

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

SUANE REIS BARBOSA

ESTUDO DE POLIMORFISMOS NO GENE *GRIK2* EM PACIENTES COM
DOENÇA DE PARKINSON

BELÉM

2017

SUANE REIS BARBOSA

ESTUDO DE POLIMORFISMOS NO GENE *GRIK2* EM PACIENTES COM
DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Carlos Santana da
Silva

BELÉM

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Hospitalar João de Barros Barreto (UFPA/EBSERH)

Barbosa, Suane Reis, 1988-

Estudo de polimorfismos no gene *GRIK2* em pacientes com doença de Parkinson. / Suane Reis Barbosa; Orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva. — 2017.

56 f. : il. ; color. ; 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2017.

1. Doença de Parkinson. 2. Polimorfismos genético. 3. Marcadores genéticos. I. Silva, Luiz Carlos Santana da, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.833

SUANE REIS BARBOSA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Examinadores: Prof. Dra. Elizabeth Sumi Yamada
Hospital Universitário João de Barros Barreto, UFPA

Prof. Dr. Erik Artur Cortinhas Alves
Universidade do Estado do Pará, UEPA

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

BELÉM

2017

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

À Rosa, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela conclusão de mais uma etapa acadêmica, por tudo o que Ele me concedeu na vida, por toda a providência e pelo Seu imenso Amor.

Ao Prof.Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, por ter me acolhido na orientação do mestrado, por todo apoio, paciência, ajuda e sugestões.

À Rosa, minha mãe, por sempre ter sido meu porto seguro, por toda a dedicação, paciência, zelo e amor por mim.

Ao Carlos Amaral, meu noivo, cúmplice, companheiro, amigo e inspiração profissional. Agradeço pela imensa contribuição neste trabalho, pela incansável ajuda e pelo incentivo. Obrigada também por fazer dos meus dias melhores e mais felizes.

À Tia Judith, Tio Edgard (*in memoriam*) e família que sempre me ajudaram e me apoiaram nos meus estudos e em qualquer coisa que eu precisasse.

A todos os membros de minha família e aos meus amigos que sempre me motivaram.

A toda equipe do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo que colaboraram para este trabalho.

E finalmente, a todos os pacientes e participantes que possibilitaram este estudo.

RESUMO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS NO GENE *GRIK2* EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa complexa, resultante da múltipla combinação de fatores genéticos e ambientais. Um dos fatores que pode contribuir para o desenvolvimento da DP é a excitotoxicidade, um processo patofisiológico causado por intensa estimulação de receptores glutamatérgicos. Este fenômeno neurotóxico está associado ao excessivo influxo de íons na célula (Na^+ , Cl^- e principalmente o Ca^{2+}), resultando na morte neuronal. Foi evidenciado que a subunidade GluK2 do receptor de glutamato do tipo Kainato interage com a parkina, acentuando o processo excitotóxico. O gene *GRIK2* codifica esta subunidade, sendo expresso em regiões do cérebro envolvidas na atividade motora, podendo sofrer “*splicing*” alternativo ou edição de RNA, introduzindo novas isoformas que podem alterar a condutância de íons no receptor. Não há na literatura científica estudos de associação de polimorfismos no gene *GRIK2* com a DP. Este estudo teve como objetivo determinar as frequências genotípicas e alélicas, bem como verificar uma possível influência dos SNPs rs3213607, rs2227281, rs2227283, rs2235076, rs4839797, rs2518261 no gene *GRIK2* em uma amostra de pacientes com DP. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, com a análise de amostras de DNA de 129 indivíduos do grupo controle, e 61 pacientes do grupo DP. Verificou-se que para o SNP rs2518261 (C/T) o alelo T pareceu ter um efeito de risco no grupo DP ($\chi^2=19,085$; p-valor < 0,0001; OR=2,75; IC=1,75 – 4,27). Neste polimorfismo também foi observado que o genótipo TT pode representar um fator associado à presença de tremor no grupo DP (p-valor=0,02). Os resultados inéditos deste estudo sugerem a realização de pesquisas maiores para a investigação da contribuição do gene *GRIK2* na DP.

Descritores: Doença de Parkinson. *GRIK2*,. Polimorfismo.

ABSTRACT**STUDY OF *GRIK2* GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE**

Parkinson's Disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder resulting from the multiple combination of genetic and environmental factors. One of the factors that may contribute to PD development is the excitotoxicity, a pathophysiological process caused by intense stimulation of glutamatergic receptors. This neurotoxic phenomenon is associated with the excessive influx of ions in the cell (Na⁺, Cl⁻ and especially Ca²⁺), resulting in neuronal death. It was evidenced that the GluK2 subunit of the kainate type glutamate receptor interacts with parkin, accentuating the excitotoxic process. The *GRIK2* gene encodes this subunit, expressed in regions of the brain involved in motor activity, and may undergo alternative splicing or RNA editing, introducing new isoforms that may alter the ion conductance at the receptor. There are no studies in the literature on the association of polymorphisms in the *GRIK2* gene with PD. This study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies, as well as to verify a possible influence of the SNPs rs3213607, rs2227281, rs2227283, rs2235076, rs4839797, rs2518261 from *GRIK2* gene in a group of patients with PD. A case-control study was performed, with analysis of DNA samples from 129 individuals from the control group and 61 patients from the PD group. It was found that for the SNP rs2518261 (C/T), allele T appeared to have a risk effect in the DP group ($\chi^2 = 19.085$; p-value <0.0001; OR = 2.75; CI = 1.75-4 , 27). In this polymorphism it was also observed that TT genotype may represent a factor associated with the tremor presence in the PD group (p-value = 0.02). These pioneer results of this study, suggest that further research is needed to investigate the contribution of *GRIK2* gene to PD.

Descriptors: Parkinson's Disease. *GRIK2*. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático das interconexões dos gânglios basais.....	6
Figura 2. Receptores ionotrópicos de glutamato.....	10
Figura 3. Ilustração das variantes de splicing alternativo nas subunidades GluK1, GluK2 e GluK3 e dos sítios de edição de RNA (triângulos) nas subunidades GluK1 e GluK2.....	12
Figura 4. Efeito da edição Q/R sobre as propriedades do canal (receptor KA) nas subunidades GluK1 e GluK2.....	12
Figura 5. Representação da estrutura éxon-intron do gene humano <i>GRIK2</i>	15
Figura 6. Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs4839797.....	34
Figura 7. Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs2518261.....	34
Figura 8. Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs3213607.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Informações sobre os SNPs testados do gene <i>GRIK2</i> , tais como: identificação (rs), posição no cromossomo, código TaqMan, região no gene, mudança de aminoácido (AA), sequências alvos e alelos detectados com VIC e FAM dyes.....	23
Tabela 2.	Dados epidemiológicos e clínicos dos indivíduos do grupo DP.....	26
Tabela 3.	Frequências genótípicas e alélicas de seis polimorfismos do gene <i>GRIK2</i> nos indivíduos do grupo controle e do grupo DP	27
Tabela 4.	Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis polimorfismos.....	30
Tabela 5.	Análise de associação genotípica e alélica de três polimorfismos do gene <i>GRIK2</i> em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos indivíduos do grupo DP e grupo controle.....	33
Tabela 6.	Investigação da frequência de associação do SNP rs4839797 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.....	36
Tabela 7.	Investigação da frequência de associação do SNP rs2518261 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.....	37
Tabela 8.	Investigação da frequência de associação do SNP rs3213607 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.....	38

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
Ca⁺	Íon cálcio
Cl⁻	Íon cloro
DF	Graus de liberdade
DP	Doença de Parkinson
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu-808-Glu	Glutamina-808-glutamina
GluK1	Subunidade 1 do receptor de glutamato do tipo kainato
GluK2	Subunidade 2 do receptor de glutamato do tipo kainato
GluK3	Subunidade 3 do receptor de glutamato do tipo kainato
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GRK2	<i>Glutamate receptor, ionotropic kainate 2</i>
IC	Intervalo de confiança
Ile-742-Ile	Isoleucina-742-isoleucina
I/V	Isoleucina/Valina
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
K⁺	Íon Potássio
KA	Ácido caínico
M867I	Metionina-867-isoleucina
MAF	Frequência do menor alelo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-hidropiridina

Na⁺	Íon sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalâmico
OR	Razão de chances
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>p</i>-valor	Probabilidade de significância
Q/R	Glutamina/Arginina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNpc	Substância negra parte compacta
SNpr	Substância negra parte reticulada
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
Y/C	Tirosina/Cisteína
X²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇA DE PARKINSON	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2. Características Clínicas.....	2
1.1.3. Etiologia	3
1.1.4. Fisiopatologia	4
1.2. EXCITOTOXICIDADE MEDIADA POR GLUTAMATO NA DP.....	7
1.3. OS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO	09
1.3.1. Os Receptores do tipo Kainato (KA)	11
1.3.1.1. Influência dos Receptores tipo KA na DP.....	13
1.4. A SUBUNIDADE GLUK2 DO RECEPTOR NA DP.....	14
1.5. O GENE <i>GRIK2</i>	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. TIPO DE ESTUDO	19
3.2. SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	19
3.2.1. Grupo DP: critérios de inclusão e caracterização amostral	20
3.2.2. Grupo controle.....	20
3.3. ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	20
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA	20
3.5. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	21
3.5.1. Seleção dos SNPs	21

3.5.2. Detecção dos SNPs.....	21
3.6. ANÁLISE DOS DADOS DE GENOTIPAGEM.....	24
3.6.1. Frequências genotípicas e alélicas.....	24
3.6.2. Análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	24
3.6.3. Análise de associação caso-controle.....	24
3.6.4. Análise de associação entre SNPs e dados epidemiológicos e clínicos.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DO GRUPO DP.....	26
4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs NO GENE <i>GRIK2</i>	27
4.3. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	29
4.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs ENTRE OS GRUPOS DP E CONTROLE.....	31
4.5. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs E A IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS E SINAIS CLÍNICOS DA DP.....	33
4.6. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs E O DESENVOLVIMENTO DE SINAIS CLÍNICOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, progressiva, incapacitante e de etiologia indeterminada. A DP caracteriza-se pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra. O quadro clínico é composto por rigidez muscular, bradicinesia, tremor em repouso e anormalidades posturais. Além disso, alterações emocionais e cognitivas podem surgir com a progressão da doença (Burch & Sheerin, 2005; Emre, 2003).

1.1.1 Epidemiologia

Considera-se a DP como a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum no mundo, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer. A prevalência da DP em países industrializados é de até 3% de toda a população, afetando aproximadamente 6 milhões de pessoas no mundo (Lau & Breteler, 2006). A incidência desta patologia aumenta com a idade, estima-se que ela atinge de 1 a 2% da população acima dos 65 anos (Spillantini *et al.*, 1997).

Como a DP tem distribuição universal e pode estar presente em todas as classes sociais e etnias, ela é considerada uma doença cosmopolita. Apesar de ocorrer tanto em homens como em mulheres, a DP é mais frequente na população masculina. Estudos realizados sugeriram que uma possível explicação para este fato poderia ser a atuação do estrogênio como um neuroprotetor, porém ainda há controvérsias (Lau & Breteler, 2006)

A mortalidade em pacientes com DP, independente das causas, é 2,22 vezes maior quando comparada com a população em geral, segundo um estudo de meta-análise realizado por XU *et al.* (2013).

No Brasil, não existem estimativas oficiais da DP, mas alguns estudos que utilizaram os portais de dados epidemiológicos do governo brasileiro sugerem que a prevalência da doença seja de 3%. Estima-se que 200 mil indivíduos estejam com DP, e que 36 mil novos casos surgem por ano no país (Peternella & Marcon, 2009; Souza *et al.*, 2011).

