinson (DP) é a desordem neurodegenerativa motora mais frequente, com uma prevalência de, aproximadamente, 1% entre indivíduos com mais de 60 anos de idade, aumentando para 4 a 5% entre os indivíduos com idade superior a 85 anos. Esta condição é caracterizada pela perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e pela presença de inclusões protéicas ricas em α -sinucleína nos neurônios sobreviventes. Pouco se sabe sobre a etiologia e a patogênese da DP. A maioria dos casos aparece esporadicamente, podendo estar associados a diversos fatores de risco ambientais e genéticos. Na última década, estudos de ligação identificaram 15 *loci* cromossômicos (PARK1 a PARK15) relacionados à DP e, nestes, um novo gene, *ATP13A2*, tem sido associado a casos de DP de início precoce. Esse gene está situado no 1p36 e codifica a proteína ATPase tipo-P da subfamília P₅, de localização lisossômica, que é expressa em diversos tecidos, principalmente no cérebro. Mutações em *ATP13A2* levam à formação de proteínas truncadas que ficam retidas no retículo endoplasmático e posteriormente são degradadas pelo proteossomo, podendo causar a disfunção proteossômica, decorrente da sobrecarga gerada pela proteína mutante, ou causar a disfunção lisossômica, ambas gerando agregação tóxica. Este trabalho tem como objetivo realizar a análise molecular do gene *ATP13A2* em uma amostra de 116 pacientes brasileiros com DP, de manifestação precoce (<50 anos), de forma a avaliar se mutações neste gene representam um fator de risco para a DP. O DNA foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico ou de saliva e a análise molecular dos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 e 27, bem como, dos limites íntron-éxons foi realizada por sequenciamento automático dos produtos da PCR. Identificamos oito variantes de sequência: quatro variantes intrônicas (uma no íntron 2, uma no íntron 13 e duas no íntron 27) e quatro variantes silenciosas (uma no éxon 3, 16, 26 e 27). Com base em dados da literatura e através de análises *in silico* e comparação com amostras controle, classificamos a alteração intrônica c.3084-3C>T, e as alterações silenciosas c.2970G>A e c.3192C>T como não patogênicas; as alterações intrônicas c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43 insC e c.3083+24C>T, e as alterações silenciosas c.132A>G e c.1610G>T foram classificadas como provavelmente não patogênicas. Nosso achados corroboram àqueles encontrados em outras populações e indicam que mutações no gene *ATP13A2* não são uma causa comum de DP na amostra de pacientes brasileiros analisados. No entanto, se faz necessário estender nossas análises para outras regiões gênicas, a fim de determinar o real papel deste gene na etiologia da DP em nossa população.

Palavras-chave: *ATP13A2*. Doença de Parkinson

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative movement disorder with a prevalence of, approximately, 1% among individuals older than 60 years, increasing to 4% or 5% among individuals older than 85 years. This condition is characterized by selective loss of dopaminergic neurons and the presence of protein inclusions rich in α -synuclein in the survivors neurons. Little is known about the etiology and pathogenesis of PD. Most cases appear sporadically and may be associated with various environmental and genetic risk factors. In the last decade, linkage studies have identified 15 chromosomal *loci* (PARK1 the PARK15) related to PD and *ATP13A2* is one of the most recent genes associated with cases of early onset PD. The *ATP13A2* gene is located at 1p36 and encodes the ATPase protein (P type of P₅ family) located in lysosome which is expressed in different tissues, especially in brain. Mutations in this gene lead to the formation of truncated proteins that are retained in the endoplasmic reticulum and are subsequently degraded by the proteasome. This may cause proteosomal dysfunction, resulting from the overload generated by the mutant protein, or can cause lysosomal dysfunction, both generating toxic aggregation. This study aims to perform molecular analysis of *ATP13A2* gene in a sample of 116 Brazilian patients with early onset PD (<50 years), to assess whether mutations in this gene represent a risk factor for PD. The DNA was extracted from peripheral blood or saliva and molecular analysis of exons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 and 27 was conducted by direct sequencing of PCR products. In this study we identified eight sequence variants in *ATP13A2* gene: four intronic variants (one in intron 2, one in intron 13 and two in intron 27) and four silent variant (exon 3, 16, 26 and 27). Based on literature data and the results obtained from in silico analysis and studies of control samples, we classified the intronic alteration c.3084-3C>T and the silent variants c.2970G>A and c.3192C>T as non-pathogenic; the intronic alterations c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43 insC e c.3083+24C>T and the silent variants c.132A>G e c.1610G> as probably non-pathogenic. The data obtained in our study corroborate those found in other populations and show that mutations in the *ATP13A2* are not a common cause of PD in the sample of Brazilian patients analysed. However, it is essential to extend our analysis to other gene regions in order to determine the actual role of this gene in the etiology of PD in our population.

Keywords: *ATP13A2*. Parkinson's disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da via nigroestriatal.....	18
Figura 2	A) Representação das fases assintomáticas e sintomáticas da DP. B) Diagrama mostrando as áreas do cérebro afetadas pela neurodegeneração.....	19
Figura 3	Vias comuns ligadas à patogênese da DP.....	24
Figura 4	Esquema representativo da estrutura do gene <i>ATP13A2</i> , seus 29 éxons, mostrando a região do cromossomo 1 onde ele se encontra.....	29
Figura 5	Diagrama da proteína <i>ATP13A2</i> indicando seus domínios.....	30
Figura 6	Esquema do gene <i>ATP13A2</i> mostrando os éxons estudados neste trabalho e o tamanho de cada fragmento amplificado pela PCR.....	38
Figura 7	Esquema mostrando as condições de ciclagens da PCR de cada éxon utilizada nesse estudo.....	39
Figura 8	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.2970G>A em heterozigose e C) em homozigose.....	60
Figura 9	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.3192C>T em heterozigose e C) em homozigose.....	60
Figura 10	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.3084-3C>T em heterozigose e C) em homozigose.....	61
Figura 11	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.106-30G>T em heterozigose.....	62
Figura 12	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração 1306+42_1306+43insC em heterozigose.....	62
Figura 13	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.3083+24C>T em heterozigose	63
Figura 14	Eletoferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>ATP13A2</i> . B) Alteração c.132A>G em heterozigose.....	63

Figura 15 Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR.
A) Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. B) Alteração c.1610G>T em heterozigose..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Loci</i> e genes já descritos envolvidos na DP	22
Tabela 2	Estudos realizados de triagem de mutações no gene <i>ATP13A2</i>	33
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos éxons estudados do gene <i>ATP13A2</i>	39
Tabela 4	Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 e 27 do gene <i>ATP13A2</i>	40
Tabela 5	Resultados da análise das seqüências dos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 e 27 do gene <i>ATP13A2</i> em 116 pacientes, de ambos os sexos, com DP idiopática	45
Tabela 6	Variantes de seqüência encontradas neste estudo e suas características principais	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A –	adenina ou argenina (quando referindo ao nome do alelo)
AD –	autossômica dominante
AR –	autossômica recessiva
Arg –	Arginina
<i>ATP13A2</i> –	gene da proteína ATPase tipo 13A2 (<i>ATPase type 13A2 gene</i>)
C -	citosina
°C -	grau Celsius
cM -	centimorgan
CONEP –	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>dbSNP</i> –	banco de dados de polimorfismo de base única (<i>The Single Nucleotide Polymorphism database</i>)
del –	deleção
<i>DJ1</i> -	oncogene DJ1
DNA -	ácido desoxirribonucléico
dNTPs –	desoxirribonucleotídeos
DP -	Doença de Parkinson
dup -	duplicação
EDTA -	ácido etileno-diamino tetracético
ESE -	acentuador exônico de encadeamento
<i>FBXO7</i> -	gene da proteína 7 caixa-F (<i>F-Box Only Protein 7 gene</i>)
G –	guanina
<i>GBA</i> –	gene da glicocerebrosidase (<i>glucocerebrosidase gene</i>)
<i>GIGYF2</i> –	gene da proteína GYF tipo 2 de interação com GRB10 (<i>GRB10-Interacting GYF Protein 2 gene</i>)
Gly -	glicina
<i>HTRA2</i> –	gene da HTRA serina peptidase 2 (<i>HTRA Serine Peptidase 2 gene</i>)
Ins -	inserção
kb -	quilobase
KRS –	síndrome de Kufor-Rakeb
L -	leucina

<i>LRRK2</i>	– gene da quinase tipo 2 rica em repetições de leucina (<i>leucin-rich repeat kinase 2 gene</i>)
M	– molar
Met	- metionina
Min	- minuto
mL	- mililitro
mM	– milimolar
MPTP	- 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina
<i>OMIM</i>	– Herança Mendeliana Humana on-line (<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>)
p	- braço curto de um cromossomo
pb	- par de bases
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pH	- potencial hidrogeniônico
<i>PINK1</i>	– gene da quinase induzida por proteína 1 (<i>PTEN-induced putative kinase 1 gene</i>)
<i>PLA2G6</i>	- gene da fosfolipase A2 de grupo VI (<i>Group VI Phospholipase A2 gene</i>)
<i>PRKN</i>	– gene parkin (<i>Parkin gene</i>)
q	- braço longo de um cromossomo
RFLP	- polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA _m	- ácido ribonucléico mensageiro
rpm	- rotações por minuto
seg	- segundos
SNC	- sistema nervoso central
<i>SNCA</i>	– gene da proteína α-sinucleína (<i>α-synuclein gene</i>)
SNpc	– Substância negra, parte compacta (<i>substantia nigra pars compacta</i>)
SNP	– Polimorfismo de base única
<i>SRP</i>	– gene da proteína sepiapterina redutase (<i>Sepiapterin reductase gene</i>)
T	- timina
TE	- tampão tris, EDTA
TBE	- tampão tris-ácido bórico-EDTA
Thr	- treonina
Tris	- trihidroximetil aminometano
Tyr	- tirosina

U –	unidade
<i>UCHL1</i> –	gene da ubiquitina carboxil-terminal esterase L1 (<i>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 gene</i>)
UERJ -	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
V -	Valina
v -	volt
μg –	microgram
μL -	microlitro
μM -	micromolar
ng –	nanograma
pmol –	picomol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1.1 A Doença de Parkinson	17
1.2 A etiologia da Doença de Parkinson	20
1.2.1 <u>Fatores ambientais</u>	20
1.2.2 <u>Fatores genéticos</u>	21
1.3 As formas monogênicas e as vias moleculares envolvidas na DP	23
1.3.1 <u>Agregação da α-sinucleína e DP</u>	24
1.3.2 <u>Sistema ubiquitina-proteossomo e DP</u>	25
1.3.3 <u>Disfunção mitocondrial e DP</u>	26
1.3.4 <u>A via lisossômica e DP</u>	27
1.4 O gene <i>ATP13A2</i>	28
1.4.1 <u>Mutações no gene <i>ATP13A2</i> e a síndrome de Kufor-Rakeb</u>	30
1.4.2 <u>Mutações no gene <i>ATP13A2</i> e a Doença de Parkinson</u>	31
1.4.3 <u>O gene <i>ATP13A2</i> e a via lisossômica</u>	34
2 OBJETIVOS	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Pacientes e Controles	36
3.2 Extração do DNA genômico	37
3.3 Estimativa da concentração e da integridade do DNA	37
3.4 Rastreamento de mutações no gene <i>ATP13A2</i>	38
3.4.1 <u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u>	38
3.4.2 <u>Análise da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação</u>	41
3.4.3 <u>Purificação dos produtos da PCR</u>	41
3.4.4 <u>Reação de Seqüenciamento</u>	41
3.4.5 <u>Análise das sequências</u>	42
3.5 Ferramentas eletrônicas	43
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS	70

8 ANEXOS	80
Anexo A Termo de consentimento para pacientes com DP	80
Anexo B Termo de consentimento para controles sem DP	81
Anexo C Carta do Comitê de Ética em pesquisa da UERJ com a aprovação do projeto	82
Anexo D Resultado da análise da mutação c.1610G>T em indivíduos saudáveis (amostra controle)	83
Anexo E Artigo submetido a revista <i>Neuroscience Letters</i>	86

INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) é a doença neurodegenerativa motora mais frequente (Tanner *et al.*, 2000), com uma prevalência de aproximadamente 1% na população acima de 65 anos, aumentando para 4 a 5% entre os indivíduos com idade igual ou superior a 85 anos (Fahn, 2003). A idade média de manifestação da doença é de 60 anos, embora 4% dos pacientes desenvolvam a doença antes dos 50 anos (Van Den Eeden *et al.*, 2003). Com o aumento da expectativa de vida da população mundial espera-se que o número de pacientes duplique até 2030 (Dorsey *et al.*, 2007). Esta desordem acomete ambos os sexos, contudo, alguns estudos sugerem que a DP é 1,5 a 2 vezes mais frequente em homens do que em mulheres (Van Den Eeden *et al.*, 2003; Twelves *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007). Este fato tem sido atribuído, em parte, a um efeito neuroprotetor do hormônio estrogênio (Shulman, 2007).

1 A DOENÇA DE PARKINSON

A PD é caracterizada por um fenótipo clínico que consiste de tremor de repouso, bradicinesia (lentidão na iniciação e execução do movimento), rigidez e instabilidade postural (Fahn, 2003). Suas características patológicas incluem a despigmentação da substância negra *pars compacta*, devido à perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos e a presença de inclusões protéicas citoplasmáticas globulares ou filamentosas denominadas corpúsculos ou neuritos de Lewy, respectivamente, nos neurônios sobreviventes (Forno, 1996) (**Figura 1**). A diminuição nos níveis de dopamina no sistema nervoso leva a anomalias nos circuitos motores o que resulta no fenótipo da doença (Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

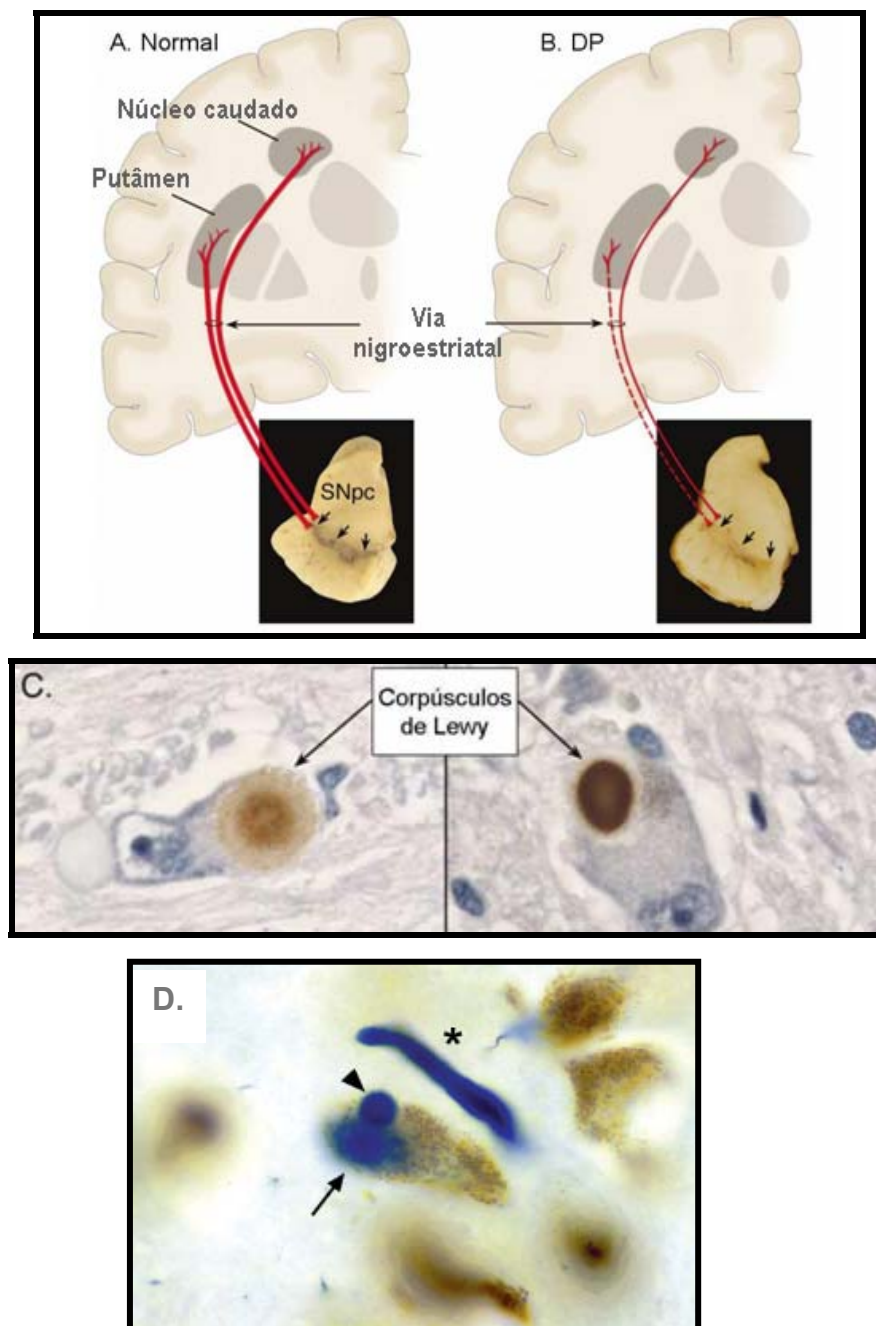


Figura 1: A) Representação esquemática da via nigrostriatal (em vermelho). Esta fotografia demonstra a pigmentação normal da substância negra *par compacta* (SNpc), produzida por neuromelanina dentro dos neurônios dopaminérgicos. B) Representação esquemática da via nigrostriatal degenerada (em vermelho) devido a uma acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que se projetam no putâmen (linha tracejada) e uma perda muito mais modesta dos neurônios que se projetam para o núcleo caudado (linha vermelha fina e contínua). C) Imunohistoquímica de inclusões intraneuronais denominadas corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da SNpc. D) Imunohistoquímica de inclusões intraneuronais denominadas neuritos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da SNpc (**Fonte:** Adaptado de Braak *et al.*, 2002; Dauer *et al.*, 2003).