1.1.2. Características Clínicas

As alterações fisiopatológicas associadas à DP podem começar anos antes do início dos sintomas motores, incluindo apresentações de certos sintomas não motores, tais como distúrbios do sono, depressão, alterações cognitivas, ansiedade, fadiga, constipação e anosmia (perda do olfato). Nessa fase pré-clínica, a presença dos sintomas não motores podem ser mal interpretados, sendo relacionados ao envelhecimento normal ou outras comorbidades, causando atraso no diagnóstico. Por outro lado, a evidência da fase pré-clínica tem impulsionado pesquisas que focam nas terapias preventivas ou de proteção (DeMaagd & Philip, 2015; Meissner, 2012; Schrag *et al.*, 2015).

De maneira tardia, os pacientes apresentam as características motoras da DP após 50% a 80% dos neurônios dopaminérgicos serem perdidos, quando uma progressão significativa da doença pode estar estabelecida (DeMaagd & Philip, 2015).

As quatro principais manifestações clínicas da DP incluem tremor em repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. O tremor geralmente se apresenta como o sintoma inicial, e ocorre aproximadamente em dois terços dos pacientes com DP. Embora seja comum, o tremor é considerado como sendo o menos incapacitante em comparação com os outros sintomas cardinais (bradicinesia e rigidez) (DeMaagd & Philip, 2015).

A bradicinesia é definida como uma redução na velocidade e na amplitude dos movimentos voluntários. Os pacientes também podem apresentar imobilidade associada à bradicinesia, episódio também denominado de "*freezing*", que é uma manifestação extrema da DP e geralmente ocorre na doença avançada (DeMaagd & Philip, 2015).

O terceiro sintoma cardinal da DP é a rigidez, a qual apresenta aumento do tônus muscular. A rigidez acomete preferencialmente a musculatura flexora, causando alterações típicas da postura (DeMaagd & Philip, 2015).

A quarta característica clínica que geralmente ocorre mais tarde no curso da DP é a instabilidade postural, que possui uma etiologia multifacetada relacionada com outros sintomas motores. Pode ser seriamente incapacitante por causa de sua associação com a perda de equilíbrio e o risco de quedas (Doherty *et al.*, 2011).

O principal recurso para o diagnóstico da DP é a avaliação clínica (Scheffer, 2013). O diagnóstico da DP é baseado em critérios fundamentados na sintomatologia dos pacientes, os quais foram estabelecidos pela *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* – Banco de Cérebros da Sociedade de Doença de Parkinson do Reino Unido (Anexo 1) (Hughes *et al.*, 1992)

Conforme os sintomas da DP progridem, o paciente perde a capacidade de ser independente por causa de déficits nas atividades cotidianas. A mortalidade é frequentemente associada às complicações relacionadas à imobilidade (Brunton, 2012).

1.1.3. Etiologia

A DP apresenta uma etiologia ainda não muito bem definida, sendo um distúrbio multifatorial que resulta provavelmente de complexas interações entre fatores genéticos, ambientais e relacionados ao envelhecimento (Massano, 2011).

Na década de 1980, a hipótese de fatores ambientais envolvidos na DP foi apoiada pela identificação de uma droga sintetizada em laboratório chamada MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-hidropiridina), que causa a degeneração neuronal seletiva, levando a uma síndrome parkinsoniana em roedores, primatas e seres humanos. Desde então, um grande número de agentes ambientais, hábitos e condições foram examinados, incluindo toxinas industriais, metais pesados, tabagismo, ingestão de bebidas como chá ou café, a prática da agricultura e o estilo de vida rural (Corti *et al.*, 2011; Zavariz, 2012).

A maioria dos casos ocorre de forma esporádica, afetando aproximadamente 95% dos pacientes, geralmente com mais de 50 anos. Embora nesses casos a doença não seja herdável, uma história familiar positiva está associada com um risco elevado da DP (Corti *et al.*, 2011).

A DP familiar corresponde a cerca de 5% a 10% dos casos, possui início geralmente precoce e está relacionada com mutações em genes específicos (Hardy, 2003). A caracterização dessa forma da doença permitiu descoberta de dezoito *locus* cromossômicos denominados “*PARK*” que estão associados à DP (Klein & Westenberger, 2012). Algumas

das mutações nestes genes estão associados à forma familiar autossômica dominante (*PARK 1, 4 e 8*), ou autossômica recessiva da DP (*PARK 2, 6, 7, e 13*) (Duque et al., 2015).

Variantes em vários *PARK* e outros genes têm sido associados ao aumento do risco de desenvolvimento da DP. Apesar das alterações nos genes identificados até agora representarem a minoria dos casos de DP, estudos de associação do genoma sugerem que estes mesmos genes podem também desempenhar um papel na forma esporádica da doença (Corti *et al.*, 2011; Klein & Westenberger, 2012).

Muitos estudos têm abordado processos patológicos envolvidos na DP, como o estresse oxidativo, apoptose, neuroinflamação, disfunção mitocondrial e a excitotoxicidade (Blandini *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum desses mecanismos isoladamente pode ser responsável pela patogênese da DP (Massano, 2011).

1.1.4. Fisiopatologia

A fisiopatologia da DP está associada à disfunção dos sistemas neurotransmissores, principalmente, por uma redução nas concentrações de dopamina no estriado em decorrência da perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (Burch & Sheerin, 2005; Jellinger, 1987).

Os “gânglios da base” podem ser entendidos como um conjunto de estruturas subcorticais importantes para controlar e iniciar os movimentos, pois regulam o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinhal. Além do papel desempenhado no controle motor, os gânglios da base estão envolvidos em várias funções emocionais e cognitivas (Purves, 2010). Constituem os gânglios da base: (i) estriado, formado pelo núcleo caudado e putâmen; (ii) globo pálido, que se divide em globo pálido externo (GPe) e globo pálido interno (GPi); (iii) substância negra, dividida em parte compacta (SNpc) e parte reticulada (SNpr) e o (iv) núcleo subtalâmico (NST) (Brunton *et al.*, 2012; Kandel *et al.*, 2014).

As informações provenientes do estriado são projetadas para os núcleos de saída, que são o GPi e a SNpr. A projeção do estriado para os núcleos de saída é realizada por duas vias diferentes: via direta e via indireta (Uc & Follet, 2007).

A via direta transfere informação do estriado para os núcleos de saída (GPi/SNpr), resultando na desinibição do tálamo, o que intensifica estímulos excitatórios do tálamo ao córtex cerebral, facilitando o movimento (Figura 1-A). O neurotransmissor inibitório que participa da via direta é o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Brunton *et al.*, 2012; Uc & Follet, 2007).

A via indireta transmite a informação do estriado ao GPe. Por sua vez, essa estrutura envia projeções para o NST, que gera estímulos eferentes para a os núcleos de saída (GPi/SNpr). Assim como ocorre com a via direta, as duas conexões iniciais – projeções do estriado para o GPe e deste para o NST – utilizam o neurotransmissor inibitório GABA. Contudo, a conexão final – projeção do NST para os núcleos de saída (GPi/SNpr) – é uma via glutamatérgica excitatória. Desta forma, a estimulação da via indireta resulta na redução da saída dos estímulos excitatórios, inibindo o tálamo, e conseqüentemente, inibindo o movimento (Figura 1-A) (Brunton *et al.*, 2011; Uc & Follet, 2007).

A SNpc através da via nigroestriatal, libera dopamina no estriado, sendo um dos moduladores da atividade dos gânglios da base. Nos neurônios espinhosos médios do corpo estriado, estão os dois principais tipos de receptores para a dopamina: D1 (excitatório) na via direta e D2 (inibitório) na via indireta. Desse modo, a dopamina liberada no estriado tende a aumentar a atividade da via direta e reduzir a da via indireta. Enquanto que a depleção de dopamina que ocorre na DP produz o efeito contrário. A estimulação dopaminérgica reduzida, conseqüentemente, acentua os estímulos inibitórios provenientes dos núcleos de saída (GPi/SNpr) para o tálamo e reduz a excitação do córtex cerebral, determinando assim, as manifestações dos sintomas motores da DP (Figura 1-B) (Brunton *et al.*, 2012; Purves *et al.*, 2010).

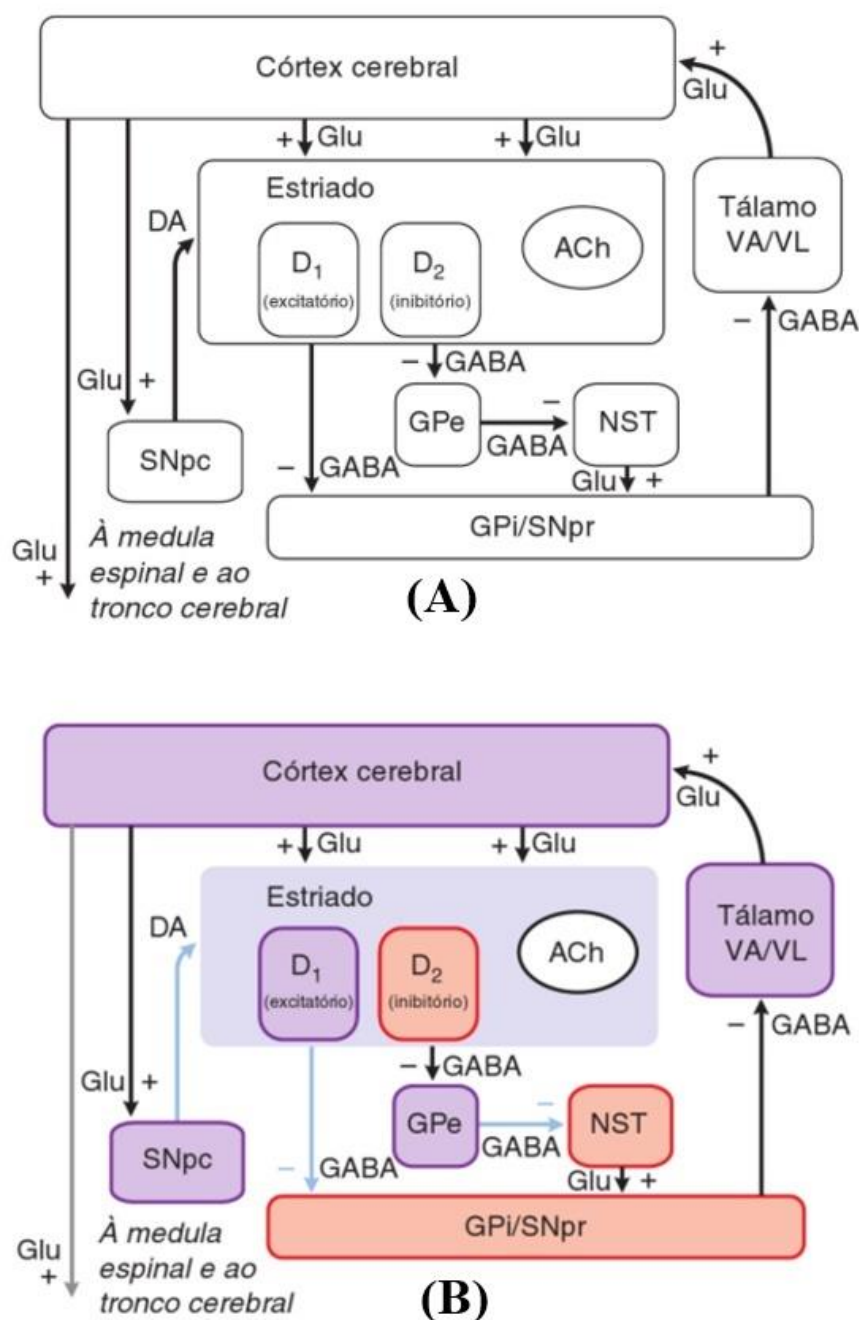


Figura 1: Diagrama esquemático das interconexões dos gânglios basais. (A) A SNpc fornece inervação dopaminérgica aos neurônios do estriado, que dá origem a via direta e indireta, além de regular a atividade relativa destas duas vias. (B) A perda dopaminérgica do estriado na DP faz com que a via direta que se dirige aos núcleos de saída (SNr/GPe) se torne menos ativa (estruturas em roxo), enquanto que a atividade da via indireta é aumentada (estruturas em vermelho). Isso acentua a inibição do tálamo e diminui os estímulos excitatórios do córtex cerebral. As linhas em azul indicam as vias primárias com atividade reduzida (Brunton *et al.*, 2012).

Por muito tempo se acreditou que a morte neuronal progressiva provocava, exclusivamente, a diminuição da função da dopamina na via nigroestriatal (Jellinger, 1987). Porém, apesar deste importante déficit dopaminérgico, outros neurotransmissores estão envolvidos na fisiopatologia da DP, como a acetilcolina, a serotonina, a noradrenalina e o glutamato (Alexander, 2004).

Os neurônios do estriado recebem muitas aferências glutamatérgicas. A função das sinapses glutamatérgicas é de engatilhar os circuitos do estriado, enquanto que as sinapses dopaminérgicas possuem um papel crucial de modulação, regulando a neurotransmissão glutamatérgica (Schiffmann *et al.*, 2007).

1.2. A EXCITOTOXICIDADE MEDIADA POR GLUTAMATO NA DP

O glutamato é conhecido como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e participa de 80% a 90% das sinapses excitatórias cerebrais (Olive, 2009).

O glutamato possui importância na formação da rede neuronal durante o desenvolvimento, regulando a neurogênese, sinaptogênese, eliminação de sinapses, migração celular e morte celular programada (apoptose) (Mattson, 2008). Desempenha papel fundamental na maioria das funções do sistema nervoso como memória, aprendizado, emoções e percepção sensorial (Simeone *et al.*, 2004). Além da transdução de sinal e plasticidade sináptica, o glutamato está envolvido em outros processos fisiológicos, sinalizando eventos em tecidos e órgãos periféricos, bem como em células endócrinas (Moriyama *et al.*, 2000).

O glutamato participa de projeções motoras do córtex para os gânglios da base, medula espinhal e tálamo; bem como dos gânglios da base para o tálamo. Portanto, alterações neste sistema podem comprometer as funções dos gânglios da base, as quais são importantes para a iniciação e controle dos movimentos (Greenamyre, 2001). Apesar do glutamato desempenhar um papel central na neurotransmissão excitatória, alterações na homeostase do glutamato podem ter repercussões significativas sobre os neurônios através da geração de cascatas neurotóxicas ou excitotoxinas (Caudle & Zhang, 2009).

Projeções dopaminérgicas da SNpc para outras regiões dos gânglios da base executam atividades de regulação das funções de algumas vias glutamatérgicas. Na DP, com a depleção de dopamina nigroestriatal, um conjunto complexo de alterações ocorre nos gânglios basais. Dentre estas, a superativação do NST, que provoca um aumento na liberação de glutamato na SNpc e estimula a cascata da excitotoxicidade (Greenamyre, 2001; Finlay & Duty, 2014).

A excitotoxicidade é um processo patológico através do qual os neurônios são danificados após excessiva estimulação de receptores glutamatérgicos. Fenômenos excitotóxicos estão envolvidos em diversas doenças cerebrais além da DP, tais como acidente vascular cerebral, epilepsia e outras doenças neurodegenerativas (Ambrosi *et al.*, 2014).

O exagerado influxo de íons na célula está associado com a excitotoxicidade (Dong *et al.*, 2009). Após estimulação, os receptores glutamatérgicos são imediatamente ativados e o Ca^{2+} pode entrar diretamente nas células através deles (Ambrosi *et al.*, 2014). A sobrecarga de Ca^{2+} intracelular promove a atividade de enzimas dependentes desse cátion, como proteases, lipases e nucleases, resultando na degradação de proteínas, membranas e ácidos nucleicos (Dong *et al.*, 2009). O aumento da concentração de Ca^{2+} provoca a desintegração da membrana, o estresse do retículo endoplasmático, a geração de espécies reativas de oxigênio e a disfunção mitocondrial; que conduzem à apoptose e necrose neuronal (Zhang & Zhu, 2011). Além disso, ocorre a exocitose de vesículas contendo glutamato nas terminações nervosas devido ao nível elevado de Ca^{2+} nas células, contribuindo para o aumento das concentrações extracelulares do neurotransmissor excitatório (Finlay & Duty, 2014).

O acúmulo persistente do glutamato nas sinapses estriatais levam à auto-acumulação de glutamato nos astrócitos. Esse evento satura a capacidade de armazenamento do glutamato pelos astrócitos através da redução da atividade da glutamina sintetase, promovendo a excitotoxicidade (Ambrosi *et al.*, 2014).

A excitotoxicidade mediada por glutamato não é responsável pelo comprometimento e perda neuronal inicial da SNpc na DP, porém é considerada mais do que um efeito secundário de susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos, defeitos moleculares e

bioenergéticos, bem como da neurotransmissão alterada associada com a morte celular nesse núcleo mesencefálico (Ambrosi *et al.*, 2014). Semelhante às outras doenças neurodegenerativas, provavelmente nenhum mecanismo isolado possa causar a morte neuronal na DP, e a excitotoxicidade parece ser uma via final comum às diferentes causas do dano neuronal (Morales *et al.*, 2013).

1.3. OS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

O glutamato executa a sua ação nas células através da ativação de receptores de membrana, localizados em ambos os neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos. Esses receptores são classificados em duas classes principais: receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos (Dong *et al.*, 2009).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes de ligantes, permeáveis a vários cátions (Dong *et al.*, 2009). Medeiam a maioria da transmissão excitatória rápida no SNC de mamíferos e o processamento de informações básicas no cérebro (Marino *et al.*, 2003). Além disso, induzem mudanças na eficácia sináptica, tais como as orientadas para contribuir na aprendizagem e memória, sinaptogênese e nocicepção. Disfunções nesses tipos de receptores contribuem de forma articulada para morte neuronal, constituindo a base para várias doenças neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral, dor neuropática, doença de Alzheimer, doença de Huntington e a DP (Planells-Cases *et al.*, 2006).

Três grupos dividem os receptores ionotrópicos de acordo com a afinidade seletiva para agonistas específicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) e ácido caínico ou cainato (KA) (Planells-Cases *et al.*, 2006). Os receptores ionotrópicos são complexos tetraméricos de subunidades, que são subdivididas de acordo com o gene que as codificam, sendo quatro subunidades para os receptores do tipo AMPA (GluA1-4), cinco subunidades dos receptores do tipo KA (GluK1-5) e sete subunidades para os receptores do tipo NMDA (GluN1, GluN2A-D e GluN3A-B) (Figura 2A) (Kumar & Mayer, 2013).

Cada subunidade é formada por um grande domínio aminoterminal (NH₃) extracelular, um domínio extracelular de ligação ao glutamato, um domínio de membrana e um domínio carboxiterminal (COOH) intracelular (Figura 2B). O domínio de membrana contém três segmentos transmembrânicos (M1, M3 e M4), e uma alça M2 que não atravessa

a membrana e penetra parcialmente no lado citoplasmático da membrana (Figura 2B). Considera-se que a alça M2 forme o filtro de seletividade do canal (Gereau & Swanson, 2008; Kandel *et al.*, 2014).

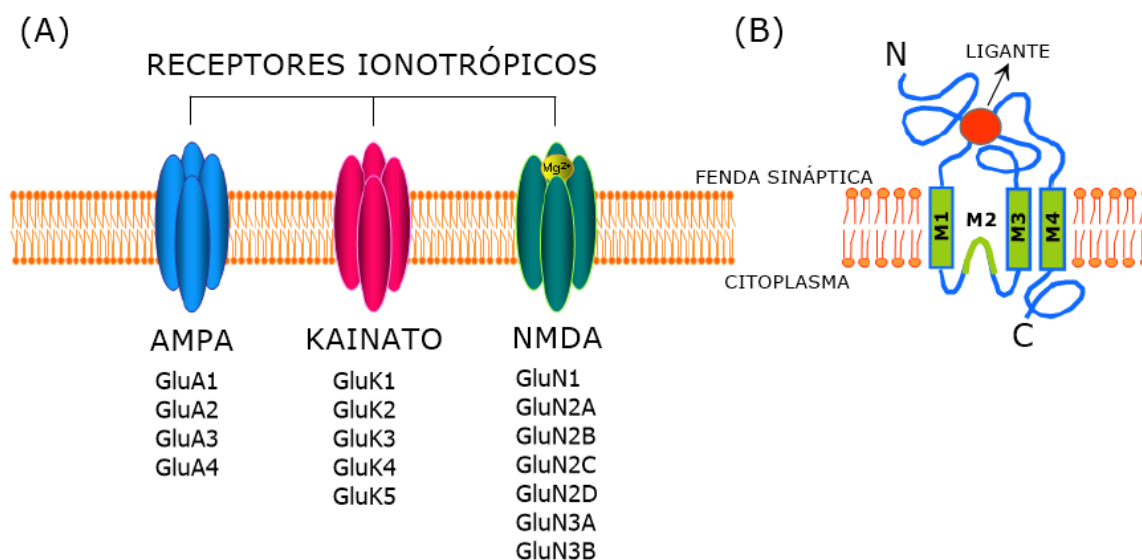


Figura 2: Receptores ionotrópicos de glutamato. (A) Classificação dos receptores ionotrópicos de glutamato e suas subunidades; (B) Representação da estrutura dos receptores ionotrópicos (modificado de Marco *et al.*, 2011).

Como a excitotoxicidade está principalmente relacionada com as alterações desencadeadas pelos níveis de Ca^{2+} intracelulares, os receptores NMDA executam um papel chave e alterações nesses receptores podem ser responsáveis pelos danos neuronais, devido às suas propriedades de permeabilidade e alta condutância ao Ca^{2+} (Ambrosi *et al.* 2010; Dong *et al.*, 2009). Entretanto, os receptores AMPA e KA também são ativados, causando o influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e água através do gradiente osmótico. O influxo de Na^+ , juntamente com a entrada de Cl^- resulta no acúmulo de água dentro da célula, levando ao edema celular. Isso pode causar a lise do neurônio, e conseqüentemente, a liberação de seus constituintes, entre eles o glutamato. A liberação exacerbada do glutamato decorrente da lise celular e da exocitose das vesículas sinápticas dependente de Ca^{2+} difunde o processo de excitotoxicidade aos outros neurônios, dando início a um ciclo degenerativo no tecido (Dong *et al.*, 2009).

1.3.1. Os Receptores do tipo Kainato (KA)

Os receptores KA atuam principalmente como moduladores da transmissão sináptica e da excitabilidade neuronal (Contractor *et al.*, 2011). Estão distribuídos de forma ubíqua no SNC, onde são encontrados, principalmente, no hipocampo, amígdala lateral, córtex cerebral, globo pálido e cerebelo (Huettner, 2003).

A formação tetramérica dos receptores KA é realizada a partir de combinações homoméricas ou heteroméricas das cinco subunidades (GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 e GluK5), respectivamente codificadas pelos seguintes genes: *GRIK1*, *GRIK2*, *GRIK3*, *GRIK4* e *GRIK5* (Gereau & Swanson, 2008).