Em 2003 e 2004, Braak e colaboradores publicaram dois importantes estudos que rediscutiram o estagiamento neuropatológico da DP. A partir da análise de amostras de tecidos cerebrais *pos mortem* de pacientes com DP, os autores constataram, na fase inicial da doença, a presença dos neuritos Lewy em pequeno número na porção caudal do tronco cerebral. A progressão da doença foi dividida em seis estágios, separados em duas fases: a pré-sintomática, que inclui os estágios 1 e 2, e a sintomática, que se inicia a partir do estágio 3, onde são encontrados os primeiros corpúsculos de Lewy na substância negra *pars compacta*, cuja evolução nos estágios mais avançados, atingem o córtex cerebral (**Figura 2**). Se fosse possível diagnosticar a DP na fase pré-sintomática, a perda neuronal na substância negra poderia ser prevenida (Braak *et al.*, 2003).

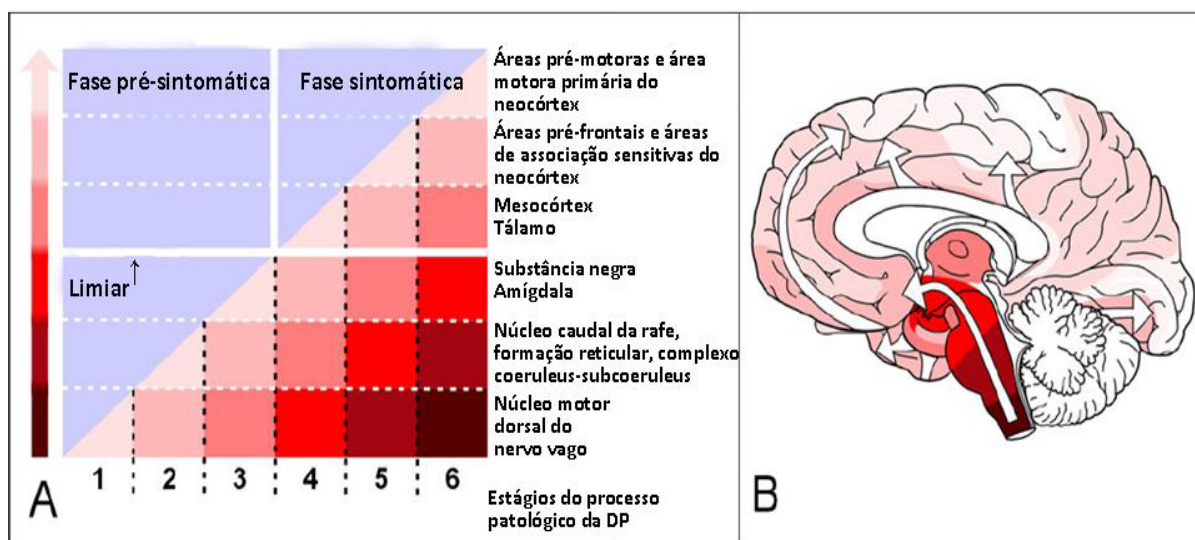


Figura 2: A) Representação das fases assintomáticas e sintomáticas da DP, marcado pela presença dos neuritos de Lewy. O aumento da inclinação e da intensidade das áreas coloridas abaixo da diagonal indicam a gravidade crescente da patologia em regiões do cérebro mais vulneráveis. B) Diagrama mostrando as áreas do cérebro afetadas (setas brancas). As áreas sombreadas correspondem à gravidade da patologia que também é mostrado em A (**Fonte:** adaptado de Braak *et al.*, 2004).

A DP é uma desordem crônica e progressiva, para a qual não existe cura. O principal tratamento para esta desordem é a terapia de reposição de dopamina e a droga mais utilizada é a levodopa. Grande parte dos pacientes apresenta uma boa resposta à terapia, no entanto, ao longo do tempo a terapia se torna cada vez menos eficaz (Olanow *et al.*, 2004). O diagnóstico definitivo requer a

análise *post mortem* de tecido cerebral para a visualização de perda neuronal e despigmentação da substância negra, além da presença dos corpúsculos e neuritos de Lewy, o que juntos, distinguem a DP de outras formas de parkinsonismo (Hughes *et al.*, 2002).

1.1 A etiologia da DP

A DP caracteriza-se como uma desordem de etiologia complexa, na qual interações entre fatores genéticos e ambientais, somado ao envelhecimento, estão envolvidas no seu desenvolvimento (Gasser, 2009). As descobertas ocorridas nos últimos anos têm reforçado que a contribuição genética na DP é significativa, representando um grande passo no entendimento dos mecanismos biológicos associados a esta patologia (Gosal *et al.*, 2006; Klein & Lohmann-Hedrich, 2007).

1.1.1 Fatores ambientais

Algumas toxinas têm sido consideradas fatores etiológicos para DP, entre elas, a toxina MPTP (1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina), cuja exposição leva à perda de neurônios dopaminérgicos (Langston *et al.*, 1983). A partir da identificação desta toxina diversas pesquisas epidemiológicas têm sido realizadas na tentativa de determinar quais fatores ambientais podem desempenhar um papel importante na etiologia da DP. A vida rural, a utilização de pesticidas, o consumo de água de poço e certas profissões, incluindo a mineração e a soldagem, estão associadas com um aumento no risco da DP (Barbeau *et al.*, 1987; Semchuk *et al.*, 1992; Priyadarshi *et al.* 2001; Firestone *et al.*, 2005; Jankovic, 2005; Dick 2006; Kamel *et al.*, 2006).

Em contrapartida, outros fatores ambientais atuam como agentes protetores. O tabagismo e a ingestão de cafeína estão inversamente associados com o risco de desenvolver esta desordem, entretanto, não há uma explicação clara para esta relação inversa (Allam *et al.*, 2004; Ritz *et al.*, 2007; Hancock *et al.*, 2007; Saaksjarvi *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado que pessoas com uma taxa elevada de ácido úrico no plasma sanguíneo tendem a ter menor risco de desenvolver DP,

sugerindo que as propriedades antioxidantes do ácido úrico estejam relacionadas ao efeito protetor (Davis *et al.* 1996; De Lau *et al.* 2005; Weisskopf *et al.* 2007).

1.1.2 Fatores genéticos

Na última década, avanços significativos têm sido alcançados no entendimento da patogênese da DP e a maior parte deles foi possível graças à identificação de mutações em genes relacionados a formas monogênicas da doença com um padrão claro de herança mendeliana (Gasser, 2009). As formas monogênicas de parkinsonismo representam cerca de 10% dos casos de DP. No total, quinze *loci* cromossômicos (PARK1 a PARK15) e um gene, *GBA*, ligados à DP foram identificados (Lesage *et al.*, 2009) (**Tabela 1**). Nestes, sete estão associados às formas recessivas de parkinsonismo: *PRKN*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7* e *POLG1*, enquanto os genes *SNCA*, *UCHL1*, *LRRK2* e *GBA* apresentam padrão de herança autossômica dominante.

Tabela 1: Loci e genes envolvidos na DP

<i>Loci</i>	<i>Gene</i>	Localização cromossômica	Formas de DP*	Referência
PARK1 (=PARK4)	<i>SNCA</i>	4q21	AD	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997
PARK2	<i>PRKN</i>	6q25–q27	AR	Kitada <i>et al.</i> , 1998
PARK3	<i>SPR?</i>	2p13	AD	Gasser <i>et al.</i> , 1998
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p14	AD	Leroy <i>et al.</i> , 1998
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35–p36	AR	Valente <i>et al.</i> , 2004
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	AR	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	AD	Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2004 ; Zimprich <i>et al.</i> , 2004
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	AR	Ramirez <i>et al.</i> , 2006
PARK10	-	1p32	AD?	Hicks <i>et al.</i> , 2002
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q36–q37	AD?	Lautier <i>et al.</i> , 2008
PARK12	-	Xq	Ligada ao X?	Pankratz <i>et al.</i> , 2002
PARK13	<i>HTRA2</i>	2p13	AD?	Strauss <i>et al.</i> , 2005
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	AR	Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2008
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12–q13	AR	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2008
-	<i>GBA</i>	1q21	AD	Aharon-Peretz <i>et al.</i> , 2005

* AD – Autossômica dominante / AR – Autossômica recessiva.

Fonte: Adaptado de Gasser (2009); Lesage & Brice (2009).

Além dos fatores genéticos monogênicos, existe uma teoria que propõe que doenças neurológicas comuns, como a DP, podem ser determinadas pelo efeito de variantes genéticas comuns na população (Bonifati *et al.*, 2010). Essas variantes genéticas comuns podem representar fatores de susceptibilidade ou modificadores da doença, afetando a penetrância, a idade de manifestação, a gravidade e a progressão da doença.

Recentemente, três amplas meta-análises de associação genômica para a DP foram realizadas na população japonesa, europeia e norte-americana (Satake *et al.*,

2009; Simón-Sánchez *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010), sendo analisados mais de 500.000 SNPs. Foram identificadas variantes comuns em três *loci* (*SNCA*, *PARK16* e *LRRK2*) como sendo importantes fatores genéticos de risco para a doença. De acordo com esses estudos, o gene *SNCA* mostrou a mais forte associação com a DP, confirmando que SNPs neste gene são fatores de suscetibilidade à doença nas populações estudadas.

As meta-análises de associação genômica utilizam uma alta tecnologia de genotipagem e fornecem evidências robustas sobre a associação de variantes genéticas de risco com doenças complexas. Sem dúvida alguma, a identificação de variantes genéticas comuns relacionadas a doenças complexas de alta incidência na população, como Diabete Mellitus, doença de Alzheimer e doença de Parkinson é um importante passo na compreensão dos processos biológicos subjacentes a estas desordens e representa uma contribuição científica valiosa que pode resultar em múltiplos desdobramentos.

1.2 As formas monogênicas e as vias moleculares envolvidas na DP

As proteínas codificadas pelos genes associados à DP exercem papéis importantes em determinadas vias metabólicas, incluindo a dinâmica de vesículas e lipídios (α -sinucleína), o sistema ubiquitina-proteossomo (*Parkin*, *DJ-1* e *UCHL1*), a via de sinalização celular (*LRRK2*), o estresse oxidativo, o funcionamento mitocondrial (*DJ-1*, *PINK1*, *PRKN* e *HTRA2*) e a via lisossômica (*GBA* e *ATP13A2*) (**Figura 3**) (Farrer, 2006). Elucidar como defeitos nessas vias levam à perda de neurônios dopaminérgicos e ao acúmulo de α -sinucleína continua a ser um dos maiores desafios da pesquisa na DP (Dauer *et al.* 2003; Dawson *et al.* 2003; Cookson, 2005).

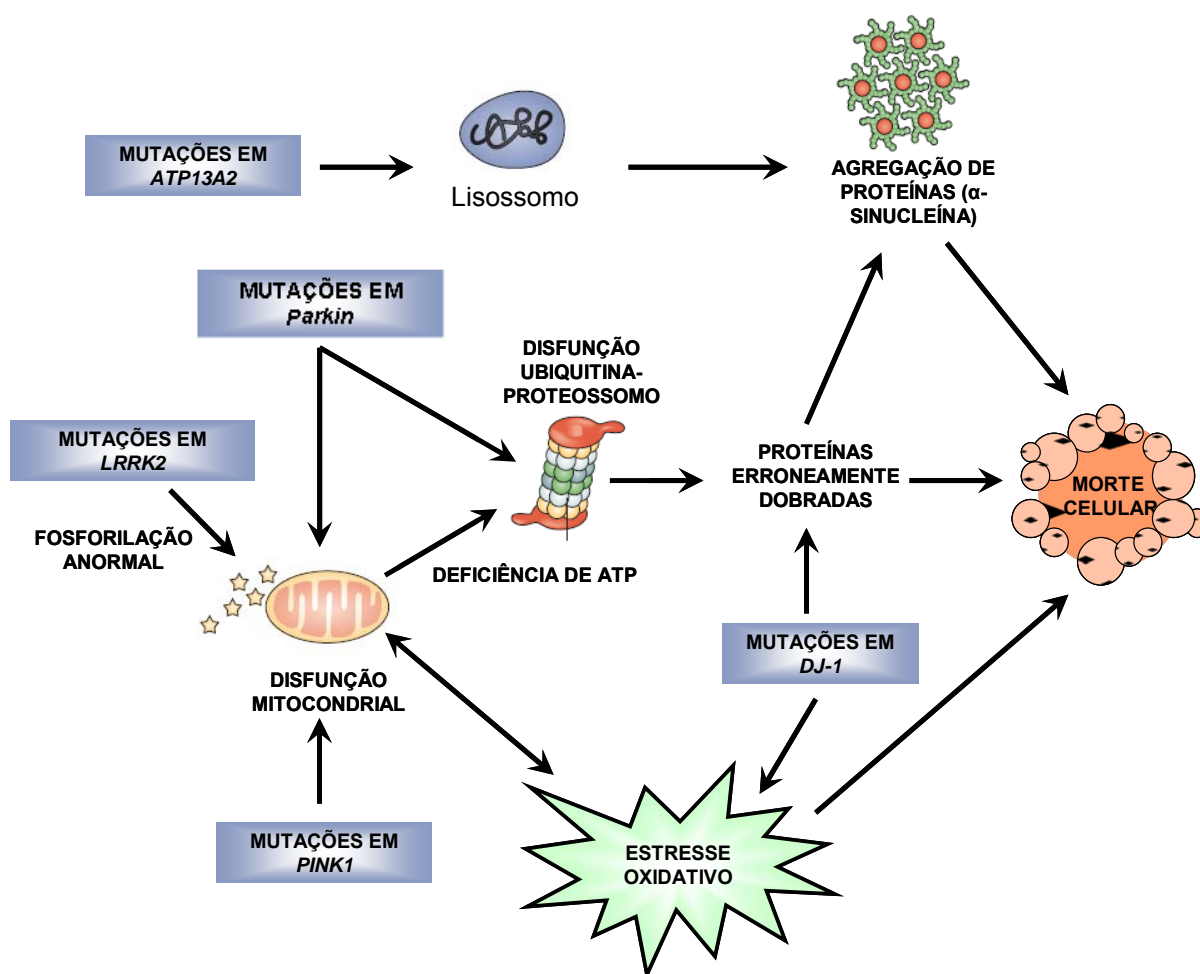


Figura 3: Vias comuns ligadas à patogênese da DP. (Fonte: Adaptado de Farrer, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

1.2.1 Agregação da α -sinucleína e DP

O gene *SNCA* (OMIM 168601), codificador da α -sinucleína foi o primeiro gene a ser associado com a DP (Polymeropoulos *et al.*, 1997). A *SNCA* é uma proteína, abundantemente expressa no sistema nervoso dos vertebrados, a qual acredita-se participar da maturação de vesículas pré-sinápticas, funcionando como moduladora negativa da liberação de neurotransmissores, em especial, a dopamina (Vekrellis *et al.*, 2004). Duas categorias de mutações são conhecidas neste gene, as mutações de ponto, que levam a variações na proteína codificante, e as duplicações e triplicações que levam a uma superexpressão da proteína (Polymeropoulos *et al.*,

1997; Singleton *et al.* 2003; Biskup *et al.*, 2008). Essas alterações também reduzem a afinidade da α -sinucleína pelos lipídios, resultando (i) na ligação deficiente desta proteína com as vesículas, prejudicando a liberação de neurotransmissores, cujo acúmulo no citosol pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio e consequentemente à morte celular, e (ii) no acúmulo citoplasmático de monômeros de α -sinucleína que, por sua vez, promovem a formação de oligômeros tóxicos para a célula. A degradação desses monômeros pode ser feita pela via ubiquitina-proteossomo e/ou pela via endossomo-lisossomo (Lashuel *et al.*, 2002; Farrer, 2006). Sendo assim, o entendimento dos mecanismos celulares que levam à agregação da α -sinucleína é de extrema importância para o entendimento da patogênese da DP, visto que essa proteína é o principal componente dos corpúsculos de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997; Xilouri *et al.*, 2008).