Os receptores KA possuem permeabilidade principalmente ao sódio (Na^+) e ao potássio (K^+), sendo pouco permeáveis ao Ca^{2+} (Olive, 2009). No entanto, esta característica de permeabilidade pode ser alterada por conta da diversidade de isoformas das subunidades dos receptores KA, geradas por *splicing* alternativo e edição de RNA (Gereau & Swanson, 2008). As diversas combinações possíveis provocam diferenças na atuação dos canais, podendo variar a condutância iônica e o tempo de abertura dos canais (Hassel & Dingledine, 2006).

As subunidades GluK1, GluK2 e GluK3 estão sujeitas ao *splicing* alternativo, que altera a sequência primária do domínio carboxiterminal intracelular (Figura 3). As variantes de *splicing* alternativo podem controlar o nível de expressão dos receptores KA na membrana plasmática (Jaskolski *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2004).

As subunidades GluK1 e GluK2 podem sofrer edição de RNA no sítio Q/R (glutamina/arginina). A subunidade GluK2 tem dois sítios adicionais de edição, o I/V (isoleucina/valina) e o Y/C (tirosina/cisteína), que resultam na alteração de resíduos de aminoácidos no domínio M1 (Figura 3) (Gereau & Swanson, 2008).

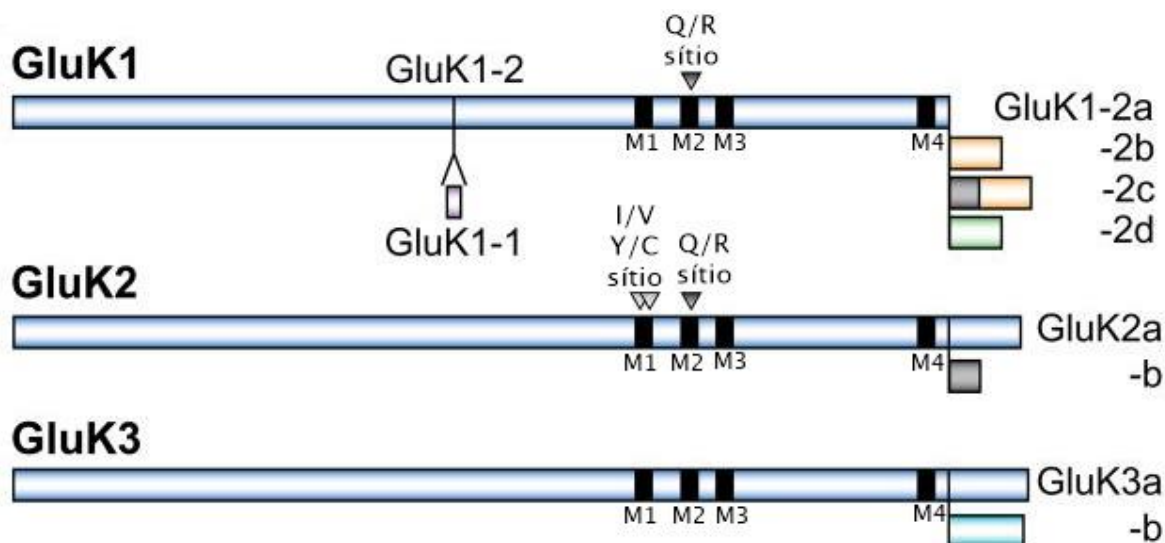


Figura 3. Ilustração das variantes de *splicing* alternativo nas subunidades GluK1, GluK2 e GluK3, e dos sítios de edição de RNA (triângulos) nas subunidades GluK1 e GluK2 (modificado de Contractor *et al.*, 2011).

O resíduo de aminoácido no sítio Q/R (glutamina/arginina) no domínio M2 (Figura 3) é um determinante crítico das propriedades de canal. Desse modo, a edição de RNA nesse sítio influencia vários aspectos importantes da função do canal. Receptores que incorporam as subunidades GluK1 ou GluK2 editadas possuem baixa permeabilidade ao Na^+ , K^+ , e são praticamente impermeáveis ao Ca^{2+} , além de apresentarem uma condutância unitária de canal reduzida. Em contraste, as subunidades GluK1 e GluK2 editadas são permeáveis ao cloro (Cl^-) (Figura 4) (Chittajallu *et al.*, 1999; Gereau & Sawanson, 2008).

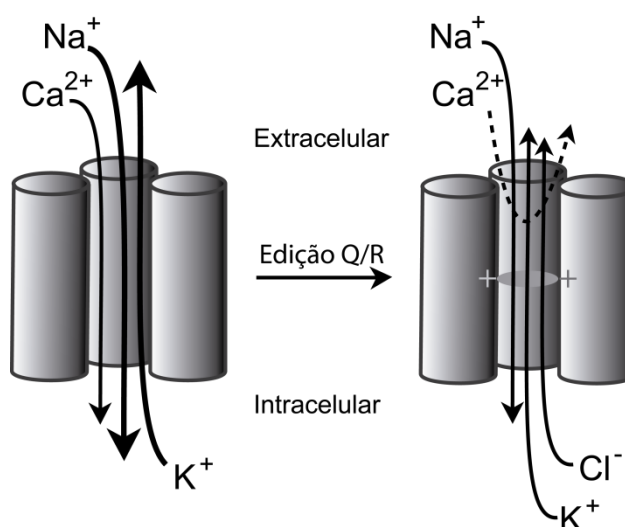


Figura 4. Efeito da edição Q/R sobre as propriedades do canal (receptor KA) nas subunidades GluK1 e GluK2 (modificado de Chittajallu *et al.*, 1999).

Como a sinalização do cálcio é importante em doenças neurológicas, uma série de estudos tem examinado e considerado as alterações no sítio de edição Q/R das subunidades de receptores KA em estados patológicos (Gereau & Swanson, 2008; Kawahara *et al.*, 2004).

Os receptores KA representam uma classe de receptores de glutamato com um padrão intrigante de distribuição anatômica (Ambrosi *et al.*, 2003). Segundo Contractor e colaboradores (2011), os receptores do tipo KA são alvos para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos que poderiam ter aplicação em uma variedade de neuropatologias. Estes poderiam ser os que incluem antagonistas que selectivamente alteram a função do GluK1, GluK2 ou GluK3. Estratégias alternativas para atuar especificamente nestes receptores incluem o desenvolvimento de moduladores alostéricos que alteram as associações com proteínas funcionais auxiliares importantes (Jane *et al.*, 2009; Perrais *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Influência dos receptores tipo KA na DP

Pesquisas mostraram que os receptores KA contribuem para a neurodegeneração, estimulando não apenas a excitotoxicidade, mas também a neuroinflamação e a intensa ativação microglial (Zhang & Zhu, 2011).

O aumento da ativação da microglia em estados patológicos, bem como a neuroinflamação, contribuem para a neurodegeneração da SNpc, para a liberação de glutamato e para a potenciação das respostas mediadas pelos receptores de glutamato, conduzindo ao fortalecimento do fenômeno excitotóxico (Noda & Beppu, 2013). Por outro lado, níveis elevados de glutamato podem intensificar a ativação da microglia e sustentar processos inflamatórios. De fato, tem sido mostrado em cérebros de camundongos que os receptores KA participam na modulação da liberação de citocinas inflamatórias (Lee, 2013).

Os neurônios da SNpc expressam abundantemente subunidades dos receptores tipo KA (Bischoff *et al.*, 1997). Embora a função dos receptores KA na SNpc permaneça não completamente definida, a perda de função da proteína parkina aumenta a atividade dos receptores do tipo KA, apoiando a hipótese da excitotoxicidade relacionada com a DP autossômica recessiva (Maraschi *et al.*, 2014). A DP autossômica recessiva é caracterizada

por mutações no gene que codifica a proteína parkina, denominado *PARK2*, sendo considerada a forma mais frequente de início precoce da doença. A parkina desempenha um papel importante na manutenção da integridade e morfologia mitocondrial, além de exercer regulação da função e estabilidade das sinapses glutamatérgicas excitatórias. Na presença da parkina alterada, sinapses glutamatérgicas tendem a proliferar, aumentando assim a eficácia sináptica do glutamato. Isto inevitavelmente aumenta a vulnerabilidade neuronal para a excitotoxicidade mediada por glutamato (Blandini *et al.*, 2010; Caudle & Zhang, 2009; Finlay & Duty, 2014).

1.4. A SUBUNIDADE GLUK2 DO RECEPTOR TIPO KA NA DP

Evidências sugerem que retores pré-sinápticos que regulam a plasticidade sináptica contém a subunidade GluK2 (Breusted & Schimitz *et al.*, 2004; Schimitz *et al.*, 2003). Esta subunidade também regula a excitação do glutamato nos neurônios cerebelares (Bureau *et al.*, 2000).

Um estudo recente, conduzido por Maraschi e colaboradores (2014), demonstrou que a subunidade GluK2 do receptor KA interage com a parkina, sofrendo ubiquitinação por essa proteína que regula os níveis de GluK2 e a via dos receptores KA. A perda da função da parkina aumenta os níveis totais de GluK2 e aumenta consistentemente as vias dos receptores KA, acentuando a excitotoxicidade *in vitro*. Esses autores sugerem que a subunidade GluK2 pode funcionar como um substrato para a parkina, portanto pacientes com a parkina alterada poderiam se beneficiar com alguma terapia que tivesse como alvo os receptores KA (Maraschi *et al.*, 2014).

1.5. O GENE *GRIK2*

O gene *GRIK2* inclui 17 éxons e apresenta aproximadamente 670 kb. Está localizado na posição 6q16.3-q21 do genoma humano e codifica a subunidade GluK2 do receptor KA (Figura 5) (Barbon *et al.*, 2001).

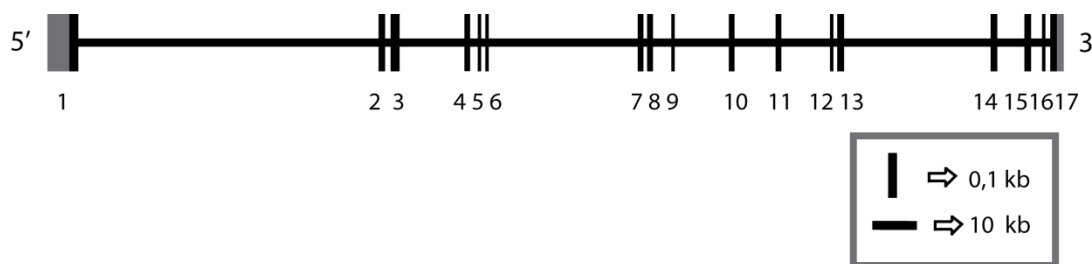


Figura 5: Representação da estrutura éxon-íntron do gene humano *GRIK2* (modificado de Barbon *et al.*, 2001).

O gene *GRIK2* é expresso acentuadamente em regiões do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória (como o hipocampo), assim como na atividade motora e aspectos motivacionais do comportamento (como o cerebelo e os gânglios basais). Em função da expressão do *GRIK2* nessas regiões, este gene tem sido considerado um principal contribuinte para as funções cognitivas mais elevadas, podendo desempenhar um papel na patogênese de vários distúrbios neuropsiquiátricos e doenças neurológicas (Dutta *et al.*, 2007).

Estudos de ligação do gene *GRIK2* identificaram potenciais alterações que podem contribuir para doenças neurológicas. Determinados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram descobertos nesse gene e estão associados com a esquizofrenia, autismo, transtorno obsessivo-compulsivo, síndrome da fadiga crônica, retardo mental autossômico recessivo, ataxia espinocerebelar tipo 3 e doença de Huntington (Emmel *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007; Motazacker *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2006).

Motazacker e colaboradores (2007) relataram a presença de mutações no gene *GRIK2*, resultando na perda de função da subunidade GluK2 do receptor de KA. Essas mutações foram associadas ao retardo mental autossômico recessivo não-sindrômico em uma grande família consaguínea Iraniana.