1.2.2 Sistema ubiquitina-proteossomo e DP

O produto do gene *PRKN* (OMIM 602544) atua como uma ubiquitina ligase tipo E3, que participa do direcionamento de proteínas para a degradação via proteossomo (Shimura *et al.*, 2000). Este gene parece, também, modular as funções mitocondriais, como a biogênese mitocondrial em células em proliferação através da transcrição e replicação do DNA mitocondrial (Kuroda *et al.*, 2006). As primeiras mutações em *PRKN* foram identificadas em famílias japonesas com parkinsonismo juvenil, segregando de forma autossômica recessiva (Kitada *et al.*, 1998) e representam a causa mais comum de DP de início precoce. As mutações identificadas podem levar à perda da função gênica, prejudicando o funcionamento do proteossomo e a degradação das proteínas danificadas, incluindo a α -sinucleína (identificada como um dos substratos de *PRKN*) (Zhang *et al.*, 2000; Shimura *et al.*, 2000; Sriram *et al.*, 2005; LaVoie *et al.*, 2007).

A proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*, codificada pelo gene *UCHL1* (OMIM 191342), é expressa exclusivamente nos neurônios e possui atividades de ubiquitina-hidrolase (quando monômero) e ubiquitina-ligase (quando dímero), estando envolvida na degradação da α -sinucleína pelo proteossomo (Larsen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002). Devido a suas duas atividades enzimáticas,

mutações no gene *UCHL1* podem afetar drasticamente o funcionamento desta proteína e a consequente degradação da α -sinucleína (Belin & Westerlund, 2008). *UCHL1* também proporciona um elo entre o sistema ubiquitina-proteossomo, o sistema endossomo-lisossomo e a formação dos corpúsculos de Lewy na DP, pois mantém uma reserva de monoubiquitina para a E3-ligase e para o funcionamento do proteossomo, prevenindo a degradação da ubiquitina livre pela via lisossômica, duas importantes vias de degradação da α -sinucleína (Farrer, 2006).

1.2.3 Disfunção mitocondrial e DP

O gene *PINK1* (OMIM 605909) codifica a proteína *Phosphatase and Tensin homolog-induced putative kinase (PTEN)*, que é uma serina/treonina quinase. A *PTEN* está difundida em diferentes tipos de tecidos e células, estando localizada preferencialmente na mitocôndria, onde exerce um efeito neuroprotetor através da fosforilação de proteínas específicas, modulando suas funções e protegendo a célula de disfunções mitocondriais e da apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Valente *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005; Gandhi *et al.*, 2006; Klein & Lohmann-Hedrich, 2007). Sabe-se que mutações em *PINK1* podem levar à perda da função protéica, gerando disfunção mitocondrial e consequente aumento da sensibilidade celular a agentes indutores de apoptose (Hatano *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2005; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

A proteína DJ-1, codificada pelo gene *DJ-1* (OMIM 606324), é uma proteína da família ThiJ/Pfpl de chaperonas moleculares antioxidantes, que atuam como sensores intracelulares do estresse oxidativo (Tao & Tong, 2003; Zhang *et al.*, 2005). As propriedades antioxidantes da DJ-1 protegem as células contra o estresse oxidativo e removem os compostos de peróxidos através da auto-oxidação. Esta proteína também interage com a proteína Parkin, estando envolvida no correto funcionamento do sistema ubiquitina-proteossomo. Sendo assim, mutações no gene *DJ-1* que afetam a proteína podem prejudicar a resposta neuronal à agregação da α -sinucleína (Moore *et al.*, 2005; Farrer, 2006). Zhong e colaboradores (2006) sugeriram que DJ-1 regula o promotor da tirosina hidroxilase humana, conferindo,

assim, uma ligação mais direta entre a síntese prejudicada de dopamina em humanos e mutações do gene *DJ-1*.

A proteína *Omi/HtrA serine peptidase 2*, codificada pelo gene *HTRA2* (OMIM 610297), é uma serina protease localizada na mitocôndria (onde atua na proteção contra o estresse oxidativo interno) e liberada no citosol durante um estímulo apoptótico, onde se liga a proteínas inibidoras da apoptose e parece proteger a célula do estresse oxidativo (Suzuki *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 2005; Alnemri, 2007). Mutações no gene *HTRA2* prejudicam a atividade de HtrA2 e, conseqüentemente, a resposta celular e a proteção da mitocôndria ao estresse (Strauss *et al.*, 2005). Estudos indicam que a ativação da atividade de HtrA2 na mitocôndria depende de sua interação com PINK1 e, portanto, mutações no gene *PINK1* também poderiam prejudicar o funcionamento dessa proteína (Valente *et al.*, 2004; Strauss *et al.*, 2005).

A proteína *Leucine-rich repeat kinase 2*, codificada pelo gene *LRRK2* (OMIM 607060), é uma proteína multifuncional, citoplasmática, com atividade quinase e GTPase (Smith *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006). Esta proteína parece desempenhar um papel importante na organização celular, integrando o tráfico celular, a fosforilação e a sinalização intracelular (Smith *et al.*, 2005; Farrer, 2006; Di Fonzo *et al.*, 2006; Gloeckner *et al.*, 2006). A maioria das mutações patogênicas identificadas no gene *LRRK2* está associada a um ganho da atividade quinase dessa proteína, o que pode levar ao aumento de agregação das proteínas Tau e α -sinucleína (Singleton, 2005; Smith *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006; West *et al.*, 2007).

1.2.4 A via lisossômica e DP

A degradação da proteína α -sinucleína não ocorre apenas pela via proteossômica, mas também pela via lisossômica (Webb *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Cuervo *et al.*, 2004). Defeitos nessa via ou no funcionamento geral do lisossomo podem ser um fator inicial para a agregação de proteínas no citosol e para o aumento do estresse celular atuando, assim, na patogênese da DP (Cuervo *et al.*,

2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008). Dois genes (*GBA* e *ATP13A2*) são reconhecidos por participarem da via lisossômica de degradação.

O gene *GBA* (OMIM 606463) humano está localizado em 1q21 (Shafit-Zagardo *et al.*, 1981; Barneveld *et al.*, 1983). Ele possui 7,6 kb de extensão e é composto por 11 éxons, que codificam a enzima lisossômica glicocerebrosidase (Horowitz *et al.*, 1989). A análise molecular de pacientes com DP esporádica revelou a presença de um grande número de variantes patogênicas no gene *GBA* que levam à deficiência desta enzima e à disfunção lisossômica, interferindo na degradação e nos níveis citoplasmáticos da proteína α -sinucleína e, assim, contribuindo para a etiologia da DP (Meivar-Levy *et al.*, 1994; Hruska *et al.*, 2008).

Outro gene que tem sido associado à DP é o *ATP13A2* (PARK9), no qual mutações, também, poderiam ocasionar o comprometimento da função lisossômica, tendo como consequência a agregação da proteína α -sinucleína (Ramirez *et al.*, 2006). Considerando ser esse gene o alvo de nosso trabalho ele será discutido mais detalhadamente nos próximos itens.

1.3 O gene *ATP13A2*

O gene *ATP13A2* (OMIM 610563) está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36) (Hampshire *et al.*, 2001) e codifica um transcrito de 3,8 kb, composto por 29 éxons. Seu produto, a proteína *ATP13A2* (**Figura 4**), é uma ATPase tipo-P da subfamília P₅, expressa em diversos tecidos e órgãos, e, de forma predominante, nos neurônios do córtex, do tálamo e da substância *nigra pars compacta* (Schultheis *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2006). Embora tanto a função como a especificidade do substrato da proteína *ATP13A2* sejam desconhecidas, acredita-se ser ela uma proteína lisossômica de transporte, responsável pela manutenção do pH ideal dentro do lisossomo (Klein & Lohmann-Hedrich, 2007; Bras *et al.*, 2008).

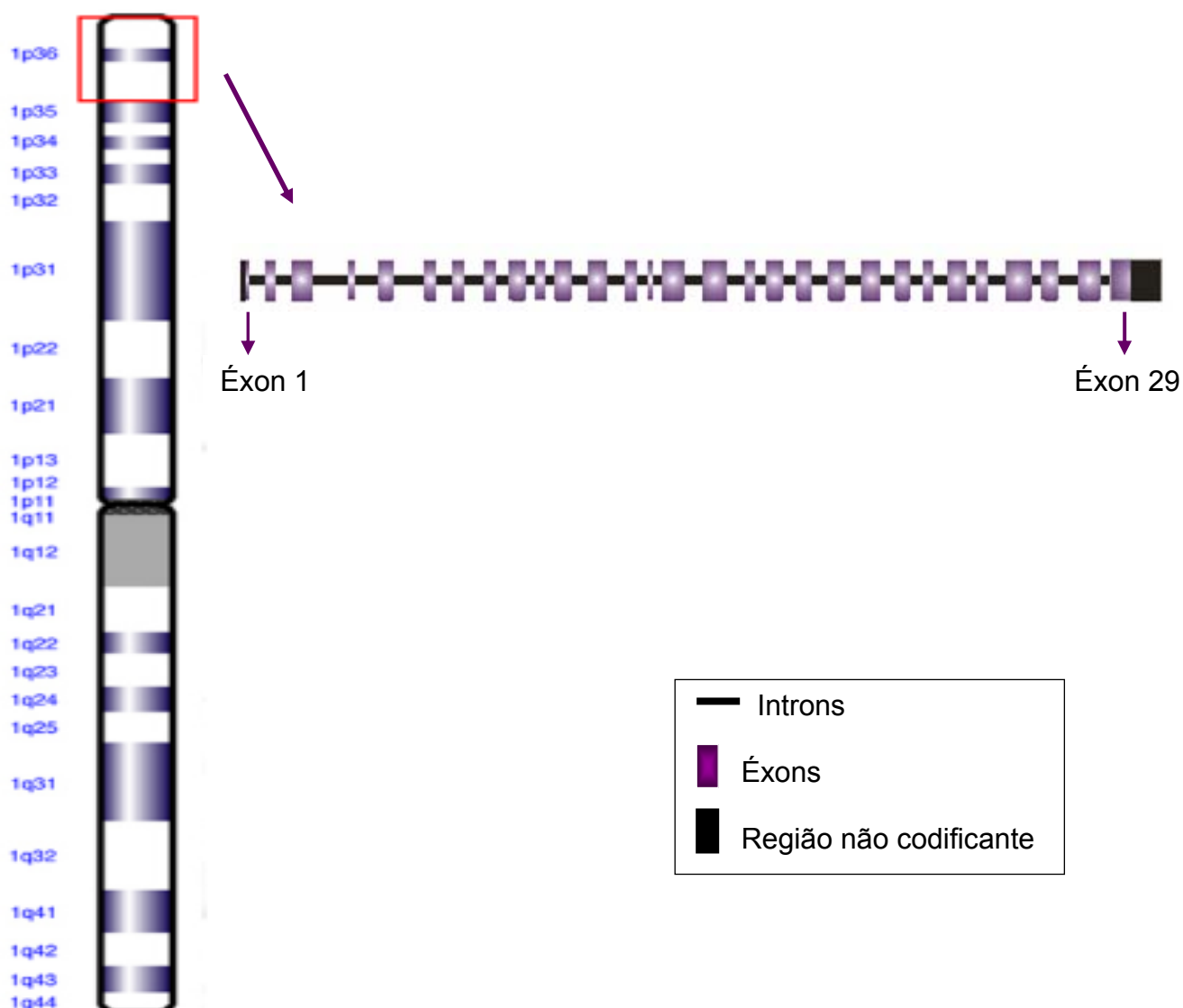


Figura 4: Esquema representativo da estrutura do gene *ATP13A2*, seus 29 éxons e o local onde ele se encontra no cromossomo 1

As ATPases tipo-P compreendem uma grande superfamília de proteínas, presentes tanto em procariotos como em eucariotos, que transportam cátions inorgânicos e outros substratos através das membranas celulares, sendo que as ATPases P_5 são expressas apenas em eucariotos (Schultheis *et al.*, 2004). Essas proteínas são formadas por quatro domínios principais: domínio de fosforilação P; domínio de ligação do nucleotídeo N; domínio atuador A e domínio da membrana M (Figura 5).

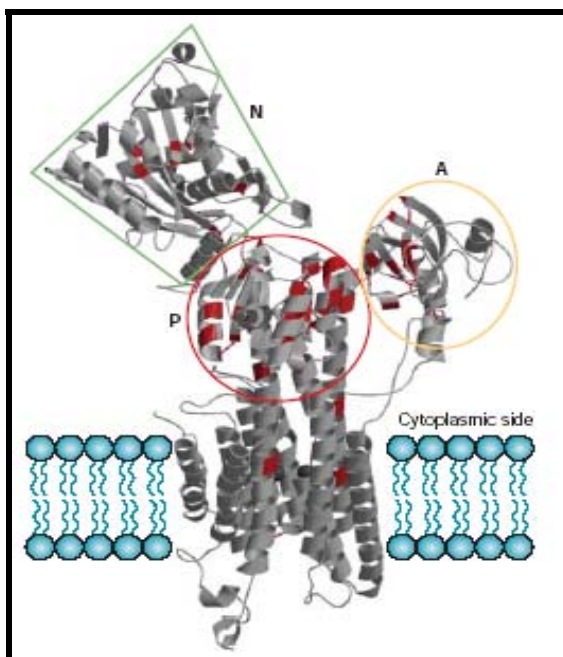


Figura 5: Estrutura tridimensional proteína ATPase e seus principais domínios no retículo sarcoplasmático Ca^{2+} (Fonte: Kuhlbrandt, 2004)

1.3.1 Mutações no gene *ATP13A2* e a síndrome de Kufor-Rakeb

Em 1994, Najim Al-din e colaboradores descreveram cinco irmãos jordanianos, filhos de pais consanguíneos, que apresentavam quadro clínico de parkinsonismo atípico, que incluía paralisia supranuclear do olhar vertical, espasticidade e demência. O curso da doença era progressivo, mas os pacientes apresentavam resposta ao levodopa e moderada regressão dos sintomas. Os autores denominaram essa doença de síndrome de Kufor-Rakeb (KRS). No ano de 2006, Ramirez e colaboradores identificaram uma família chilena com DP de início precoce que apresentavam as mesmas características da família jordaniana de Kufor-Rakeb. Essa família era composta de treze membros, dos quais quatro filhos eram afetados (três meninos e uma menina). O estudo molecular do gene *ATP13A2* nessas duas famílias identificou mutações no gene *ATP13A2*. Os indivíduos afetados da família jordaniana eram homozigotos para uma duplicação de 22 nucleotídeos no éxon 16 (1632_1653dup22), que altera o quadro de leitura do RNAm. Os pacientes da família chilena eram heterozigotos para as seguintes

mutações: uma deleção de um nucleotídeo no éxon 26 (3057delC), que resulta em uma parada prematura do quadro de leitura e uma mutação no sítio de processamento no éxon 13 (IVS13+G>A), levando à ausência desse éxon no transcrito e à consequente ausência de 111 aminoácidos na proteína. Estas alterações estavam ausentes em 480 controles normais alemães. Todos os indivíduos afetados pela doença nas duas famílias apresentavam mutações gênicas que afetavam, direta ou indiretamente, os domínios transmembrana da ATP13A2 e levavam à formação de uma proteína truncada, causando a perda de sua função. Tendo em vista que esse gene codifica uma enzima lisossômica, sendo esta participante da via de degradação de proteínas, como a α -sinucleína, mutações no gene *ATP13A2* poderiam causar disfunção lisossômica, acúmulo da α -sinucleína e, conseqüentemente, contribuir para a patogênese da DP. Os achados de Ramires e colaboradores (2006) permitiram estabelecer uma relação entre o gene *ATP13A2* e um tipo de parkinsonismo com características clínicas atípicas e impulsionou outros trabalhos a pesquisarem essa relação em pacientes com DP clássica.

1.3.2 Mutações no gene *ATP13A2* e a Doença de Parkinson

Di Fonzo e colaboradores (2007) foram os primeiros a investigar o papel do gene *ATP13A2* em pacientes com DP. Neste estudo, todos os 29 éxons foram sequenciados em 46 pacientes (em sua maioria, italianos) com parkinsonismo puro, sendo 35 casos de manifestação precoce (entre 21 e 40 anos) e 11 de manifestação juvenil (antes dos 21 anos de idade). Foram identificadas três novas mutações *missense* nos éxons 15 (Gly1510Arg), 16 (Gly1597Arg) e 2 (Thr35Met) do gene *ATP13A2*. A mutação Gly1510Arg foi encontrada em homozigose num paciente brasileiro com DP juvenil (filho mais novo de quatro irmãos, nascido de pais não consanguíneos, sem história familiar de parkinsonismo) e as mutações Gly1597Arg e Thr35Met, ambas em heterozigose, em dois pacientes italianos com parkinsonismo precoce. Todas as mutações identificadas neste estudo resultaram na substituição de resíduos de aminoácidos altamente conservados na proteína ATP13A2 e se mostraram ausentes em 738 indivíduos controles saudáveis. A identificação de mutações *missense* em *ATP12A3* em pacientes com DP, menos

drásticas do que àquelas encontradas nas famílias com KRS, forneceu uma nova e importante evidência de que mutações neste gene não estão, invariavelmente, associadas com quadros clínicos tão graves como o observado na KRS, mas podem ser encontradas em associação com fenótipos mais brandos.

Alguns outros grupos investigaram a presença de mutações no gene *ATP13A2* em pacientes com DP (**Tabela 2**).

Tabela 2: Estudos de triagem de mutações no gene *ATP13A2* realizados em pacientes com DP

População	Método utilizado para análise do gene <i>ATP13A2</i>	Amostras de pacientes com DP				Amostra Controle		Referências Bibliográficas
		N	% Variantes <i>missenses</i>	Localização das variantes <i>missenses</i>	% Polimorfismos	N	% Variantes <i>missenses</i>	
Itália e Brasil	Sequenciamento completo do gene	46	6,5%	Éxons 2, 15 e 16	15,2%	738	0%	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2007
Japão	Sequenciamento completo do gene	117	0,8%	Éxon 6	ND	300	0%	Ning <i>et al.</i> , 2008
China	Sequenciamento completo do gene	29	0%	-	ND	-	-	Guo <i>et al.</i> , 2008
Taiwan e Singapura	Sequenciamento completo do gene	182	1,7%	Éxon 20	6,5%	589	0%	Lin <i>et al.</i> , 2008
Tunísia	Sequenciamento completo do gene	89	6,7%	Éxons 3, 10, 12, 16, 21 e 25	28,8%	372	0,53%	Vilariño-Guell <i>et al.</i> , 2009
Alemanha, Sérvia, Canadá e Noruega	Sequenciamento completo do gene	112	3,6%	Éxons 9, 10, 14 e 26	ND	55	3,6%	Djarmati <i>et al.</i> , 2009
China	Sequenciamento completo do gene	56	0%	-	25%	150	0%	Wang <i>et al.</i> , 2009
China	Análise da mutação c.2236G>A	220	0%	-	0,1%	-	-	Mao, <i>et al.</i> , 2009
China	Análise da mutação c.2236G>A	532	0,19%	Éxon 20	-	480	0,21%	Qing-Zhou <i>et al.</i> , 2010

ND – não disponível

De modo geral, os estudos realizados até o momento demonstram que mutações patogênicas no gene *ATP13A2* são uma causa rara da doença de Parkinson. No entanto, a maioria dos estudos se concentrou numa população específica, a oriental. Poucos trabalhos foram realizados na população europeia, e aqueles que o fizeram obtiveram resultados significativos da relação desse gene com a DP, demonstrando a importância de se conduzir a análise desse gene em outras populações a fim de avaliar a real relação entre alterações no *ATP13A2* e a DP.

1.3.3 O gene *ATP13A2* e a via lisossômica

Apesar dos grandes avanços no entendimento da patogênese da DP, os mecanismos que levam à agregação e aos efeitos tóxicos da α -sinucleína, assim como, as vias celulares envolvidas na sua degradação, ainda não estão totalmente esclarecidos. Sendo assim, um dos grandes desafios da atualidade é o entendimento das bases moleculares e celulares subjacentes a esta desordem (Sidransky, 2006).

Várias mutações no gene *ATP13A2* são do tipo *missense* e, geralmente, resultam no processamento errôneo ou em mudanças na conformação da proteína. Isto acarreta a retenção da proteína *ATP13A2* no retículo endoplasmático e sua posterior degradação pelo proteossomo, causando uma sobrecarga nesta via, e também uma parcial perda de função dos lisossomos e conseqüentemente uma degradação insuficiente, levando ao acúmulo de α -sinucleína (Ramirez *et al.*, 2006).

Desta forma, estudos que explorem a associação entre alterações no gene *ATP13A2* e a DP poderão levar a um melhor entendimento dos fatores etiológicos relacionados a esta desordem.

2 OBJETIVOS

Considerando a relação do gene *ATP13A2* com a via lisossômica de degradação protéica e sua possível associação com a doença de Parkinson, somada à escassez de dados da literatura relativos ao estudo deste em pacientes latino-americanos com DP, o presente trabalho tem por objetivo:

Avaliar se mutações no gene *ATP13A2* constituem um fator de risco relevante na etiologia da DP em pacientes brasileiros. Com esta finalidade, temos como objetivos específicos:

- Rastrear a presença de mutações nos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 e 27, bem como, nas regiões de limite éxon/intron, que incluem os sítios doadores e receptores de encadeamento do gene *ATP13A2*;
- Determinar a frequência de alterações neste gene na população estudada;
- Estabelecer correlações genótipo-fenótipo para as variantes gênicas encontradas.

3 METODOLOGIA

3.1 Pacientes e controles

Neste estudo foram analisados 116 pacientes com DP, não aparentados de ambos os sexos (36 mulheres e 80 homens), com idade de manifestação inferior ou igual a 50 anos (faixa etária: 12 a 50 anos/idade de manifestação média: $41,2 \pm 8,0$ anos). Dentre estes pacientes, 21 (18,2%) relataram história familiar da doença em parentes de 1º ou 2º graus e os demais (81,8%) eram casos isolados.

Com exceção de 2 pacientes (1,7%) de nacionalidade portuguesa, todos os restantes são brasileiros, provenientes de ambulatórios de distúrbios do movimento de importantes hospitais públicos. Eles foram avaliados por médicos neurologistas especialistas em desordens do movimento que procederam à análise clínica seguindo os critérios clínicos/patológicos aceitos para a DP (Hughes *et al.*, 2001) e levantaram a história familiar do probando. Foram incluídos na pesquisa apenas os pacientes com DP idiopática, sendo os casos de parkinsonismo secundário excluídos.

Além dos pacientes com DP, foram recrutados 140 indivíduos voluntários saudáveis (58 mulheres e 82 homens; faixa etária: 50 a 95 anos/idade média: $63,1 \pm 9,4$), sem sinais ou sintomas da DP ou de qualquer outra desordem neurodegenerativa, para fazerem parte da nossa amostra controle.

Os pacientes selecionados foram esclarecidos com relação aos objetivos da pesquisa e convidados a participar do estudo. A coleta de material biológico para a análise molecular teve início somente após a autorização do paciente, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**anexo 1 e 2**). Todas as condutas adotadas neste estudo seguiram as normas éticas do CONEP/Ministério da Saúde (Resolução 196/96) que regem as pesquisas envolvendo seres humanos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (REG.032.2.2008 – parecer 004/2009) (**Anexo 3**).

3.2 Extração do DNA genômico

O DNA dos pacientes foi extraído a partir de 5 mL de sangue periférico, utilizando-se tubos *vacutainer* contendo anti-coagulante EDTA ou a partir de saliva. A coleta de sangue foi realizada por um técnico em análises clínicas, seguindo normas de plena assepsia. As recomendações para a coleta adequada da saliva consistiram em não beber, fumar ou mastigar 30 minutos antes da utilização do frasco coletor.

A extração do DNA genômico a partir de sangue foi conduzida utilizando-se o Kit comercial Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Na extração a partir de saliva, utilizou-se o Kit ORAGENE™ DNA self-collection (DNAGENOTEK) de acordo com as instruções descritas pelo fabricante.

Após a extração, o DNA foi dividido em duas alíquotas, armazenadas em microtubos, sendo uma estocada a 4°C e outra a -20°C.

3.3 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

Para estimar a qualidade e a concentração do DNA das amostras obtidas, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% (INVITROGEN) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (USB); ácido bórico 89 mM (MERCK); EDTA 2 mM (USB)]. As amostras foram preparadas adicionando-se 1 µL da alíquota de DNA a 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (SIGMA); xileno cianol 0,25% (MERK); glicerol 30% (MERK)] e 8 µL de água deionizada (Milli Q). A eletroforese foi conduzida em uma cuba horizontal (Horizon 58 – INVITROGEN) a 60V por 1 hora, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (USB), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (USB)]. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)]. A integridade do DNA foi avaliada comparando-se a intensidade da banda de cada amostra com a intensidade do padrão de DNA de Bacteriófago λ (INVITROGEN) de 100 ηg/µL.

A concentração do DNA obtido foi estimada através de espectrofotometria em um biofotômetro [BioPhotometer (EPPENDORF)]. No preparo das amostras, 5 µL da

alíquota de DNA foram diluídos em 65 μL de água deionizada (Milli-Q) para um volume final de 70 μL e colocadas em uma cubeta para a leitura no biofotômetro. Uma amostra contendo 5 μL de tampão TE [Tris 10 mM (USB)-HCl (MERCK); EDTA 1 mM (USB); pH 7,4] diluídos em 65 μL de água deionizada (Milli-Q) foi usada como branco na calibração do equipamento. A estimativa da concentração foi calculada pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita.

3.4 Rastreamento de mutações no gene *ATP13A2*

3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a análise molecular dos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26 e 27 (**Figura 6**) bem como das regiões de limite éxon/intron, que incluem os sítios doadores e receptores de encadeamento, foi necessária a amplificação destas seqüências pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se 6 pares de oligonucleotídeos (INVITROGEN) descritos por Di Fonzo e colaboradores (2007), Ning e colaboradores (2007) (**Tabela 3**). Os éxons 2 e 3, 13 e 14, 26 e 27, assim como a região intrônica flanqueadora, foram amplificados em uma única reação de PCR.

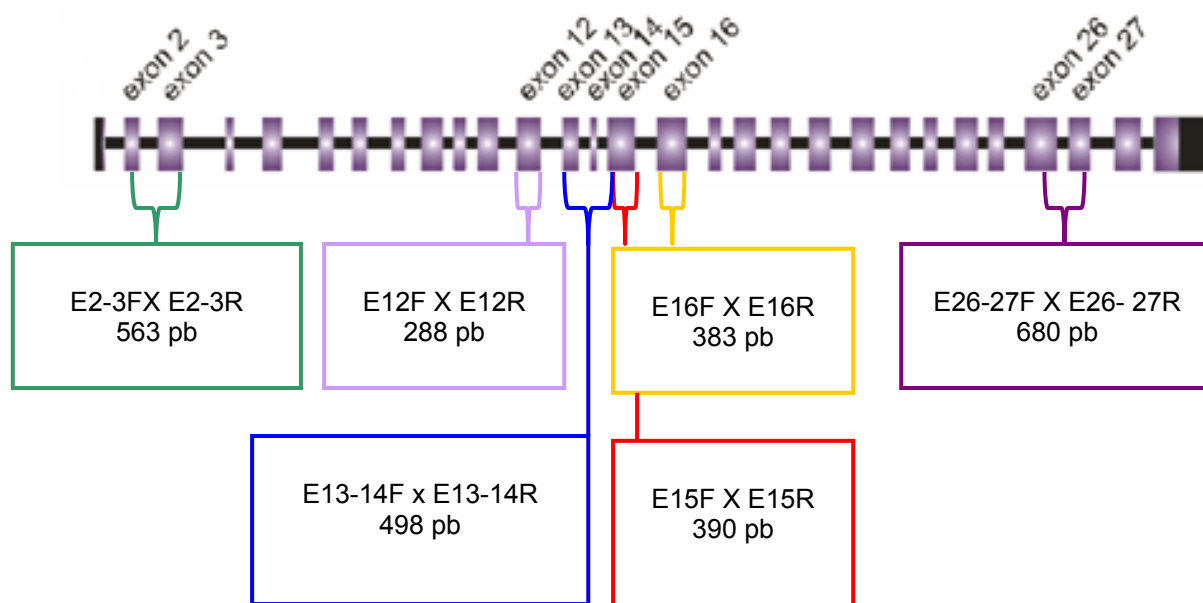


Figura 6: Esquema do gene *ATP13A2* mostrando os éxons estudados e o tamanho de cada fragmento amplificado na PCR.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos éxons estudados do gene *ATP13A2* (Di Fonzo *et al.*, 2007, Ning *et al.*, 2007)

Éxon	Oligonucleotídeos	Tamanho do oligonucleotídeo	Tamanho do fragmento
2-3	PARK9-E2-3F 5' ggAAgCAAgAggAgAAggTg 3'	20 pb	563 pb
	PARK9-E2-3R 5' gTCCCATggAAAgTCAGTgg 3'	20 pb	
12	PARK9-E12F 5' gAACTCCTggTTTgCTggTg 3'	20 pb	288 pb
	PARK9-E12R 5' CTCACTCCACCTCTCCCAA 3'	20 pb	
13-14	PARK9-E13-14F 5' CTCCACACTgCTgATggCTA 3'	20 pb	498 pb
	PARK9-E13-14R 5' gAgCCCggATTACAATCTCA 3'	20 pb	
15	PARK9-E15F 5' CCTCTACCgAAACCgggTAA 3'	20 pb	390 pb
	PARK9-E15R 5' gTgggTgCTgCTgAgAgAAT 3'	20 pb	
16	PARK9-E16F 5' AgTTCCTggggTTCCCATAg 3'	20 pb	383 pb
	PARK9-E16R 5' gACAgggTgggATTCgTTAg 3'	20 pb	
26-27	PARK9-26-27F 5' CTTACCCATCAGATTCCTTCg 3'	21 pb	680 pb
	PARK9-26-27R 5' CACgCCAgTCTTCCACTCg 3'	19 pb	

As condições finais das reações estão especificadas na **tabela 4**. Todas as reações de amplificação foram feitas em tubos de 0,2 mL e conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) de acordo com os seguintes programas:

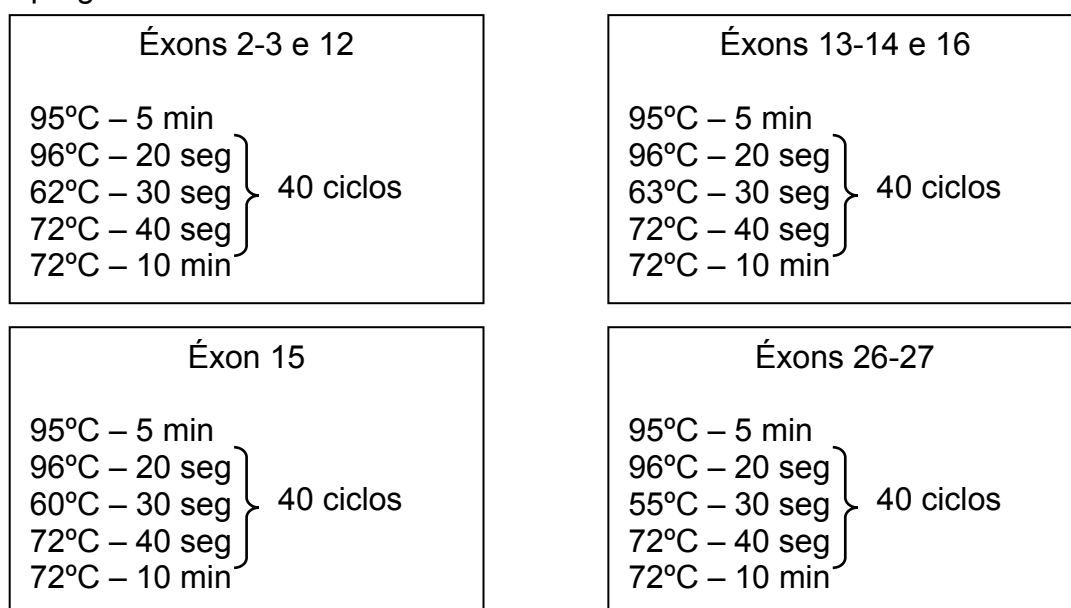


Figura 7: Esquema mostrando as condições de ciclagens da PCR de cada éxon utilizada neste estudo.

3.4.2 Análise da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação

Para a avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (INVITROGEN), diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (INVITROGEN), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (USB)]. Ao gel de agarose foi adicionado 0,6 µL de brometo de etídeo a 10 µg/µL (SIGMA). No preparo das amostras, 4 µL da alíquota da reação de PCR foram adicionados a 2 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (SIGMA), xileno cianol 0,25% (MERCK), glicerol 30% (MERCK)].

A eletroforese foi realizada a 80 V por 1 hora em cuba horizontal [Horizon 58 (INVITROGEN)], utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)]. Para confirmação do tamanho do amplicon foi utilizado o padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder (INVITROGEN).

3.4.3 Purificação dos produtos da PCR

Antes de serem utilizados na reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados para a remoção de resíduos resultantes dos reagentes empregados na PCR. Para isso, foi utilizado um kit de purificação [AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER)], seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

3.4.4 Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 20 µL, utilizando-se o Kit Big Dye Terminator V3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS), contendo: 1 µL de oligonucleotídeo a 3,2 pmol (senso ou anti-senso), 1,5 µL do tampão diluente (APPLIED BIOSYSTEMS), 60 ng do DNA purificado e 1 µL do Kit Big Dye Terminator.