Estudos independentes demonstraram que o polimorfismo de repetição TAA na região 3' não traduzida do gene *GRIK2* apresenta um efeito modificador da idade de início da doença de Huntington (Cannella *et al.*, 2004; Chattopadhyay *et al.*, 2003).

Wu e colaboradores (2013) publicaram um estudo preliminar que tinha como objetivo examinar a associação de genes glutamatérgicos candidatos e volumes encefálicos de crianças com transtorno obsessivo-compulsivo. Nenhum SNP foi significativamente associado às mudanças volumétricas após a correção de múltiplas associações pelo teste de permutação. Entretanto, foi verificado que o SNP rs4839797 apresentou uma associação qualitativa com o putâmen (o qual também constitui os gânglios da base).

Um estudo realizado no Brasil, envolvendo pacientes com ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3) verificou que o SNP rs2227281 estava associado com volumes de cerebelo maiores, sugerindo um papel protetor para o genótipo CC no fenótipo de pacientes com SCA3. Além disso, através de uma análise dos genótipos neuroprotetores combinados, foi verificado que os indivíduos com os genótipos CC (*GRIK2*) juntamente com os genótipos GG do gene *NEDD8* (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) apresentaram uma maior idade de início da doença quando comparados às outras combinações genotípicas, sugerindo uma sinergia entre esses polimorfismos (Emmel, 2010).

É postulado que o autismo seja um transtorno hipoglutamatérgico e existem estudos que associam vários polimorfismos do gene *GRIK2* com esta desordem do desenvolvimento neuropsiquiátrico grave. O SNP rs2235076 resulta em uma alteração de aminoácidos (M867I) em um domínio altamente conservado e pareceu ser mais matematicamente transmitido do que o esperado para autistas do sexo masculino (Jamain *et al.* 2002). Os SNPs rs2227281 e rs2227283 desmonstraram apresentar transmissão preferencial em uma análise de 174 trios de famílias chinesas (Shuang *et al.*, 2004). Kim e colaboradores (2007), realizaram um estudo com 126 trios de familiares coreanos, onde demonstraram que o SNP rs3213607 apresentou transmissão preferencial do alelo C em comparação ao alelo A em pacientes com autismo.

Até o momento o único estudo que relaciona a DP com a subunidade Gluk2 é o estudo conduzido por Maraschi e colaboradores (2014), o qual demonstrou que a subunidade GluK2 do receptor KA interage com a parkina acentuando *in vitro* a excitotoxicidade, que é um processo de dano neuronal associado a várias doenças neurodegenerativas. Embora muitos estudos associem o gene *GRIK2* com diversas doenças neurológicas e neurodegenerativas, não há na literatura científica estudos genéticos que associem o gene

GRIK2 com a DP, apesar do conhecimento de que a função do GluK2 e suas propriedades de permeabilidade aos íons (que participam do processo de excitotoxicidade) são reguladas por edição de RNA, e que certos SNPs poderiam influenciar nesta edição (Dutta *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar as frequências dos SNPs: rs3213607, rs2227281, rs2227283, rs2235076, rs4839797, rs2518261 no gene *GRIK2*, assim como, avaliar uma possível influência desses SNPs sobre as características clínicas e epidemiológicas de uma amostra de pacientes com DP.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência genotípica e alélica dos SNPs rs3213607, rs2227281, rs2227283, rs2235076, rs4839797, rs2518261 no gene *GRIK2* em uma amostra de pacientes com DP e em indivíduos de um grupo controle;
- Identificar a associação entre os SNPs rs3213607, rs2227281, rs2227283, rs2235076, rs4839797, rs2518261 do gene *GRIK2* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com DP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo caso-controle composto por amostra de conveniência que constou de 190 indivíduos, sendo 61 pacientes com DP e um grupo controle com 129 indivíduos.

3.2. SELEÇÃO DA AMOSTRA

3.2.1. Grupo DP: critérios de inclusão e caracterização amostral

Este grupo foi composto pelos pacientes diagnosticados com DP. Somente foram incluídos aqueles cujas informações dos principais dados clínicos e epidemiológicos estavam disponíveis, como idade, gênero, histórico familiar, idade de início dos sintomas e sinais clínicos (tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural). Esses dados foram coletados por meio de entrevista, utilizando-se um formulário com dados epidemiológicos e dados clínicos obtidos por meio de informações contidas nos prontuários clínicos dos pacientes.

De acordo com esta conduta para a realização da pesquisa, foram selecionadas 61 amostras de DNA a partir de uma amostra inicial de 81 pacientes diagnosticados com DP conforme os critérios clínicos do *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* (Hughes *et al.*, 2001) (Anexo I), atendidos e tratados no ambulatório de Geriatria e Neurologia do HUIBB-UFPA.

Dos 61 pacientes selecionados, 39 pertencem ao gênero masculino e 22 ao gênero feminino. A média de idade no momento da coleta de sangue foi de $64,8 \pm 12,3$ anos (variando de 44 a 95 anos), enquanto que a média de idade de início da doença foi de $54 \pm 12,5$ (variando de 28 a 82). Essa amostra foi composta por um grupo heterogêneo de pacientes (DP com início precoce e/ou história familiar e DP esporádica e/ou história familiar) não correlacionados que fizeram parte de um projeto de investigação molecular em pacientes com DP (aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do HUIBB da UFPA com protocolo nº 2547/06 – Anexo – II), portanto, essas amostras utilizadas no presente estudo já haviam sido coletadas previamente e fazem parte do banco de DNA do Laboratório de Erros Inatos

do Metabolismo (LEIM) da UFPA, inclusive já foram caracterizadas quanto à presença de mutações e polimorfismos no gene *GBA* e *LRRK2*.

3.2.2. Grupo controle

O grupo controle foi composto por 129 indivíduos, sendo 85 do gênero masculino e 44 do gênero feminino; a média de idade, no momento da coleta, foi de $52 \pm 18,9$ anos – variando de 18 a 91 anos. A seleção desse grupo foi realizada de modo a parear a faixa etária e o gênero ao grupo dos pacientes. Para a formação desse grupo controle, foram selecionados indivíduos sem sinais de DP ou qualquer outro distúrbio neurodegenerativo, e ausência de histórico familiar de DP em parentes de primeiro e segundo grau.

3.3. ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Os dados epidemiológicos e clínicos foram digitalizados para a formação de um banco de dados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 20. Utilizou-se a estatística descritiva, determinando-se as frequências absolutas e percentuais das variáveis qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foram calculados valores de média (medida de tendência central), desvio padrão e valores mínimo e máximo (medida de variação), de acordo com as características das variáveis em estudo. Foi realizada a comparação de médias entre grupos aplicando o Teste t-Student e adotando-se o *p*-valor com nível de significância (*p*-valor menor ou igual a 0,05).

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

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

3.5. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

3.5.1. Seleção dos SNPs

Na tentativa de investigar o efeito da susceptibilidade do gene *GRIK2* em pacientes com DP, foi realizada uma revisão de literatura para discernir quais SNPs deste gene foram estudados anteriormente em outras doenças neurológicas. A partir desta etapa foram selecionados os SNPs rs4839797, rs2518261, rs2227281, rs2227283, rs3213607 e rs2235076.

3.5.2. Detecção do SNPs

A pesquisa dos SNPs rs4839797, rs2518261, rs2227281, rs2227283, rs3213607 e rs2235076 no gene *GRIK2* foi realizada por meio de PCR em tempo real, no ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), através da técnica de discriminação alélica (sistema *TaqMan*®). Foram realizados ensaios pré-determinados específicos para cada SNP fornecidos pela *Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA)*, conforme descrito na tabela 1.

O protocolo que foi utilizado para as reações consistiu na preparação do mix, contendo 0,625 µL de ensaio pré determinado (20x; *Applied Biosystems*) específico para cada SNP, 6,25 µL de *Taqman Universal Master Mix*® (1x; *Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e 3,62 µL de água ultra-pura, totalizando 10,5 µL do mix por amostra. Neste mix, foram adicionados 2 µL de DNA genômico (10-20ng), perfazendo 12,5 µL como volume final de reação. Foram incluídos em cada ensaio controles negativos, substituindo o volume de amostra de DNA por água Milli-Q livre de DNase/RNase. As condições de PCR foram pré-padronizadas pelo fabricante, segundo protocolo próprio (ensaio *TaqMan*® – *Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e consistiram de 95°C desnaturação inicial (10 min), seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 92°C (15 seg) e 60°C de anelamento e extensão (por um minuto). As amostras submetidas a PCR foram posteriormente analisadas no programa SDS v. 1.2.3 ABI 7000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), onde foram agrupadas de acordo com os genótipos.

Tabela 1: Informações sobre os SNPs testados do gene *GRIK2*, tais como: identificação (rs), posição no cromossomo, código TaqMan, região no gene, mudança de aminoácido (AA), sequências alvos e alelos detectados com VIC e FAM dyes.

Código SNP	Localização SNP	Código TaqMan	Posição no Gene	Mudança de AA	Sequências Alvos	Alelo Detectado com VIC dye	Alelo Detectado com FAM dye
rs4839797	chr6:101922699	C__32404988_10	Íntron1	-	AAAAGTAATGTAATTAATTTGATTA[C/T] ATACCATAGTTCCTTTTTAAAAGAA	C	T
rs2518261	chr6:101981778	C__16242916_10	Íntron1	-	TTGAATATAGCTTTATAACATTTCA[C/T] ATTTATTTTGCATTTGTCTTTTTCT	C	T
rs3213607	chr6:102483356	C__25647223_10	Éxon 14	Ile-742-Ile	CTTTCCTAATGGAGTCAACAACCAT[A/C] GAGTTTGTACCCAGCGGAAGTGA	A	C
rs2227281	chr6:102503196	C__1801488_1	Íntron 14	-	CTTGAAATACTTAACATAACCTCTC[C/T] TTTCTTAGGTTCTCCATATCGAGAC	C	T
rs2227283	chr6:102503317	C__25473810_10	Éxon 15	Glu-808-Glu	GGGGCAATGGTTGCCAGAGAGGA[A/G] AGCAAAGAGGCCAGTGCCCTGGGGG	A	G
rs2235076	chr6:102516260	C__1801506_20	Éxon 16	Met-867-Ile	GTGCCATGGTAGAAGAATTGAGGAT[A/G] TCCCTGAAGTGCCAGCGTCGGTTAA	A	G

Em algumas amostras, tanto dos casos de DP quanto do grupo controle, não foi possível realizar a detecção dos SNPs. Para cada SNP os números de amostras genotipadas foram: rs4849797 (casos: 60 amostras; controles: 129 amostras); rs2518261 (casos: 60 amostras; controles: 127 amostras); rs2227181 (casos: 59 amostras; controles: 127 amostras), rs2227283 (casos: 60 amostras; controles: 129 amostras) e rs3213607 (casos: 60 amostras; controles: 95 amostras). Foram genotipadas todas as amostras dos casos e controles para o SNP rs2235076.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS DE GENOTIPAGEM

3.6.1. Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta dos genótipos e alelos e posteriormente confirmadas após análise no software PLINK (Purcell *et al.*, 2007).

3.6.2. Análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os polimorfismos estudados foram submetidos à análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para verificar se uma distribuição observada de dados se ajusta a uma distribuição esperada (teórica) (Callegari-Jacques, 2003). Os *p*-valores foram estimados pelo software PLINK (Purcell *et al.*, 2007), sendo *p*-valor maior ou igual a 0,05 considerado em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.6.3. Análise de associação caso-controle

Para o estudo caso-controle, a análise de associação entre os SNPs do gene *GRIK2* e à ocorrência da DP, foi feita utilizando o programa SPSS, versão 20. Foi estimado o valor de *Odd ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (CI^{95%}) e o *p*-valor do teste de Qui-quadrado (χ^2) a um nível de significância de 5%. Somente os SNPs em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e com a frequência do menor alelo - MAF (do inglês, *minor allele frequency*) maior que 5% foram incluídos nesta análise de associação caso-controle.