As reações foram conduzidas no termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) e a ciclagem compreendeu 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação das reações de sequenciamento, foram adicionados ao produto da reação 64 µL de etanol absoluto gelado (ISOFAR) e 16 µL de água MilliQ. O material foi homogeneizado em um agitador para tubos (PHOENIX) e deixado à temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos (microcentrífuga EPPENDORF). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250 µL de etanol 70% (ISOFAR). O material foi novamente homogeneizado e levado à centrifuga por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e as amostras precipitadas foram protegidas da luz e deixadas à temperatura ambiente por 12 horas para secagem. As amostras secas foram conservadas à -20°C.

O material precipitado foi ressuspenso em 10 µL de solução de formamida [Hi Di Formamida (APPLIED BIOSYSTEMS)] e transferido para a placa de sequenciamento contendo 96 poços (APPLIED BIOSYSTEMS). Em seguida, a placa contendo as amostras foi levada ao termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH) por 5 minutos a 95°C para a desnaturação e, imediatamente, incubada em gelo para permitir a manutenção da desnaturação das amostras. A placa foi levada ao sequenciador automático ABI Prism 3730 (APPLIED BIOSYSTEMS) para o processamento das amostras. Esta etapa foi realizada na Plataforma Genômica (PDTIS – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz).

3.4.5 Análise das sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sistema de sequenciamento foram avaliados através do programa Chromas Lite Versão 2.0 (TECHNELYSIUM). Para o anelamento das seqüências com suas respectivas seqüências selvagens utilizamos o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.2 (05/06/05) (Isis Pharmaceuticals, Inc.). A seqüência selvagem do gene *ATP13A2* pode ser acessada no banco de dados do Ensembl (endereço eletrônico: http://www.ensembl.org/Homo_sapien?db=core;g=ENSG00000204120;r=2:233562015-233725285;t=ENST00000409547). Toda e qualquer discrepância encontrada no

alinhamento foi revista no programa Chromas para a exclusão de eventuais erros de interpretação cometidos pelo programa gerador da sequência.

Aqueles indivíduos que apresentaram variação em suas sequências em relação à sequência selvagem tiveram sua amostra de DNA novamente amplificada para a confirmação da variante.

3.5 Ferramentas eletrônicas

Os programas que foram utilizados para a análise das sequências podem ser acessados gratuitamente na Internet. O programa Chromas Lite Versão 2.0 (TECHNELYSIUM) encontra-se no endereço eletrônico “http://www.Technelysium.com.au/chromas_lite.html”. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.2 (05/06/05) (ISIS PHARMACEUTICALS, INC) está disponível no endereço eletrônico “<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>”.

Na análise de predições de acentuadores exônicos de encadeamento (ESE – *exonic splicing enhancers*) foram utilizadas as seguintes ferramentas: *ESEfinder*: “http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home” (Cartegni *et al.*, 2003) e *RESCUE-ESE*: “<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>” (Fairbrother *et al.*, 2004).

Para avaliar o impacto de alterações intrônicas em sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA utilizamos as ferramentas eletrônicas, *SpliceView* (endereço eletrônico: “<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>”) e *NNSPLICE* versão 0.9 (endereço eletrônico: “http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html”).

4 RESULTADOS

Neste estudo, foi analisada a presença de alterações na sequência codificante do gene *ATP13A2*, incluindo as sequências intrônicas flanqueadoras, em 116 pacientes com DP e os resultados encontram-se descritos na **Tabela 5**.

Resultados

Tabela 5: Resultados da análise dos éxons 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16, 26, 27 do gene *ATP13A2* em 116 pacientes, de ambos os sexos, com DP idiopática.

Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/I	Resultados da análise do gene <i>ATP13A2</i>					
						Éxon 2-3	Éxon 12	Éxon 13-14	Éxon 15	Éxon 16	Éxon 26-27
1	PAR1147	47	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	PAR1148	48	42	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084 -3C>T / wt
3	PAR1161	59	49	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3192C>T c.2970G>A
4	PAR1162	64	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084 - 3C>T
5	PAR1170	57	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
6	PAR1173	62	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
7	PAR1176	57	49	F	I	Normal	Normal	c.1306+42_1 306+43insC	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
8	PAR1182	39	26	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / w c.3192 C>T / wt
9	PAR1183	58	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt

											c.3084-3C>T c.3192C>T
21	PAR1294	61	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A
22	PAR1296	58	42	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
23	PAR1297	57	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
24	PAR1305	38	36	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3 C>T
25	PAR1307	54	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192 C>T / wt
26	PAR1308	56	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
27	PAR1319	64	48	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
28	PAR1321	50	40	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
29	PAR1322	54	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
30	PAR1323	54	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
31	PAR1330	33	31	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
32	PAR1335	61	50	M	I	c.106-30G>T	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3083+24C>T/ wt

33	PAR1345	33	14	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
34	PAR1355	64	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
35	PAR1377	48	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
36	PAR1386	49	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / wt c.3192 C>T / wt
37	PAR1394	43	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
38	PAR1397	53	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
39	PAR1399	42	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
40	PAR1401	43	37	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
41	PAR1402	71	47	M	I	Normal	Normal	c.1306+42_1 306+43insC	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T
42	PAR1404	62	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt
43	PAR 1405	38	35	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192 C>T
44	PAR1407	58	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T/ wt
45	PAR1409	47	33	M	I	Normal	Normal		Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt

								Normal			
46	PAR1436	41	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	c.1617G>T	c.2970G>A c.3192C>T
47	PAR1438	42	37	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
48	PAR1441	62	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
49	PAR1442	43	38	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192 C>T / wt
50	PAR1443	61	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
51	PAR1450	34	26	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
52	PAR1452	64	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192 C>T
53	PAR1453	48	36	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192 C>T
54	PAR1455	57	47	M	F	c.132A>G	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192 C>T
55	PAR1456	70	43	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
56	PAR1457	80	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	

68	PAR1667	38	35	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T
69	PAR1695	61	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
70	PAR1703	35	25	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
71	PAR1704	56	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt
72	PAR1705	38	34	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3083+24C>T/ wt
73	PAR1724	54	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
74	PAR1726	59	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
75	PAR1734	71	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt c.3083+24C>T/ wt
76	PAR1735	51	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
77	PAR1745	42	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt

											c.3192C>T / wt
78	PAR1746	57	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
79	PAR1765	61	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	c.1617G>T	c.2970G>A c.3192C>T
80	PAR1805	50	22	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
81	PAR1806	50	12	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T
82	PAR1810	61	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt
83	PAR1820	46	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3192C>T c.2970G>A
84	PAR1824	45	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
85	PAR1963	43	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3192C>T
86	PAR1964	40	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
87	PAR1965	44	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
88	PAR1966	39	36	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T

89	PAR1967	48	37	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
90	PAR1968	41	38	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
91	PAR1969	40	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
92	PAR1991	56	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T
93	PAR1996	48	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A
94	PAR1997	55	48	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
95	PAR2001	51	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
96	PAR2006	50	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
97	PAR2011	46	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192C>T / wt
98	PAR2036	46	40	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
99	PAR2046	96	33	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3 C>T/ wt
100	PAR2056	59	39	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970 G>A / wt
101	PAR2064	62	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3C>T / wt c.3192C>T / wt

102	PAR2065	59	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
103	PAR2067	70	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T
104	PAR2068	56	28	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
105	PAR2081	59	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3192 C>T c.2970G>A
106	PAR2083	59	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
107	PAR2097	36	30	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / wt c.3192 C>T / wt
108	PAR2098	58	49	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
109	PAR2099	21	12	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3C>T / wt
110	PAR2101	44	33	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A c.3192C>T
111	PAR2118	58	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T c.3192 C>T
112	PAR2119	58	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.3084-3 C>T / wt
113	PAR2127	57	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3192 C>T

114	PAR2133	50		M	I	Normal	Normal	c.1306+42_1 306+43insC	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / wt c.3192 C>T / wt
115	PAR2143	58	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / wt c.3192 C>T / wt
116	PAR2145	50	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	c.2970G>A / wt c.3084-3 C>T / wt c.3192 C>T / wt

RP♦ - Registro do paciente

IMDP♠ - Idade de manifestação da DP.

S■ - Sexo do paciente.

F/I ● – F - Casos familiares da DP; I - Casos isolados da DP.

Nos pacientes estudados foram identificadas oito variantes de sequência no gene *ATP13A2*: quatro variantes intrônicas (íntrons 2, 13, 27) e quatro variantes exônicas silenciosas (éxon 3, 16, 26, 27) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Variantes de seqüência encontradas neste estudo e suas características principais

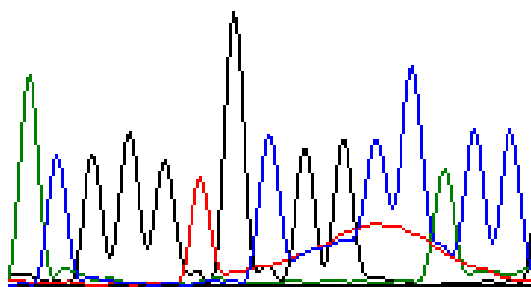
Varição no DNA	Tipo de Varição	Varição na proteína	Éxon/ íntron do gene	N (%)	Classificação	Referências bibliográficas
c.106-30G>T	Intrônica	-	Íntron 2	1 (0,8%)	Possivelmente não patogênica	-
c.132A>G	Silenciosa	p.P44P	Éxon 3	1 (0,8%)	Possivelmente não patogênica	-
c.1306+42_1306+43 insC	Intrônica	-	Íntron 13	4 (3,4%)	Possivelmente não patogênica	-
c.1610G>T	Silenciosa	p.L504L	Éxon 16	2 (1,7%)	Possivelmente não patogênica	-
c.2970G>A	Silenciosa	p.V990V	Éxon 26	67 (57,7%)	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2007 Lin <i>et al.</i> 2008; Lei <i>et al.</i> , 2009
c.3084-3C>T	Intrônica	-	Íntron 27	51 (43,9%)	Não patogênica	Lei <i>et al.</i> , 2009
c.3083+24C>T	Intrônica	-	Íntron 27	4 (3,4%)	Possivelmente não patogênica	-
c.3192C>T	Silenciosa	p.A1064A	Éxon 27	60 (51,7%)	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2007 Lin <i>et al.</i> 2008; Lei <i>et al.</i> , 2009

Das variantes identificadas verificamos que três delas, as variantes silenciosas c.2970G>A (**Figura 8**) e c.3192C>T (**Figura 9**), e a variante intrônica c.3084-3C>T (**Figura 10**), foram descritas anteriormente e consideradas como polimorfismos (Di Fonzo *et al.* 2007; Lin *et al.* 2008; Lei *et al.* 2009). Todas estão descritas no *dbSNP* (c.2970G>A – referência SNP ID: rs35306056; c.3192C>T – referência SNP ID: rs56299881; c.3084-3C>T – referência SNP ID: rs7531163).

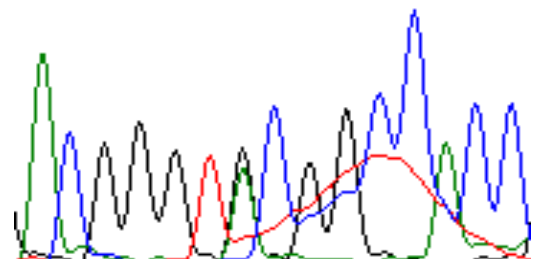
A variante silenciosa, c.2970G>A, localizada no exon 26, foi identificada em homozigose em 22 pacientes e no estado heterozigoto em 45 pacientes (57 casos esporádicos e 10 casos familiares). A variante silenciosa c.3192C>T, situada no exon 27, foi encontrada em 25 pacientes homozigotos e 35 pacientes heterozigotos (52 casos esporádicos e 8 casos familiares) (**Tabela 4**), respectivamente.

A variante intrônica c.3084-3C>T, foi identificada em 11 pacientes homozigotos e 40 pacientes heterozigotos (42 casos esporádicos e 9 casos familiares) (**Tabela 4**).

A A C G G G T G C G G C C A C C



B A C G G G T G C G G C C A C C



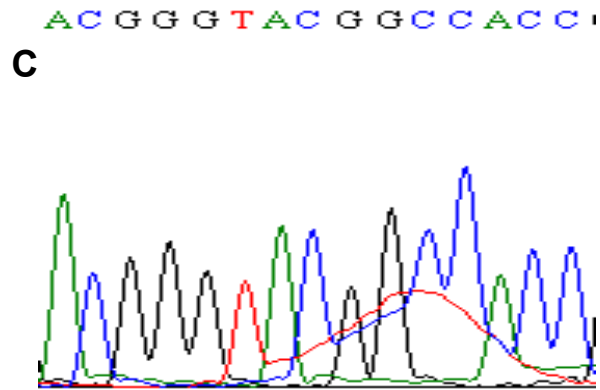


Figura 8: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.2970G>A em heterozigose e **(C)** em homozigose.

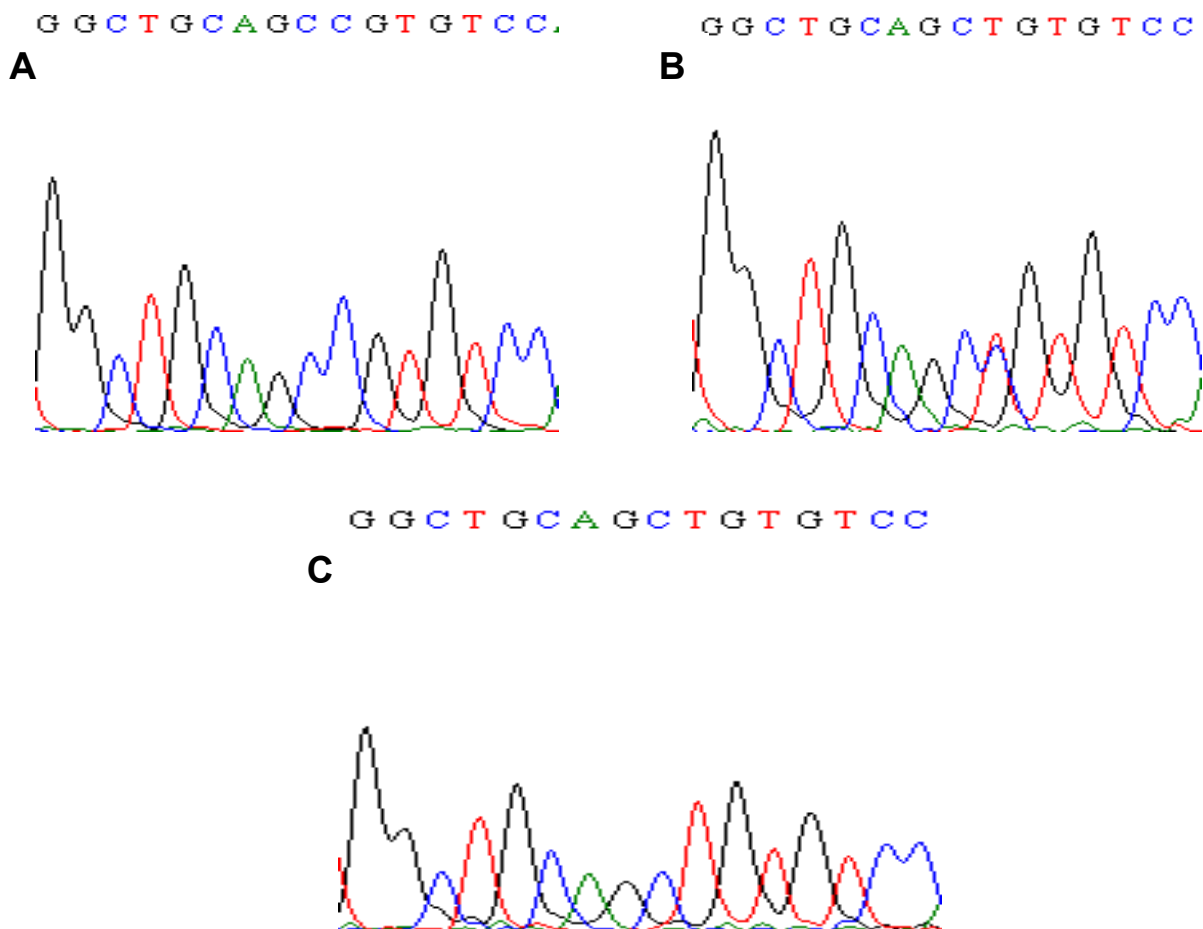


Figura 9: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.3192C>T em heterozigose e **(C)** em homozigose

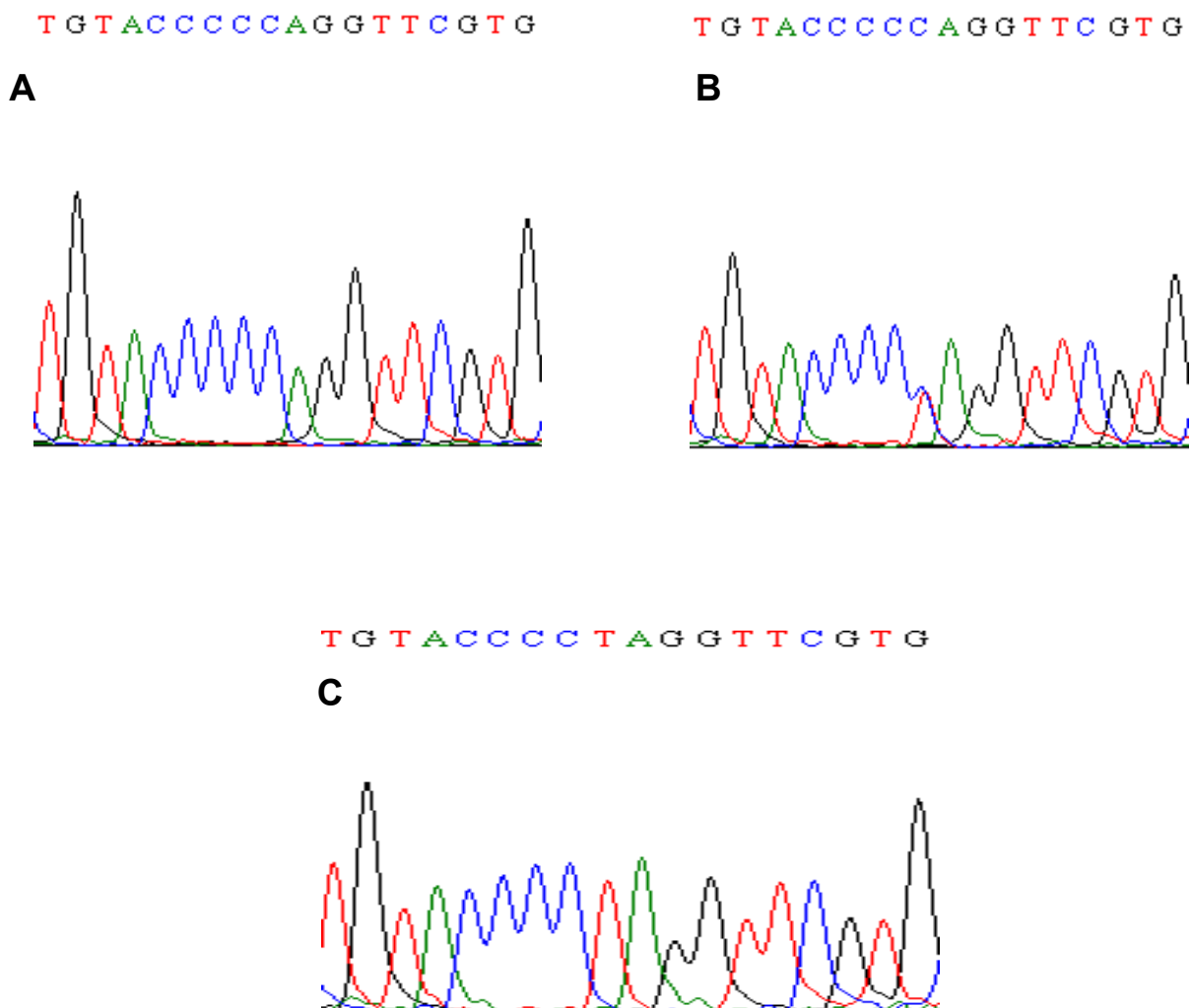


Figura 10: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.3084-3C>T em heterozigose e **(C)** em homozigose.

Cinco alterações identificadas neste estudo nunca foram descritas na literatura: três intrônicas (c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43insC e c.3083+24C>T) e duas silenciosas (c.132A>G e c.1610G>T) (**Tabela 4**).

A variante intrônica c.106-30G>T (**Figura 11**), localizada no íntron 2, foi encontrada em heterozigose em um paciente (PAR1335), sem histórico familiar e que manifestou a doença aos 50 anos.

A inserção 1306+42_1306+43insC (**Figura 12**), localizada no íntron 13, foi identificada em 4 pacientes (PAR1176, PAR1192, PAR1402, PAR2133), todos casos esporádicos, que manifestaram a doença em torno dos 50 anos.

A alteração intrônica c.3083+24C>T (**Figura 13**), localizada no íntron 27, foi encontrada em heterozigose em quatro pacientes (PAR1335, PAR1460, PAR1705, PAR1734) onde apenas um (PAR1705) apresenta histórico familiar da doença.

A análise *in silico* utilizando as ferramentas eletrônicas *SpliceView* e *NNSPLICE* mostrou que as três variantes intrônicas, não afetam o reconhecimento dos sítios doadores e dos sítios receptores de encadeamento.

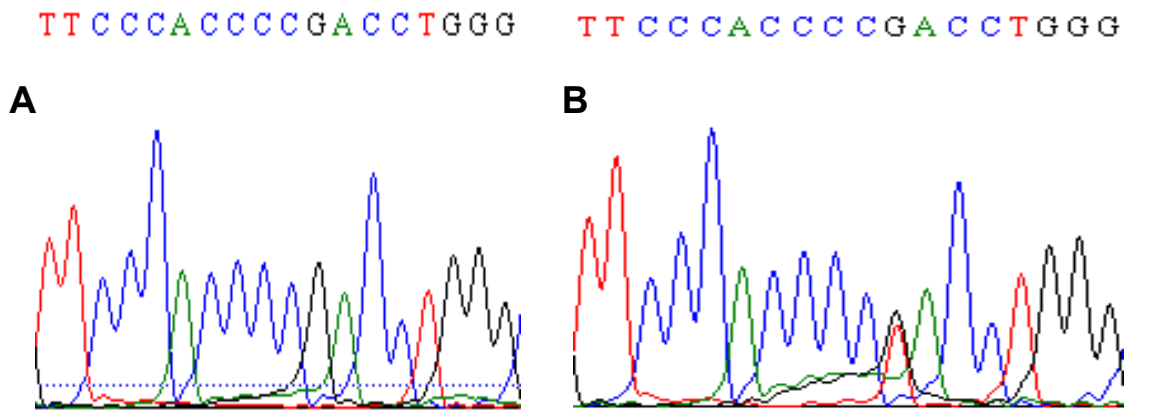


Figura 11: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.106-30G>T em heterozigose

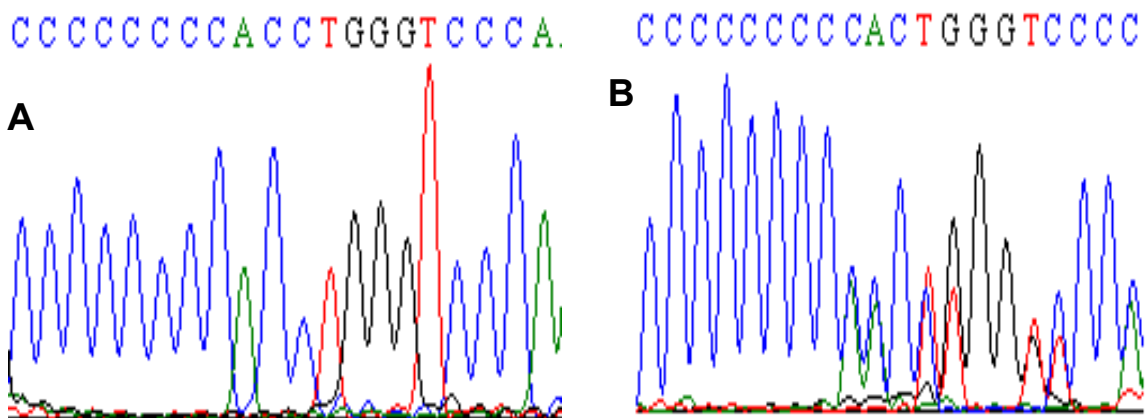


Figura 12: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração 1306+42_1306+43insC em heterozigose.

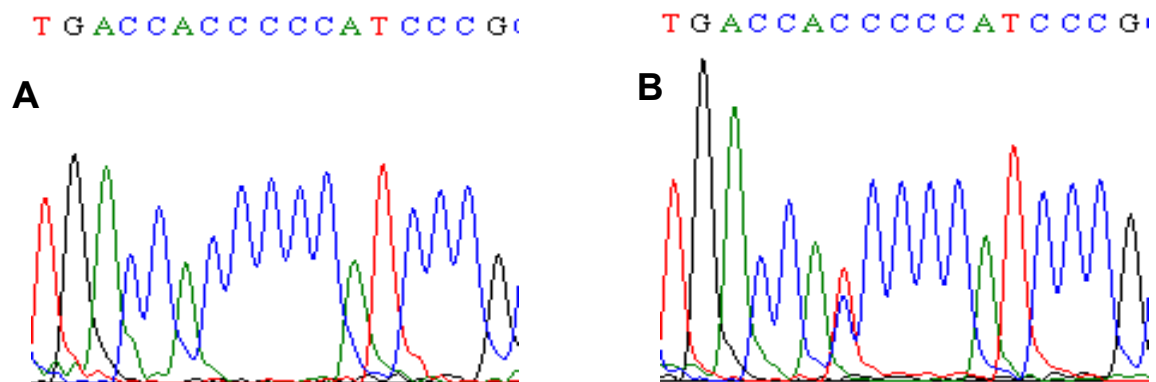


Figura 13: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.3083+24C>T em heterozigose.

As variantes silenciosas encontradas neste estudo são: c.132A>G (**Figura 14**), localizada no éxon 2, identificada em 1 paciente (PAR1455), com histórico familiar e manifestação da doença aos 47 anos. E a alteração c.1610 G>T (**Figura 15**) localizada no exon 16 e encontrada em dois pacientes, PAR1436, sem histórico familiar e manifestação dos sintomas aos 35 anos e PAR1765 com história familiar da PD e início dos sintomas aos 50 anos.

A análise utilizando-se o programa *RESCUE-ESE* e *ESEfinder* indicou que apenas a variante c.1610 G>T, localizada no exon 16, causa alterações em sítios acentuadores exônicos.

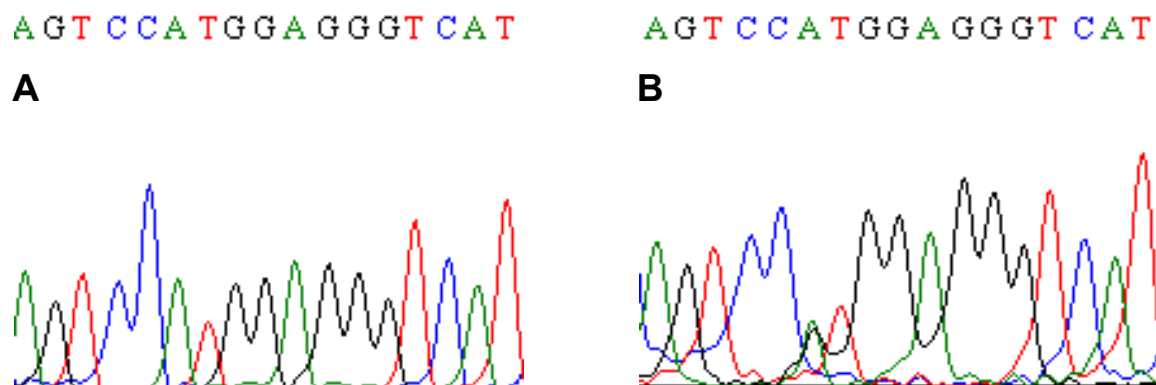


Figura 14: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.132A>G em heterozigose.

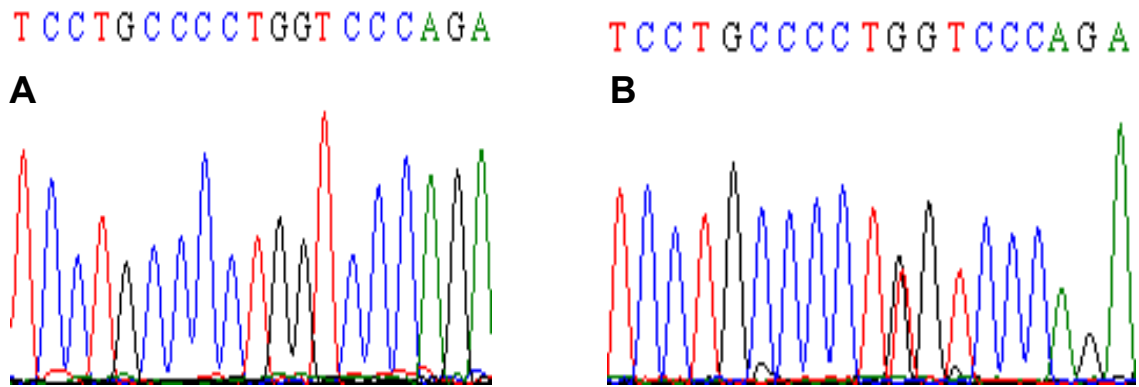


Figura 15: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *ATP13A2*. **B)** Alteração c.1610 G>T em heterozigose

A análise molecular desta variante em 140 indivíduos controles normais revelou sua presença em heterozigose em 3 dos indivíduos (**Anexo 4**).

Os resultados alcançados neste trabalho fizeram parte de um artigo científico, no qual sou co-autora, e foi submetido à revista *Neuroscience Letters* (**Anexo 5**).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, 116 indivíduos brasileiros portadores de DP idiopática com idade de manifestação igual ou inferior a 50 anos foram analisados para mutações nos éxons 2, 3, 13, 14, 15, 16, 26 e 27 do gene *ATP13A2*. Foram identificadas oito variantes de sequência, sendo quatro variantes nos íntrons 2, 13 e 27 e quatro variantes silenciosas nos éxons 3, 16, 26 e 27 (**Tabela 5**).

Entre as variantes identificadas, a alteração intrônica c.3084-3C>T e as alterações silenciosas c.2970G>A e c.3192C>T foram classificadas como não patogênicas. As alterações intrônicas c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43insC e c.3083+24C>T e as alterações silenciosas c.132A>G e c.1610G>T foram classificadas como provavelmente não patogênicas.

A variante intrônica c.3084-3C>T, já descrita na literatura (Lei *et al.*, 2009), consta do banco de dados *dbSNP* (c.3084-3C>T - referência SNP ID: rs7531163) e foi considerada pelos autores como um polimorfismo. Em função de termos encontrado esta variante numa alta frequência (43,9%), concordamos com a conclusão de Lei e colaboradores (2009) de tratar-se de um polimorfismo não patogênico.

As outras três variantes intrônicas identificadas em nosso estudo (c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43insC e c.3083+24C>T, localizadas nos íntrons 2, 13 e 27, respectivamente) nunca foram descritas. Considerando a inexistência de dados na literatura referentes a estas alterações, realizamos algumas análises *in silico* para avaliar a patogenicidade dessas variantes. Embora mutações intrônicas não causem um impacto funcional direto na proteína, elas podem afetar o processo de encadeamento através da alteração dos chamados sítios aceptores e doadores de encadeamento. Mudanças nestes sítios resultam na perda de sua funcionalidade o que pode gerar a retenção de um íntron ou a exclusão de um éxon (Baralle *et al.*, 2005). Segundo Krawczak e colaboradores (1992), 15% das mutações pontuais que afetam diretamente os sítios de encadeamento resultam em doenças genéticas humanas através de defeitos no processamento do pré-RNAm. Para avaliar o impacto das quatro variantes intrônicas novas, identificadas neste estudo, nos sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA, foram utilizadas as ferramentas eletrônicas *SpliceView* e *NNSPLICE*. Através destes programas verificamos que as respectivas mutações não afetam o reconhecimento dos sítios doadores e

receptores de encadeamento e, com base nestes resultados, consideramos estas três variantes intrônicas como possivelmente não patogênicas.

Em relação às variantes exônicas, é importante notar que mais de 50% de todas as mutações pontuais em genes associados a doenças resultam no encadeamento incorreto do pré-RNA (Cartegni *et al.*, 2003), tanto mutações sem sentido, como aquelas de sentido trocado e silenciosas podem interromper acentuadores exônicos de encadeamento e causar efeitos estruturais drásticos no produto gênico (Cartegni *et al.*, 2003). Os acentuadores exônicos de encadeamento são pequenas sequências de oligonucleotídeos específicas, localizadas nos éxons, que desempenham um papel importante no encadeamento constitutivo e alternativo (Liu *et al.*, 1998).

Nós identificamos quatro variantes silenciosas exônicas. Duas delas (c.2970G>A e c.3192C>T) foram encontradas em 57,7% e 51,7% dos pacientes, respectivamente, ambas haviam sido anteriormente descritas na literatura como polimorfismos (Di Fonzo *et al.*, 2007; Lin *et al.* 2008; Lei *et al.*, 2009) e encontram-se relacionadas no banco de dados *dbSNP* (c.2970G>A – referência SNP ID: rs35306056; c.3192C>T – referência SNP ID: rs56299881). Nossos achados suportam a classificação destas duas variantes como não patogênicas.