3.6.4. Análise de associação entre SNPs e dados epidemiológicos e clínicos

Para a análise de associação entre os polimorfismos e dados epidemiológicos e dados clínicos foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher, conforme apropriado. Considerando-se como estatisticamente significativo o p -valor menor ou igual a 0,05. Para tanto foi utilizado o programa SPSS, versão 20. Somente os SNPs em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e com MAF maior que 5% foram incluídos nesta análise de associação com os dados clínicos e os dados epidemiológicos.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DO GRUPO DP

A Tabela 2 apresenta características específicas do grupo DP. A maioria dos casos de DP foi do gênero masculino (63,9%). A idade média de início dos sintomas foi de $54 \pm 12,5$ (28 - 82) anos. Verificou-se que em 26,6% dos casos houve o relato de histórico familiar de DP.

Em relação aos sinais e sintomas clínicos foi observado o tremor como predominante (82%), seguido da rigidez (39,3%), bradicinesia (19,7%) e instabilidade postural (13,1%).

Tabela 2: Dados epidemiológicos e clínicos dos indivíduos do grupo DP.

Número total de indivíduos, <i>n</i> (%)	61 (100,0)
Masculino	39 (63,9)
Feminino	22 (36,1)
Idade de Início (Anos) *	
Todos	$54 \pm 12,5$ (28 - 82)
Masculino	$52,1 \pm 13$ (28 - 82)
Feminino	$57,3 \pm 11,1$ (35 - 78)
Histórico Familiar, <i>n</i> (%)	
Sim	16 (26,2)
Não	45 (73,8)
Sinais e sintomas clínicos, <i>n</i> (%)	
Tremor	50 (82,0)
Rigidez	24 (39,3)
Bradicinesia	12 (19,7)
Instabilidade Postural	08 (13,1)

* Dados exibidos como média \pm desvio padrão (amplitude).

4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs NO GENE *GRIK2*

Após a amplificação de DNA (grupo DP e grupo controle) para os 6 SNPs selecionados, foi efetuada a discriminação alélica, com base na fluorescência emitida por cada uma das amostras. Dessa forma, foi obtido para cada SNP um perfil de amplificação para cada grupo. A tabela 3 demonstra as frequências genotípicas e alélicas dos 6 SNPs nas amostras do grupo controle e do grupo DP.

Tabela 3: Frequências genotípicas e alélicas de seis polimorfismos do gene *GRIK2* nos indivíduos do grupo controle e do grupo DP.

Polimorfismos	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
rs4839797	CC	CT	TT	C	T
Controle (n=129)	94 (72,87%)	30 (23,26%)	5 (3,88%)	218 (84,50%)	40 (15,50%)
DP (n=60)	49 (81,67%)	11 (18,33%)	0 (0,0%)	109 (90,83%)	11 (9,17%)
rs2518261	CC	CT	TT	C	T
Controle (n=127)	52 (40,94%)	64 (50,39%)	11 (8,66%)	168 (66,14%)	86 (33,86%)
DP (n=60)	6 (10,0%)	38 (63,33%)	16 (26,67%)	50 (41,67%)	70 (58,33%)
rs2227281	CC	CT	TT	C	T
Controle (n=127)	56 (44,09%)	47 (37,01%)	24 (18,90%)	159 (62,60%)	95 (37,40%)
DP (n=59)	24 (40,68%)	23 (38,98%)	12 (20,34%)	71 (60,17%)	47 (39,83%)
rs2227283	GG	GA	AA	G	A
Controle (n=129)	67 (51,94%)	45 (34,88%)	17 (13,18%)	179 (69,38%)	79 (30,62%)
DP (n=60)	32 (53,33%)	14 (23,33%)	14 (23,33%)	78 (65,0%)	42 (35,0%)
rs3213607	CC	CA	AA	C	A
Controle (n=95)	74 (77,89%)	21 (22,11%)	0 (0,0%)	169 (88,95%)	21 (11,05%)
DP (n=60)	50 (83,33%)	10 (16,67%)	0 (0,0%)	110 (91,67%)	10 (8,33%)
rs2235076	GG	GA	AA	G	A
Controle (n=129)	127 (98,45%)	2 (1,55%)	0 (0,0%)	256 (99,22%)	2 (0,78%)
DP (n=61)	60 (98,36%)	1 (1,64%)	0 (0,0%)	121 (99,18%)	1 (0,82%)

O polimorfismo rs4839797 (C/T) representa uma troca de citosina por timina no íntron 1 do gene *GRIK2*. Na amostra analisada, foram genotipados 60 casos e 129 controles. A frequência do alelo C foi de 90,83% no grupo DP e 84,50% no grupo controle. A frequência do alelo T foi de 9,17% no grupo DP e 15,50% no grupo controle. O genótipo homozigoto CC foi encontrado em 81,67% no grupo DP e em 72,87% do grupo controle. O genótipo heterozigoto CT foi encontrado em 18,33% no grupo DP e 23,26% no grupo controle. Não foi observado o genótipo homozigoto TT no grupo DP, entretanto, foi observado em 3,88% no grupo controle.

O polimorfismo rs2518261 (C/T) consiste na troca de citosina por timina no íntron 1 do gene *GRIK2*. Na amostra estudada, foram genotipados 60 casos e 127 controles. A frequência do alelo C foi de 41,67% no grupo DP e 66,14% no grupo controle. A frequência do alelo T foi 58,33% no grupo DP e 33,86% no grupo controle. O genótipo homozigoto CC foi identificado em 10% no grupo DP e em 40,94% no grupo controle. O genótipo heterozigoto CT foi observado em 63,33% no grupo DP e 50,39% no grupo controle. O genótipo homozigoto TT foi identificado em 26,67% no grupo DP e 8,66% no grupo controle.

O polimorfismo rs2227281 (C/T) consiste na troca de citosina por timina no íntron 14 do gene *GRIK2*. Na amostra analisada, foram genotipados 59 casos e 127 controles. Entre os casos, a frequência do alelo C foi de 60,17% e de 62,60% entre o grupo controle. A frequência do alelo T foi de 39,83% no grupo DP, enquanto que, no grupo controle, foi de 37,40%. O genótipo homozigoto CC foi encontrado em 40,68% no grupo DP e em 44,09% no grupo controle. O genótipo heterozigoto CT foi observado em 38,98% no grupo DP e 37,01% no grupo controle. O genótipo homozigoto TT foi identificado em 20,34% no grupo DP e 18,90% no grupo controle.

O polimorfismo rs2227283 (G/A) consiste na troca de guanina por adenina no éxon 15 do gene *GRIK2*. Essa troca gerada pelo polimorfismo rs2227283 (Glu808Glu) não altera o resíduo de aminoácido gerado pelo novo códon (SNP sinônimo). Na amostra estudada, foram genotipados 60 casos e 129 controles. A frequência do alelo G foi de 65% no grupo DP e 69,38% no grupo controle. A frequência do alelo A foi de 35% no grupo DP e de 30,62% no grupo controle. O genótipo homozigoto CC foi observado em 53,33% no grupo DP e em 51,94% no grupo controle. O genótipo heterozigoto GA foi identificado em

23,33% no grupo DP e 34,88% no grupo controle. O genótipo homozigoto AA foi identificado em 23,33% no grupo DP e 13,18% no grupo controle.

O polimorfismo rs3213607 (C/A) consiste na troca de citosina por adenina no éxon 14 do gene *GRIK2*. O polimorfismo rs3213607 (Ile742Ile) não altera o resíduo de aminoácido gerado pelo novo códon (SNP sinônimo). Na amostra analisada, foram genotipados 60 casos e 95 controles. A frequência do alelo C foi de 91,67% no grupo DP e 88,95% no grupo controle. A frequência do alelo A foi de 8,33% no grupo DP e 11,05% no grupo controle. O genótipo homozigoto CC foi encontrado em 83,33% no grupo DP e em 77,89% no grupo controle. O genótipo heterozigoto CA foi encontrado em 16,67% no grupo DP e 22,11% no grupo controle. Não foi observado o genótipo homozigoto AA no grupo DP e no grupo controle.

O polimorfismo rs2235076 (G/A) consiste na troca de guanina por adenina no éxon 16 do gene *GRIK2*, promovendo a substituição do resíduo de aminoácido 867 de metionina por isoleucina. Na amostra estudada, foram genotipados 61 casos e 129 controles. A frequência do alelo G foi de 99,18% no grupo DP e 99,22% no grupo controle. A frequência do alelo A foi de 0,82% no grupo DP e 0,78% no grupo controle. O genótipo homozigoto GG foi encontrado em 98,36% no grupo DP e em 98,45% no grupo controle. O genótipo heterozigoto GA foi encontrado em 1,64% no grupo DP e em 1,55% no grupo controle. Não foi observado o genótipo homozigoto AA no grupo DP e no grupo controle.

4.3. EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

O teste de qui-quadrado para analisar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, feito a partir dos genótipos da amostra em estudo para cada SNP e demonstrou que os polimorfismos rs4839797 (p-valor = 0,34), rs2518261 (p-valor = 0,13), rs3213607 (p-valor = 0,36) e rs2235076 (p-valor = 1) estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os SNPs rs2227281 e rs2227283 não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-valor < 0,05), conforme demonstrado na tabela 4. Desta forma, os SNPs rs2227281 e rs2227283 foram excluídos das análises subsequentes. O SNP rs2235076 apresentou frequência do menor alelo – MAF (do inglês, *minor allele frequency*) menor que 5% e, portanto, também foi excluído da análise.

Tabela 4: Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis polimorfismos.

Polimorfismo	Alelo menos frequente	Alelo mais frequente	Grupo	Genótipo	Heterozigosidade observada	Heterozigosidade esperada	<i>p</i> -valor ^a
rs4839797	T	C	DP Controle	(TT/CT/CC) 0/11/49 5/30/94	0,2169	0,2334	0,3446
rs2518261	T	C	DP Controle	(TT/CT/CC) 16/38/6 11/64/52	0,5455	0,4863	0,1319
rs2227281	T	C	DP Controle	(TT/CT/CC) 12/23/24 24/47/56	0,3763	0,472	0,007907
rs2227283	A	G	DP Controle	(AA/GA/GG) 14/14/32 17/45/67	0,3122	0,4353	0,0001875
rs3213607	A	C	DP Controle	(AA/CA/CC) 0/10/50 0/21/74	0,2	0,18	0,3659
rs2235076	A	G	DP Controle	(AA/GA/GG) 0/1/60 0/2/127	0,01579	0,01566	1

^a Considera-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg se *p*-valor for igual ou maior que 0,05. Dados gerados pelo programa PLINK

4.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs ENTRE OS GRUPOS DP E CONTROLE

Para a análise do polimorfismo rs4839797 (C/T), o genótipo homocigoto CC é o mais prevalente, tanto no grupo DP (81,67%) quanto no grupo controle (72,87%), como constata-se na tabela 5. O alelo C é o mais frequente tanto na amostra do grupo DP (90,83%) como no grupo controle (84,50%). Para testar possíveis diferenças entre os grupos DP e controle no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado. O valor de χ^2 encontrado foi de 3,202, $df=2$ e $p\text{-valor}=0,201$ para os genótipos. Para os alelos, obteve-se um χ^2 de 8,812 e $p\text{-valor}=0,129$. Assim, o teste de χ^2 demonstrou que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas ou alélicas dos dois grupos analisados para este polimorfismo.

Quanto ao polimorfismo rs2518261 (C/T), nota-se frequência reduzida do genótipo CC nos grupo DP (10,0%) em relação ao grupo controle (40,94%). O genótipo heterocigoto CT mostrou-se mais frequente entre o grupo DP (63,33%) em relação ao grupo controle (50,39%), seguido do genótipo homocigoto TT com maior prevalência no grupo DP (26,67%) em relação ao grupo controle (8,66%). Para testar possíveis diferenças entre os grupos DP e controle no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado. O teste de χ^2 ($\chi^2=22,981$; $df=2$; $p\text{-valor} < 0,0001$) revelou existir uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas entre os dois grupos analisados para este polimorfismo.

Quanto a frequência alélica, o alelo C foi menos frequente no grupo DP (41,67%) em relação ao grupo controle (66,14%). Já o alelo T foi mais frequente no grupo DP (58,33%) em relação ao grupo controle (33,86%). Para testar possíveis diferenças entre os grupos DP e controle no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado. O valor de χ^2 encontrado para os alelos foi de 19,085, com $p\text{-valor} < 0,0001$, revelando a presença de uma diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas entre os grupos DP e controle.

Para a determinação dos Odds Ratio e respectivos intervalos com 95% de confiança, recorreu-se a regressões logísticas. Esta análise demonstrou que o genótipo CC apresenta menos chances em relação aos conjuntos de outros genótipos (CT e TT), de ser encontrado

em pacientes com DP do que no grupo controle (OR= 0,160, IC= 0,064 – 0,400); p-valor < 0,0001. Os resultados sugerem um efeito de risco para o alelo T (OR= 2,735, IC= 1,75 – 4,27); p-valor < 0,0001. Assim, conclui-se que existe uma associação entre o polimorfismo rs2518261 (C/T) do gene *GRIK2* e a ocorrência de DP na amostra analisada.

Para o polimorfismo rs3213607 (C/A), o genótipo homozigoto CC é o mais frequente, tanto no grupo DP (83,33%) como no grupo controle (77,89%). A frequência do alelo C no grupo DP foi de 91,67% e 88,95% no grupo controle. Já a frequência do alelo A no grupo DP foi de 8,33% e 11,05% no grupo controle. Para testar possíveis diferenças entre os grupos DP e controle no que se refere aos genótipos e alelos utilizou-se o teste do Qui-Quadrado. O valor de χ^2 encontrado foi de 0,00 df=2 e p-valor=1,00 para os genótipos. Para os alelos, obteve-se um χ^2 de 0,604 e p-valor=0,559. Assim, o teste de χ^2 demonstrou não existir uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências genótípicas ou alélicas nos dois grupos analisados (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de associação genotípica e alélica de três polimorfismos do gene *GRIK2* em Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos indivíduos do grupo DP e grupo controle.

Polimorfismo		DP n (%)	Controle n (%)	p-valor
rs4839797		60	129	
Genótipos	CC	49 (81,67%)	94 (72,87%)	0,20
	CT	11 (18,33%)	30 (23,26%)	
	TT	0 (0,0%)	5 (3,88%)	
Alelos	C	109 (90,83%)	218 (84,50%)	0,12
	T	11 (9,17%)	40 (15,50%)	
rs2518261		60	127	
Genótipos	CC	6 (10,0%)	52 (40,94%)	< 0,0001
	CT	38 (63,33%)	64 (50,39%)	
	TT	16 (26,67%)	11 (8,66%)	
Alelos	C	50 (41,67%)	168 (66,14%)	< 0,0001
	T	70 (58,33%)	86 (33,86%)	
rs3213607		60	95	
Genótipos	CC	50 (83,33%)	74 (77,89%)	1,00
	CA	10 (16,67%)	21 (22,11%)	
	AA	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Alelos	C	110 (91,67%)	169 (88,95%)	0,55
	A	10 (8,33%)	21 (11,05%)	

4.5. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs E A IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS E SINAIS CLÍNICOS DA DP

Considerando a relação de cada um dos SNPs (rs4839797, rs2518261 e rs3213607) e a idade de início dos sintomas e sinais clínicos da DP, verificou-se que não existem diferenças significativas entre as médias de idade dos genótipos dos SNPs: rs4839797 (p-valor= 0,56), rs2518261 (p-valor= 0,24) e rs3213607 (p-valor= 0,17), conforme demonstrado nas figuras 6, 7 e 8.

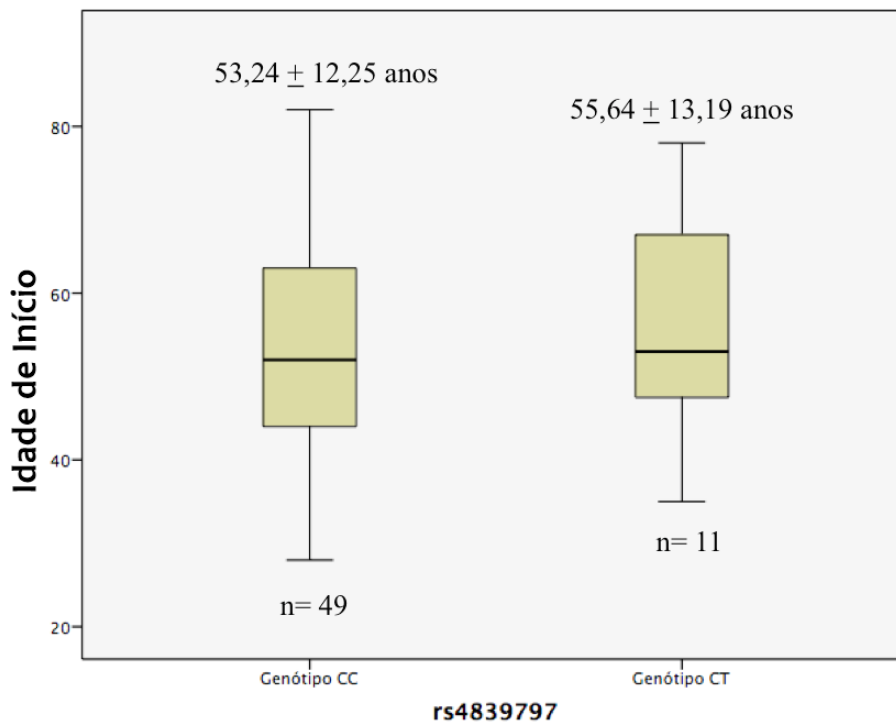


Figura 6: Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs4839797.

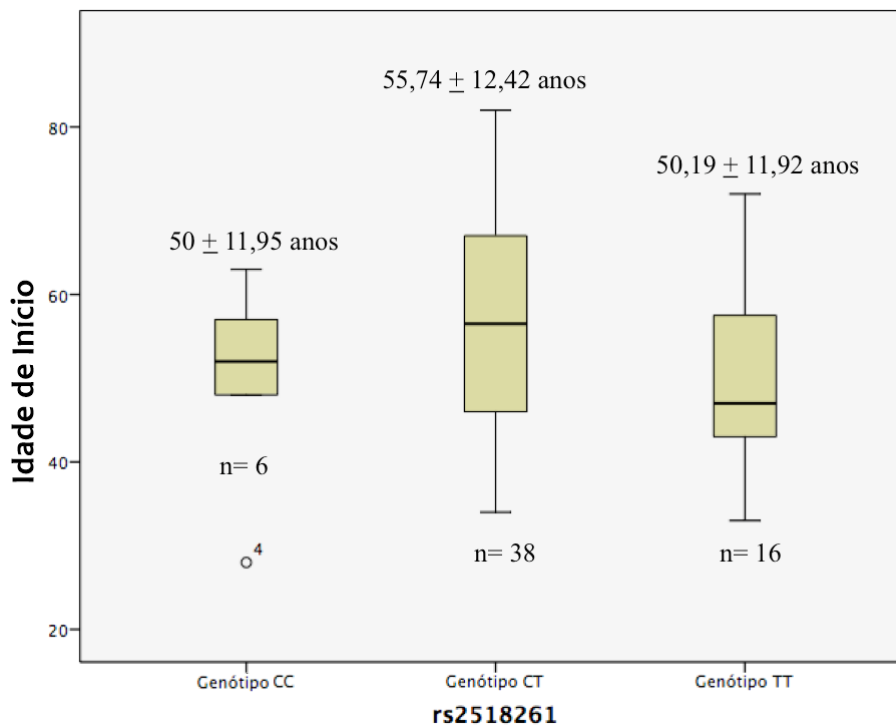


Figura 7: Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs2518261.

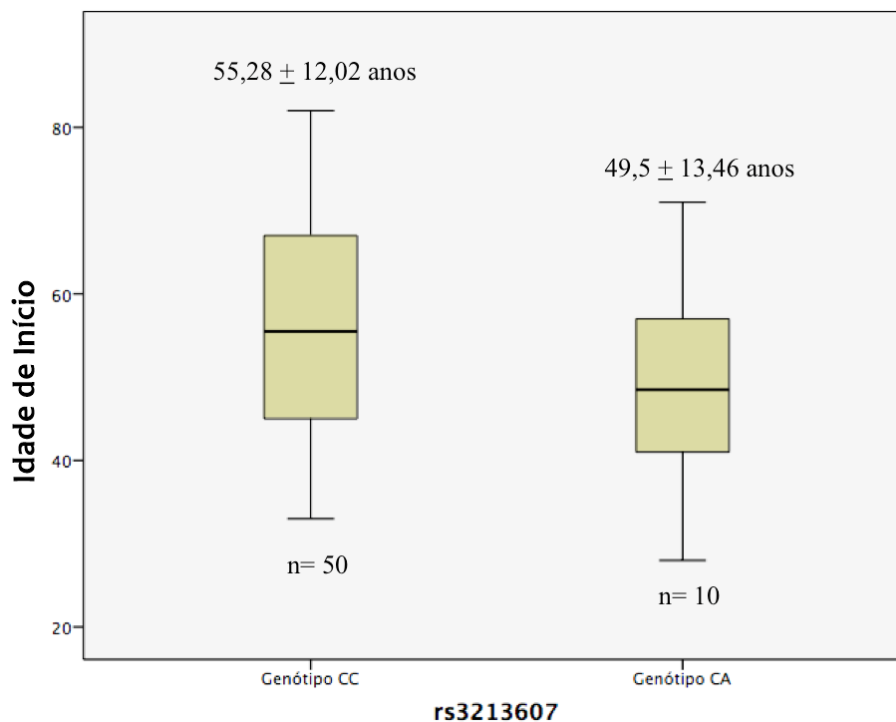


Figura 8: Diagrama de distribuição das idades de início dos sintomas e sinais clínicos para cada um dos genótipos do SNP rs3213607.

4.6. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs E O DESENVOLVIMENTO DE SINAIS CLÍNICOS.

Foram consideradas duas subpopulações de doentes a partir da população de doentes inicial (n=61): uma incluindo pacientes DP com algum tipo de sinais clínicos (tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural) e outra subpopulação de pacientes DP que não apresentavam o tipo de sinais e sintomas clínicos analisados. Os resultados obtidos referem-se à comparação entre estas duas subpopulações, conforme demonstrado nas tabelas 6, 7 e 8.

Em relação às frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo rs4839797, não houve diferença significativa entre as subpopulações de pacientes DP com presença e ausência de tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural na amostra do presente estudo (tabela 6).

Tabela 6: Investigação da frequência de associação do SNP rs4839797 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.