Duas outras variantes silenciosas (c.132A>G e c.1610G>T, localizadas nos éxon 3 e 16, respectivamente) foram identificadas em nosso estudo em 0,8% e 1,7% dos pacientes e nunca foram descritas na literatura. Para avaliar se estas variantes poderiam resultar na criação ou na eliminação de sequências exônicas acentuadoras de encadeamento (*ESE - exonic splicing enhancers*), em relação à sequência selvagem do gene *ATP13A2*, foram utilizadas as ferramentas eletrônicas *ESEfinder* e *RESCUE-ESSE*. A análise *in silico* mostrou que apenas a variante c.1610G>T possivelmente altera e cria um sítio aceptor de encadeamento. A análise molecular desta variante em 140 indivíduos controles normais revelou sua presença em heterozigose em 3 indivíduos numa frequência de 2,1% (**Anexo 4**). Não foi possível o estudo de segregação da variante c.1610G>T nas famílias dos pacientes afetados. Os resultados obtidos relativos à análise *in silico* somados ao fato da variante c.1610G>T ter sido identificada na amostra controle estudada sinalizam que, provavelmente, trata-se de uma variante não patogênica.

Os trabalhos publicados até o momento, relativos ao estudo do gene *ATP13A2* em pacientes com DP, estão listados na **tabela 2**. Como podemos

observar, são extremamente escassos os achados relacionados ao papel do gene *ATP13A2* na DP, inclusive não sendo identificado nenhum estudo em população latino-americana. Alguns desses estudos investigaram a presença de mutações em todos os éxons do gene *ATP13A2* (Ramirez *et al.*, 2006; Di Fonzo *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009; Vilariño-Guell *et al.*, 2009; Djarmati *et al.*, 2009) e outros, à semelhança do nosso trabalho, analisaram somente mutações específicas (Mao *et al.*, 2009; Qing-Zhou *et al.*, 2010).

Analisando o conjunto de resultados (**Tabela 2**), observamos que alguns autores não encontraram mutações *missenses* no *ATP13A2* (Guo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2009) e outros encontraram variantes em diferentes percentuais: acima de 3% (Di Fonzo *et al.*, 2007 e Djarmati *et al.*, 2009) e entre 0,5% e 2,5% (Lin *et al.*, 2009; Vilariño-Guell *et al.*, 2009; Ning *et al.*, 2009; Qing-Zhou *et al.*, 2010).

Assim como em nosso estudo, alguns trabalhos (Guo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2009) identificaram apenas polimorfismos no gene *ATP13A2* e concluíram que mutações no gene *ATP13A2* são causas raras da DP.

Observando os estudos que tiveram uma frequência mais alta (acima de 3%) de mutações *missenses*, percebemos que a maioria das mutações foi encontrada em heterozigose e em pacientes sem histórico familiar da DP.

Di Fonzo e colaboradores (2007) estudaram uma amostra de pacientes constituída por 11 indivíduos que apresentaram manifestação juvenil e 35 com manifestação precoce, sendo 33 casos esporádicos e 13 casos familiares. Eles encontraram três diferentes mutações (duas em heterozigose e uma em homozigose) em dois casos esporádicos e em um caso familiar. Em 2008, Vilariño-Guell e colaboradores estudaram pacientes com história familiar da DP e identificaram seis variantes *missenses*, contudo, nenhuma das variantes segregava com a doença, sugerindo que elas não contribuem diretamente para a DP. O estudo de Djarmati e colaboradores (2009), diferentemente dos estudos anteriores, analisaram somente pacientes DP esporádicos, dos quais 1/3 manifestaram a doença antes dos 21 anos. Quatro mutações *missenses* foram identificadas em heterozigose neste trabalho.

Entre os trabalhos que identificaram mutações numa frequência entre 0,5% e 2,5%, Ning e colaboradores (2008) estudaram 117 pacientes com DP de início precoce e identificaram uma mutação em homozigose, que estava presente em

heterozigose nos parentes não afetados do paciente. Lin e colaboradores (2008), ao analisarem 182 pacientes com DP de origem oriental, identificaram uma mesma variante missense em heterozigose em três pacientes: dois casos esporádicos e um caso familiar. Qing-Zhou e colaboradores (2010) triaram uma mutação (p.A746T), descrita por Lin e colaboradores (2008) em 532 chineses com DP de manifestação precoce e tardia, e identificaram essa mutação em heterozigose num paciente com DP de início precoce sem história familiar da doença e também em um indivíduo controle normal.

Considerando os estudos realizados até o momento, podemos observar que, em sua maioria, as mutações *missenses* identificadas ocorreram em heterozigose. Estas variantes gênicas *missenses* em heterozigose alteram a estrutura da proteína e podem impedir o seu transporte dentro da célula, bem como a sua interação com outras proteínas (Sidransky, 2006). Estas mutações poderiam levar à disfunção lisossômica e conseqüente agregação de proteínas, como a α -sinucleína dentro da célula. Desta forma, mutações heterozigotas no gene *ATP13A2* poderiam ser, de fato, um fator de risco para o desenvolvimento da DP (Di Fonzo *et al.*, 2007).

No presente estudo, identificamos apenas variantes não-patogênicas em 6,9% dos casos e, apesar de nossos achados estarem em concordância com alguns estudos (Guo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2009), entendemos ser necessário estender a análise molecular do gene *ATP13A2* para uma amostra maior de pacientes, assim como, ampliar as regiões gênicas investigadas, tendo em vista que as mutações patogênicas relatadas na literatura estão distribuídas ao longo de todo o gene *ATP13A2*. Com isso, não podemos excluir que mutações estejam presentes em outras regiões codificantes do gene *ATP13A2*, não analisadas neste estudo, e desta forma, se faz necessário o estudo dessas regiões para que possamos estabelecer o papel deste gene como causa da doença da DP em pacientes brasileiros.

6 CONCLUSÃO

- ❖ Foram identificadas oito variantes de sequência em 116 indivíduos brasileiros com DP.
- ❖ As variantes silenciosas c.2970G>A e c.3192C>T e a alteração intrônica c.3084-3C>T foram classificadas como não patogênicas. As variantes silenciosas c.132A>G e c.1610G>T e as alterações intrônicas c.106-30G>T, c.1306+42_1306+43insC e c.3083+24C>T foram classificadas como provavelmente não patogênicas.
- ❖ Os dados alcançados em nosso estudo, em comparação com os da literatura, mostram que as mutações patogênicas no gene *ATP13A2* são uma causa rara da doença de Parkinson na amostra de pacientes brasileiros investigada. Salientamos, entretanto, a necessidade de estender nossos estudos para um maior número de pacientes, além de realizar a análise molecular de toda a sequência gênica, de forma a avaliar a real relação deste gene como causa da DP em nossa população.

REFERÊNCIAS

Allam MF, Campbell MJ, Hofman A, *et al.* Smoking and Parkinson's disease: systematic review of prospective studies. *Mov Disord.* 2004; 19:614-621.

Alnemri ES. HtrA2 and Parkinson's disease: think PINK1. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1227-1229.

Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, *et al.* Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol.* 2001; 50:56-63.

Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, *et al.* Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet.* 1983; 64: 227-231.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003; 24:197-211.

Belin AC & Westerlund M. Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J.* 2008; 275: 1377-1383.

Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, *et al.* Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol.* 2008; 255: 8-17.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 2003; 299:256-259.

Bonifati V. Shaking the genome: new studies reveal genetic risk for Parkinson's disease. *Neurology.* 2010; 9:136-138.

Bras J, Singleton A, Cookson MR, Hardy J. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS J.* 2008; 275: 5767-5763.

Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74:29-52.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004; 305: 1292-129

Davis JW, Grandinetti A, Waslien CI, Ross GW, White LR, Morens DM. Observations on serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. 1996; 144:480-484.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003; 39:889-909.

Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 2003; 302:819-822.

De Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2005; 58:797-800.

Deng H, Jankovic J, Guo Y, Xie W, Le W. Small interfering RNA targeting the *PINK1* induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 337:1133-1138.

Dick FD. Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull*. 2006; 79-80:219-231.

Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J, Rohé CF, *et al*. Comprehensive analysis of the *LRRK2* gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14: 322-331.

Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, *et al*. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007; 68:1557-1562.

Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, *et al*. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*. 2008; 72:240-245.

Djarmati A, Hagenah J, Reetz K, Winkler S, Behrens MI, Pawlack H, Lohmann K, Ramirez A, Tadic V, Bruggemann N, *et al*. ATP13A2 variants in early-onset Parkinson's Disease patients and controls. *Movement Disorders*. 2009; 24:2104-2111

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, *et al.* Projected number of people with Parkinson's disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2007; 68:384-386.

Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 991:1-14.

Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:306-318.

Fei QZ, Cao L, Xiao Q, Zheng L, Wang XJ, Wang G, Zhou HY, Wang Y, Chen SD. Lack of association between *ATP13A2* Ala746Thr variant and Parkinson's disease in Han population of mainland China. *Neuroscience Letters*. 2010; 475:61-63.

Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, *et al.* Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol*. 2005; 62:91-95.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55:259-272.

Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, *et al.* The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain*. 2002; 125:861-870.

Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, *et al.* PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*. 2006; 129:1720-1731.

Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, *et al.* A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet*. 1998; 18:262-265.

Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792:587-596.

Gosal D, Ross OA, Toft M, *et al.* Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol*. 2006; 13:616-627.

Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, *et al.* The Parkinson disease causing *LRRK2* mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet*. 2006; 15: 223-232.

Guo JF, Xiao B, Liao B, Zhang XW, Nie LL, Zhang YH, et al. Mutation analysis of Parkin, *PINK1*, *DJ-1* and *ATP13A2* genes in Chinese patients with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Mov Disord*. 2008; 23:2074-2079.

Hampshire, D.J. et al. Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J. Med. Genet*. 2001; 38: 680–682.

Hancock DB, Martin ER, Stajich JM, et al. Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2007; 64:576-580.

Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, et al. Novel *PINK1* mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*. 2004; 56: 424-427.

Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2002; 52:549-555.

Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*. 1989; 4:87-96.

Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher Disease: Mutation and Polymorphism Spectrum in the Glucocerebrosidase Gene (*GBA*). *Hum Mut*. 2008; 29:567-583.

Jankovic J. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology*. 2005; 64:2021-2028.

Kamel F, Tanner C, Umbach D, et al. Pesticide exposure and self reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am J Epidemiol*. 2007; 165:364-374.

Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetics findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2007; 20:453-464.

Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007; 6:652–662.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, *et al.* Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998; 392:605-608.

Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H, *et al.* *Parkin* enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 883-895.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983; 219:979-980.

Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry.* 1998; 37:3358-3368.

Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T *et al.* Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol.* 2002; 322:1089-1102.

Lautier C, Goldwurm S, Durr A, *et al.* Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2008; 82:822-833.

LaVoie MJ, Cortese GP, Ostaszewski BL, Schlossmacher MG. The effects of oxidative stress on parkin and other E3 ligases. *J Neurochem.* 2007; 103:2354-2368.

Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci.* 2004; 24: 1888-1896.

Lei W, Guo JF, Li-luo N, Hai-nan Z, Lu S, Hong J, Qian P, Kun X, Bei-sha T, Xin-xiang Y. A new variant of the *ATP13A2* gene in Chinese patients with early-onset parkinsonism. *Chinese Medical Journal.* 2009; 122:3082-3085

Leroy E, Boyer R, Auburger G, *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 1998; 395:451-452.

Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:R48-R59.

Lin CH, Tan EK, Chen ML, Tan LC, Lim HQ, Chen GS, et al. Novel ATP13A2 variant associated with Parkinson disease in Taiwan and Singapore. *Neurology.* 2008; 71:1727e32.

Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury Jr PT. The *UCH-L1* gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell.* 2002; 111: 209-218.

Mao XY, Burgunder ZJ, Zhang XL, Peng, RP. *ATP13A2* G2236A variant is rare in patients with early-onset Parkinson's disease and familial Parkinson's disease from mainland China. *Parkinsonism and Related Disorders.* 2009;1-2

Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest.* 2008; 118: 777-778.

Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman AH. Analysis of glucocerebrosidase activity using *N*-(1-[¹⁴C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *Biochem J.* 1994; 303: 377-382.

Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, et al. Association of *DJ-1* and *parkin* mediated by pathogenic *DJ-1* mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 71-84.

Najim al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand.* 1994; 89:347– 352.

Ning, YP.; Kanai, K.; Tomiyama, H.; Li, Y.; Funayama, M.; Yoshino, H.; Sato, S.; Asahina, M.; Kuwabara, S.; Takeda, A., et al. PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype; *Neurology.* 2008; 70:1491-1493.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord.* 2004; 19:997-1005.

Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans E, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44: 595-600.

Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, *et al.* Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:124-135.

Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, *et al.* Wild-type *PINK1* prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson's disease-related mutations. *J Biol Chem.* 2005; 280: 34025-34032.

Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res.* 2001; 86:122-127.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, *et al.* Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997; 276: 2045-2047.

Rakovic A, Stiller B, Djarmati A, Flaquer A, Freudenberg J, Toliat MR, Linnebank M, Kostic V, Lohmann K, Paus S, Nurnberg P, Kubisch C, Klein C, Wullner U, Ramirez A. Genetic association study of the P-type ATPases *ATP13A2* in late-onset Parkinson's Disease. *Movement Disorders.* 2009; 24:429-433

Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *ATP13A2*, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet.* 2006; 38:1184-1191.

Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, *et al.* Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2007; 64:990-997.

Saaksjarvi K, Knekt P, Rissanen H, Laaksonen MA, Reunanen A, Mannisto S. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62:908-915.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, *et al.* Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 2003; 302:841.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997; 388:839-840.

Tanner CM, Aston DA. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2000; 13:427–430.

Tao X & Tong L. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 2003; 278: 31372-31379.

Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:905–906.

Twelves D, Perkins KSM, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Movement Disord*. 2003; 18:19–31.

Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009; 41:1303–07.

Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2009; 41:1308–12.

Shafit-Zagardo B, Devine EA, Smith M, Arredondo-Vega F, Desnick RJ. Assignment of the gene for acid β -glucosidase to human chromosome 1. *Am J Hum Genet*. 1981; 33: 564-575.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, *et al*. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*. 2000; 25:302-305.

Shulman LM. Gender differences in Parkinson's disease. *Gend Med*. 2007; 4:8-18.

Schultheis PJ, Hagen TT, O'Toole KK, Tachibana A, Burke CR, McGill DL. Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323:731-738.

Sidranky E. Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for complex disease. *Clin Genet*. 2006; 70:275-282.

Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) interacts with *parkin*, and mutant *LRRK2* induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:18676-18681.

Sriram SR, Li X, Ko HS, Chung KK, Wong E, Lim KL, *et al.* Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of *parkin*. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:2571-2586.

Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, *et al.* Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:2099-2111.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* 2001; 8:613-621.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science.* 2004; 304:1158-1160.

Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, *et al.* Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003; 157:1015-1022.

Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L. Neurobiology of alpha-synuclein. *Mol Neurobiol.* 2004; 30:1-21

Vilarino-Guell, A.I. Soto, S.J. Lincoln, S. Ben Yahmed, M. Kefi, M.G. Heckman, M.M. Hulihan, H. Chai, N.N. Diehl, R. Amouri, A. Rajput, D.C. Mash, D.W. Dickson, L.T. Middleton, R.A. Gibson, F. Hentati, M.J. Farrer, ATP13A2 variability in Parkinson disease, *Hum. Mutat.* 2009; 30: 406–410.

Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Stefanis L. α -synuclein degradation by autophagic pathways: A potential key to Parkinson's Disease pathogenesis. *Autophagy.* 2008; 4: 917-919.

Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinnztein DC. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem.* 2003; 278: 25009-25013.

Weisskopf MG, O'reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 2007;166:561–567.

Weisskopf MG, Grodstein F, Ascherio A. Smoking and cognitive function in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007;22:660-665.

West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in *LRRK2* link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet.* 2007; 16:223-232.

Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 2006, 12:521-528.

Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:13354-13359.

Zimprich A, Schulte C, Reinthaler E. PARK11 gene (GIGYF2) variants Asn56Ser and Asn457Thr are not pathogenic for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15:532-534.

Zhong N, Kim CY, Rizzu P, Geula C, Porter DR, Pothos EN, *et al.* *DJ-1* transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor. *J Biol Chem.* 2006; 281:20940-20948.

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (27/06/07) (Isis Pharmaceuticals, Inc). Disponível em: “<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>”.

Ensembl:http://www.ensembl.org/Homo_sapien?db=core;g=ENSG00000204120;r=2:233562015-233725285;t=ENST00000409547)

ESEfinder: http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home

RESCUE-ESE: <http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>

SpliceView : <http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>

NNSPLICE: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

ANEXO A - Termo de consentimento: pacientes



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Departamento de Genética
Serviço de Genética Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do Projeto: Fatores genéticos de risco para a Doença de Parkinson: Investigação dos genes *SNCA*, *PARKIN*, *UCH-L1*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRRK2*, *GBA*, *ATP13A2*, *HTRA2* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros
Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisadores: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (coordenador); Cíntia Barros Santos-Rebouças; João Santos Pereira; Ana Lúcia Zuma de Rosso; Denise Hack Nicaretta.

NOME DO PACIENTE: _____ **DN:** _____

REGISTRO: _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "Fatores genéticos de risco para a Doença de Parkinson: Investigação dos genes *SNCA*, *PARKIN*, *UCH-L1*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRRK2*, *GBA*, *ATP13A2*, *HTRA2* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações nestes genes em pacientes com doença de Parkinson e determinar se estas alterações são causa da doença.

Os resultados dessa pesquisa poderão abrir novas perspectivas para a identificação de causas genéticas, recentemente identificadas, associadas com esta patologia. Os indivíduos selecionados para participarem deste projeto são pacientes de ambos os sexos com doença de Parkinson de causa desconhecida.

Todas as condutas adotadas nesta pesquisa seguirão as normas de bioética descritas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo genético terá uma duração de três anos. A participação do paciente neste projeto é voluntária e, a qualquer momento, ele poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, sem que haja penalização ou prejuízo ao cuidado do paciente.

Os exames para pesquisar defeitos nos genes acima citados serão gratuitos e serão realizados a partir de uma única amostra de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao paciente, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou hematomas. Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de Biólogos tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O DNA extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao paciente o direito de retirá-lo do banco de DNA, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

As condições de sigilo quanto às informações coletadas e aos resultados das análises, assim como, a identidade dos pacientes serão preservadas. Os resultados dos testes realizados somente serão revelados ao paciente que autorizou a realização dos exames e também serão utilizados com fins científicos, podendo vir a ser divulgados em revistas científicas, respeitando a privacidade e o anonimato dos participantes.

Ao paciente será fornecido todo e qualquer esclarecimento que se fizer necessário antes, durante e após a realização da pesquisa, que visa beneficiar os pacientes e suas famílias através dos diagnósticos encontrados.

Eu, _____, identidade n° _____, declaro que li e compreendi o que me foi explicado e, desta forma, autorizo voluntariamente minha participação no estudo.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 500
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 / 2334.0499- Fax (021) 2334.0309
Email: pimentel@uerj.br
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas
Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3020, bloco E, 3o andar, Maracanã - Rio de Janeiro, RJ, e-mail: etica@uerj.br

ANEXO B - Termo de consentimento: amostra controle



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Departamento de Genética
Serviço de Genética Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO DA AMOSTRA CONTROLE

Título do Projeto: Fatores genéticos de risco para a Doença de Parkinson: Investigação dos genes *SNCA*, *PARKIN*, *UCH-L1*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRRK2*, *GBA*, *ATP13A2*, *HTRA2* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros
Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisadores: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (coordenador); Cíntia Barros Santos-Rebouças; João Santos Pereira; Ana Lúcia Zuma de Rosso; Denise Hack Nicaretta.

NOME DO PARTICIPANTE: _____ **DN:** _____

REGISTRO SERVGEN: _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "Fatores genéticos de risco para a Doença de Parkinson: Investigação dos genes *SNCA*, *PARKIN*, *UCH-L1*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRRK2*, *GBA*, *ATP13A2*, *HTRA2* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações nestes genes em pacientes com doença de Parkinson e determinar se estas alterações são causa da doença.

Os resultados dessa pesquisa poderão abrir novas perspectivas para a identificação de causas genéticas, recentemente identificadas, associadas com esta patologia e sua participação como voluntário servirá para que possamos comparar a incidência das alterações gênicas encontradas nos pacientes com a do grupo de pessoas normais, sem a doença de Parkinson. Os indivíduos selecionados para participarem deste projeto são brasileiros de ambos os sexos sem parkinsonismo ou história familiar da doença de Parkinson.

Todas as condutas adotadas nesta pesquisa seguirão as normas de bioética descritas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo genético terá uma duração de três anos. A participação dos controles neste projeto é voluntária e, a qualquer momento, ele poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, sem que haja penalização ou prejuízo.

Os exames para pesquisar defeitos nos genes acima citados serão gratuitos e serão realizados a partir de uma única amostra de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao paciente, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou hematomas. Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de Biólogos tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O DNA extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao participante o direito de retirá-lo do banco de DNA, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

As condições de sigilo quanto às informações coletadas e aos resultados das análises, assim como, a identidade dos participantes serão preservadas. Os resultados dos testes poderão vir a ser divulgados em revistas científicas, respeitando a privacidade e o anonimato dos participantes.

Ao participante será fornecido todo e qualquer esclarecimento que se fizer necessário antes, durante e após a realização da pesquisa, que visa beneficiar os pacientes com doença de Parkinson e suas famílias através dos diagnósticos encontrados.

Eu, _____, identidade nº _____, declaro que li e compreendi o que me foi explicado e, desta forma, autorizo voluntariamente minha participação no estudo.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 500
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 / 2334.0499- Fax (021) 2334.0309
Email: pimentel@uerj.br
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas
Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3020, bloco E, 3o andar, Maracanã - Rio de Janeiro. RJ. e-mail: etica@uerj.br

ANEXO C - Documento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (REG.032.2.2008 – parecer 004/2009)



Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Sr2
Comissão de Ética em Pesquisa – COEP

Rua São Francisco Xavier, 524, bloco E, 3º andar, sala 3018 - Maracanã.
CEP 20550-900 – Rio de Janeiro, RJ.
E - mail: etica@uerj.br - Telefone: (21) 2569-3490

PARECER COEP 004/2009

A Comissão de Ética em Pesquisa – COEP, em sua 11ª Reunião Ordinária em 11 de dezembro de 2008, analisou o protocolo de pesquisa nº. 032.2.2008, segundo as normas éticas vigentes no país para pesquisa envolvendo sujeitos humanos e emite seu parecer.

Projeto de pesquisa: “Fatores Genéticos de risco para a Doença de Parkinson dos genes SNCA, PARKIN, UCH-L 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2 e GIGYF2 em pacientes brasileiros.”

Pesquisador Responsável: Profa Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Instituição Responsável: IBRAG/UERJ

Área do Conhecimento: 2.00- Ciências Biológicas – 2.02- Genética

Palavras-chave: Doença de Parkinson, fatores genéticos, disfunção mitocondrial, sistema ubiquitina-proteossomo.

Sumário: Nos dias de hoje, o envelhecimento populacional é um dos maiores desafios para a saúde pública e em decorrência deste fato, a incidência de doenças neurodegenerativas tem aumentado significativamente. Esta pesquisa pretende estudar os genes SNCA, PARKIN, UCH-L 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2 e GIGYF2 em pacientes brasileiros com DP, de forma a avaliar se estes fatores genéticos desempenham um papel relevante na etiologia desta doença em nossa população, bem como identificar seus mecanismos de atuação, aumentando o conhecimento nesta área.

Objetivo: Estudar os genes SNCA, PARKIN, UCH-L 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2, e GIGYF2 em brasileiros com Doença de Parkinson (DP), de forma a avaliar se estes fatores genéticos desempenham um papel relevante na etiologia desta doença na população, bem como, identificar seus mecanismos de atuação. Espera-se que os dados gerados por este projeto trarão contribuição relevante para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta neuropatologia.

Considerações Finais: A COEP considerou o projeto bem fundamentado, apresentado de forma clara e organizada. O currículo da pesquisadora responsável demonstra que a mesma possui competência comprovada no tema da pesquisa. A metodologia utilizada está adequada aos objetivos propostos.

Após o atendimento à solicitação do Parecer COEP nº063/2008, a Comissão deliberou pela aprovação do projeto.

Faz-se necessário apresentar Relatório Anual - previsto para março de 2010, para cumprir o disposto no item VII. 13.d da RES. 196/96/CNS. Além disso, a COEP deverá ser informada de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.

Situação: Projeto Aprovado

Rio de Janeiro, 05 de março de 2009.


Prof. Dr. Olinto Pegoraro

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa - UERJ

Olinto Pegoraro
Coordenador
Comissão de Ética em Pesquisa - UERJ

ANEXO D - Tabela com os resultados da presença da variante c.1610G>T em indivíduos saudáveis.

Nº	Registro	Idade (anos)	Sexo	c.1610G>T
1	PAR1489/07A	74	FEM	NEGATIVO
2	PAR1485/07A	74	FEM	NEGATIVO
3	PAR1486/07A	61	FEM	NEGATIVO
4	PAR1487/07A	84	FEM	NEGATIVO
5	PAR1488/07A	83	FEM	NEGATIVO
6	PAR1489/07A	74	FEM	NEGATIVO
7	PAR1490/07A	80	FEM	POSITIVO
8	PAR1491/07A	77	MAS	NEGATIVO
9	PAR1492/07A	63	FEM	NEGATIVO
10	PAR1529/07A	61	FEM	NEGATIVO
11	PAR1530/07A	68	FEM	NEGATIVO
12	PAR1531/07A	74	FEM	NEGATIVO
13	PAR1532/07A	67	FEM	NEGATIVO
14	PAR1533/07A	65	FEM	NEGATIVO
15	PAR1534/07A	73	FEM	NEGATIVO
16	PAR1535/07A	72	MAS	NEGATIVO
17	PAR1536/07A	80	FEM	NEGATIVO
18	PAR1537/07A	71	FEM	NEGATIVO
19	PAR1538/07A	67	FEM	NEGATIVO
20	PAR1539/07A	77	FEM	NEGATIVO
21	PAR1601/07A	58	FEM	NEGATIVO
22	PAR1665/07A	58	FEM	NEGATIVO
23	PAR1686/07A	75	FEM	NEGATIVO
24	PAR1687/07A	62	MAS	NEGATIVO
25	PAR1688/07A	74	FEM	NEGATIVO
26	PAR1689/07A	78	FEM	NEGATIVO
27	PAR1690/07A	81	FEM	NEGATIVO
28	PAR1691/07A	59	FEM	NEGATIVO
29	PAR1692/07A	65	FEM	NEGATIVO
30	PAR1693/07A	69	FEM	NEGATIVO
31	PAR1694/07A	73	MAS	NEGATIVO
32	PAR1784/08A	65	FEM	NEGATIVO
33	PAR1786/08A	71	FEM	NEGATIVO
34	PAR1787/08A	67	FEM	NEGATIVO
35	PAR1790/08A	64	FEM	NEGATIVO
36	PAR2051/09A	51	MAS	NEGATIVO
37	PAR2052/09A	54	MAS	NEGATIVO
38	PAR2053/09A	60	MAS	NEGATIVO
39	PAR2054/09A	50	MAS	NEGATIVO
40	PAR2060/09A	58	MAS	NEGATIVO
41	PAR2061/09A	58	MAS	NEGATIVO
42	PAR2062/09A	53	MAS	NEGATIVO
43	PAR2073/09A	55	MAS	NEGATIVO
44	PAR2074/09A	63	MAS	NEGATIVO
45	PAR2075/09A	57	MAS	NEGATIVO
46	PAR2076/09A	56	MAS	NEGATIVO
Nº	Registro	Idade	Sexo	c.1610G>T

		(anos)		
47	PAR2077/09A	54	MAS	NEGATIVO
48	PAR2078/09A	51	MAS	NEGATIVO
49	PAR2094/09A	63	MAS	NEGATIVO
50	PAR2102/09A	51	MAS	NEGATIVO
51	PAR/210309A	54	MAS	NEGATIVO
52	PAR2104/09A	53	MAS	NEGATIVO
53	PAR2105/09A	56	MAS	NEGATIVO
54	PAR2109/09A	54	MAS	NEGATIVO
55	PAR2110/09A	56	MAS	NEGATIVO
56	PAR2111/09A	59	MAS	NEGATIVO
57	PAR2124/09A	59	MAS	NEGATIVO
58	PAR2125/09A	53	MAS	NEGATIVO
59	PAR2132/09A	63	MAS	NEGATIVO
60	PAR2135/09A	55	MAS	NEGATIVO
61	PAR2144/09A	56	MAS	NEGATIVO
62	PAR2146/09A	63	MAS	NEGATIVO
63	PAR2147/09A	58	MAS	NEGATIVO
64	PAR2148/09A	63	MAS	NEGATIVO
65	PAR2159/09A	52	FEM	NEGATIVO
66	PAR2160/09A	56	MAS	NEGATIVO
67	PAR2161/09A	57	MAS	NEGATIVO
68	PAR2168/09A	71	FEM	NEGATIVO
69	PAR2169/09A	74	FEM	NEGATIVO
70	PAR2170/09A	72	MAS	NEGATIVO
71	PAR2171/09A	60	MAS	NEGATIVO
72	PAR2174/09A	66	MAS	NEGATIVO
73	PAR2175/09A	68	FEM	NEGATIVO
74	PAR2176/09A	51	FEM	NEGATIVO
75	PAR2177/09A	66	FEM	NEGATIVO
76	PAR2178/09A	56	MAS	NEGATIVO
77	PAR2179/09A	61	FEM	NEGATIVO
78	PAR2181/09A	57	MAS	NEGATIVO
79	PAR2182/09A	82	FEM	NEGATIVO
80	PAR2183/09A	54	MAS	NEGATIVO
81	PAR2184/09A	52	MAS	NEGATIVO
82	PAR2185/09A	51	MAS	NEGATIVO
83	PAR2186/09A	51	MAS	NEGATIVO
84	PAR2188/09A	51	MAS	NEGATIVO
85	PAR2189/09A	56	MAS	NEGATIVO
86	PAR2193/09A	54	MAS	NEGATIVO
87	PAR2194/09A	85	MAS	NEGATIVO
88	PAR2196/09A	62	MAS	NEGATIVO
89	PAR2197/09A	58	FEM	NEGATIVO
90	PAR2199/09A	80	FEM	NEGATIVO
91	PAR2200/09A	64	FEM	NEGATIVO
92	PAR2201/09A	95	FEM	NEGATIVO

Nº	Registro	Idade (anos)	Sexo	c.1610G>T
93	PAR2202/09A	60	MAS	NEGATIVO
94	PAR2203/09A	73	FEM	NEGATIVO
95	PAR2204/09A	63	FEM	NEGATIVO
96	PAR2205/09A	72	MAS	NEGATIVO
97	PAR2206/09A	52	FEM	NEGATIVO
98	PAR2207/09A	58	FEM	NEGATIVO
99	PAR2208/09A	64	FEM	NEGATIVO
100	PAR2209/09A	66	FEM	NEGATIVO
101	PAR2210/09A	56	FEM	NEGATIVO
102	PAR2211/09A	68	MAS	POSITIVO
103	PAR2212/09A	66	FEM	NEGATIVO
104	PAR2213/09A	66	FEM	NEGATIVO
105	PAR2222/09A	70	FEM	NEGATIVO
106	PAR2223/09A	68	FEM	NEGATIVO
107	PAR2224/09A	50	MAS	NEGATIVO
108	PAR2225/09A	75	FEM	NEGATIVO
109	PAR2226/09A	79	FEM	NEGATIVO
110	PAR2227/09A	75	FEM	NEGATIVO
111	PAR2233/09A	57	MAS	NEGATIVO
112	PAR2243/09A	75	MAS	NEGATIVO
113	PAR2244/09A	58	FEM	NEGATIVO
114	PAR2245/09A	79	MAS	NEGATIVO
115	PAR2246/09A	52	FEM	NEGATIVO
116	PAR2247/09A	53	MAS	NEGATIVO
117	PAR2248/09A	50	FEM	NEGATIVO
118	PAR2249/09A	58	MAS	NEGATIVO
119	PAR2250/09A	74	FEM	NEGATIVO
120	PAR2251/09A	64	FEM	NEGATIVO
121	PAR2252/09A	56	FEM	NEGATIVO
122	PAR2253/09A	61	MAS	NEGATIVO
123	PAR2297/09A	55	MAS	NEGATIVO
124	PAR2324/09A	55	MAS	NEGATIVO
125	PAR2325/09A	85	MAS	NEGATIVO
126	PAR2336/09A	56	MAS	NEGATIVO
127	PAR2337/09A	52	MAS	NEGATIVO
128	PAR2351/09A	51	MAS	NEGATIVO
129	PAR2361/09A	61	MAS	NEGATIVO
130	PAR2363/09A	59	MAS	NEGATIVO
131	PAR2298/09A	57	MAS	NEGATIVO
132	PAR2409/10A	52	MAS	POSITIVO
133	PAR2440/09A	56	FEM	NEGATIVO
134	PAR2241/09A	55	FEM	NEGATIVO
135	PAR2242/09A	68	FEM	NEGATIVO
136	PAR2243/09A	74	FEM	NEGATIVO
137	DA1479/07A	64	FEM	NEGATIVO
138	DA1480/07A	70	FEM	NEGATIVO
139	DA1525/07A	61	FEM	NEGATIVO
140	DA2166/09A	63	MAS	NEGATIVO

ANEXO E – Artigo submetido a revista *Neuroscience Letters*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)