Sinais Clínicos	Genótipos (rs4839797)		<i>p</i> -valor*	Alelos (rs4839797)		<i>p</i> -valor*
	CC	CT		C	T	
Tremor						
Sim	41 (83,67%)	8 (72,73%)	0,40	90 (82,57%)	8 (72,73%)	0,42
Não	8 (16,33%)	3 (27,27%)		19 (17,43%)	3 (27,27%)	
Rigidez						
Sim	21 (42,86%)	3 (27,27%)	0,49	45 (41,28%)	3 (27,27%)	0,52
Não	28 (57,14%)	8 (72,73%)		64 (58,72%)	8 (72,73%)	
Bradicinesia						
Sim	10 (20,41%)	2 (18,18%)	1,00	22 (20,18%)	2 (18,18%)	1,00
Não	39 (79,59%)	9 (81,82%)		87 (79,82%)	9 (81,82%)	
Instabilidade Postural						
Sim	6 (12,24%)	2 (18,18%)	0,62	14 (12,84%)	2 (18,18%)	0,63
Não	43 (87,76%)	9 (81,82%)		95 (87,16%)	9 (81,82%)	

* Teste Exato de Fisher

Em relação às frequências dos genótipos do polimorfismo rs2518261 considerando a presença do tremor, observou-se que os genótipos foram menos frequentes na subpopulação de pacientes DP sem tremor (pacientes DP com tremor – CC: 83,33%; CT: 73,68%; TT: 100%; pacientes DP sem tremor – CC: 16,67%; CT: 26,32%; TT: 0,00%), sendo que nenhum homocigoto TT foi encontrado na subpopulação de pacientes DP com ausência de tremor. Esta análise revelou existir uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas dos dois subgrupos estudados (p -valor = 0,02), sugerindo-se que o genótipo TT pode representar um fator associado à presença de tremor na amostra do presente estudo. Analisando a frequência alélica do rs2518261 quanto à presença de tremor, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos (p -valor = 0,26). Igualmente, não houve diferenças estatisticamente significativas em relação às frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs2518261 quando se comparou o subgrupo de pacientes DP com presença e ausência de rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (tabela 7).

Tabela 7: Investigação da frequência de associação do SNP rs2518261 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.

Sinais Clínicos	Genótipos (rs2518261)			<i>p-Valor</i>	Alelos (2518261)		<i>p-Valor</i>
	CC	CT	TT		C	T	
Tremor							
Sim	5 (83,33%)	28 (73,68%)	16 (100%)	0,02	38 (76,%)	60 (86,71%)	0,26
Não	1 (16,67%)	10 (26,32%)	0 (0,00%)		12 (24%)	10 (14,29%)	
Rigidez							
Sim	2 (33,33%)	14 (36,84%)	8 (50%)	0,64	18 (36%)	30 (42,86%)	0,57
Não	4 (66,67%)	24 (63,16%)	8 (50%)		32 (64%)	40 (57,14%)	
Bradíinesia							
Sim	2 (33,33%)	7 (18,42%)	3 (18,75%)	0,74	11 (22%)	13 (18,57%)	0,81
Não	4 (66,67%)	31 (81,58%)	13 (81,25%)		39 (78%)	57 (81,43%)	
Instabilidade Postural							
Sim	0 (0,00%)	5 (13,16%)	3 (18,75%)	0,79	5 (10%)	11 (15,71%)	0,26
Não	6 (100%)	33 (86,84%)	13 (81,25%)		45 (90%)	59 (84,29%)	

Em relação às frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo rs3213607, não houve diferença significativa entre as subpopulações de pacientes DP com presença e ausência de tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural na amostra do presente estudo (tabela 8).

Tabela 8: Investigação da frequência de associação do SNP rs3213607 com sinais clínicos de 60 pacientes DP.

Sinais Clínicos	Genótipos (rs3213607)		<i>p</i> -Valor*	Alelos (rs3213607)		<i>p</i> -Valor*
	CC	CA		C	A	
Tremor						
Sim	40 (80%)	9 (90%)	0,67*	89 (80,91%)	9 (90%)	0,68*
Não	10 (20%)	1 (10%)		21 (19,09%)	1 (10%)	
Rigidez						
Sim	19 (38%)	4 (40%)	0,99*	42 (38,18%)	4 (40%)	0,99*
Não	31(62%)	6 (60%)		68 (61,82%)	6 (60%)	
Bradicinesia						
Sim	10 (20%)	2 (20%)	0,97*	22 (20%)	2 (20%)	0,97*
Não	40 (80%)	8 (80%)		88 (80%)	8 (80%)	
Instabilidade Postural						
Sim	7 (14%)	1 (10%)	1,00*	15 (13,64%)	1 (10%)	1,00*
Não	43 (86%)	9 (90%)		95 (86,36%)	9 (90%)	

* Teste Exato de Fisher

5. DISCUSSÃO

Neste estudo a média de idade de início da doença foi de $54 \pm 12,5$ anos. A amostra é representativa da forma clássica da DP, que geralmente tem início a partir dos 50 anos de idade (Corti *et al.*, 2011). Em relação ao gênero, constatou-se que a maioria dos casos (63,9%) pertencia ao gênero masculino. Baseado em estudos de mortalidade e prevalência, a DP parece ocorrer mais frequentemente em homens do que em mulheres (Gillies *et al.*, 2014). O histórico familiar de DP é consistentemente associado a um maior risco da doença e pode refletir uma predisposição genética, uma causa puramente genética ou uma interação familiar de fatores de risco (Petrucci *et al.*, 2014). Neste estudo 26,2% dos pacientes relataram uma história familiar positiva para a DP, semelhante às frequências de outros estudos (Longo *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2013). O tremor é um sinal comum e ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes com DP (Helmich *et al.*, 2013). No presente estudo o tremor foi o sinal clínico apresentado pela maioria dos pacientes (82%).

Esse estudo teve como etapa inicial a investigação das frequências genótípicas e alélicas dos SNPs: rs4839797, rs2518261, rs2227281, rs2227283, rs3213607 e rs2235076 no gene *GRIK2*, assim como, a investigação de uma possível influência desses SNPs sobre as características clínicas e epidemiológicas de um grupo de pacientes com DP. Esses SNPs já tinham sido analisados em uma variedade de doenças neurológicas: esquizofrenia, transtorno do espectro autista, transtorno obsessivo-compulsivo, ataxia espinocerebelar tipo 3 e doença de Huntington (Emmel *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007; Motazacker *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2006), dentre outras. No entanto, não existe qualquer trabalho publicado na literatura relativo ao estudo desses SNPs em pacientes com DP.

Esses resultados inéditos de frequências genótípicas e alélicas podem ser considerados um ponto de partida para investigar outras populações. Conhecer a frequência desses SNPs é importante em diferentes populações de pacientes com DP, considerando-se que os marcadores genéticos variam conforme a constituição genética de cada população (Boardman *et al.*, 2010). Neste sentido, o presente trabalho pretende contribuir caracterizando os dados de variações alélicas e genótípicas de 6 SNPs do gene *GRIK2* e que podem estar associados à DP. Portanto, a análise da distribuição polimórfica desses possíveis

marcadores genéticos é um importante passo para o entendimento das interações gene-ambiente, as quais podem estar envolvidas nos mecanismos que fundamentam as doenças.

Para verificar a influência dos 6 SNPs no gene *GRIK2* em uma amostra de pacientes com DP recorreu-se a um estudo de associação caso-controle, sendo uma estratégia necessária na definição da contribuição de fatores genéticos em doenças complexas e de origem multifatorial, como a maioria dos casos de DP. No presente trabalho, após análise quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg da amostra (casos e controles), verificou-se que 4 (rs4839797, rs2518261, rs3213607 e rs2235076) dos 6 SNPs se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, como tal, foram representativos da população, o que os tornam adequados para os objetivos de um estudo de associação.

O SNP rs2235076 (G/A) não foi polimórfico, concordando com estudos realizados em pacientes com autismo nas populações da China, Coreia do Sul e Índia (Shuang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2007). A frequência do alelo A foi de 0,82% no grupo DP e 0,72% no grupo controle. O SNP rs2235076 representa uma troca de G para A, conduzindo a uma substituição não sinônima na posição 867 do resíduo de aminoácido metionina por isoleucina (M867I) na região carboxi-terminal da subunidade GluK2 do receptor KA e esta região é altamente conservada (Shuang *et al.*, 2004). Isto pode explicar o motivo para a frequência muito baixa do alelo A e ausência do genótipo AA.

Dos polimorfismos adequados para o estudo de associação como marcador genético, o polimorfismo rs2518261 (C/T) foi associado à DP, uma vez que foi demonstrado diferenças genótípicas e alélicas significativas entre pacientes com DP e o grupo controle. O genótipo CC foi mais encontrado no grupo controle, conferindo a possibilidade desse genótipo estar associado a um fator de proteção. O alelo T parece possuir um efeito de risco para DP.

Quando o grupo de pacientes com DP foram analisados quanto à presença e ausência de tremor, foi observado que o genótipo TT do SNP rs2518261 apresentou associação com a presença de tremor. Este é o primeiro relato que avaliou a associação entre variantes polimórficas do gene *GRIK2* e a DP, portanto, é o primeiro a demonstrar a associação de um polimorfismo neste gene com um sinal clínico da doença.

O único estudo publicado até o momento que associa este SNP rs2518161 com alguma desordem neurológica foi realizado por Holt e colaboradores (2010). Nesse estudo, através da genotipagem de 384 SNPs candidatos para o transtorno do espectro autista em 382 famílias europeias foi encontrado uma associação do SNP rs2518261 tanto com o autismo estrito (p -valor = 0,00955), quanto para o transtorno do espectro autista (p -valor = 0,00170).

O polimorfismo rs2518261 (C/T) localiza-se em uma região não codificante (íntron 1), onde a sequência codificadora do receptor não é alterada. O significado funcional e biológico deste SNP é em grande parte desconhecido. No entanto, sabe-se que a subunidade GluK2, codificada pelo gene *GRIK2*, é regulada pela edição do mRNA (Paschen *et al.*, 1994). Foi sugerido que o polimorfismo rs2227281, também localizado em região não codificante (íntron 14), poderia influenciar esta edição (Shuang *et al.*, 2004). A edição do mRNA da subunidade GluK2 no sítio Q/R altera a permeabilidade dos canais de Ca^{2+} (Egebjerg & Heinemann, 1993), um importante íon que participa do mecanismo de excitotoxicidade, considerado como um mecanismo de neurodegeneração devido à ativação intensa dos receptores glutamatérgicos (Ambrosi *et al.*, 2014). A excitotoxicidade é frequentemente observada em diversas doenças neurodegenerativas além da DP, como a Doença de Alzheimer, Doença de Huntington e ataxias (Dong *et al.*, 2009; Emmel, 2010). Além disso, tem sido relatado polimorfismos localizados em íntrons influenciando o *splicing* do pré-mRNA, podendo ter um papel importante na expressão de proteínas e, conseqüentemente, em patologia como a DP (Bjorklund & Kordower, 2010; Kalinderi *et al.*, 2011; Jakubauskiene *et al.*, 2012).

Por outro lado, é possível que o polimorfismo rs2518261 não esteja diretamente envolvido, mas pode estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais dentro do mesmo gene ou com outro locus próximo de susceptibilidade (Shuang *et al.*, 2004). Considerando este aspecto, é válido ressaltar o fato de que ambos os genes *GRIK2* e *PARK2* estão localizados no cromossomo 6, nas posições 6q16.3-q21 e 6q25.2-q27, respectivamente (Barbon *et al.*, 2001; Klein & Westenberger, 2012). O gene *PARK2* codifica a proteína parkina, sendo responsável pela forma autossômica recessiva da DP, com início precoce (Klein & Westenberger, 2012). Outro gene localizado no cromossomo 6 (6p21), associado com a DP esporádica de início tardio, é o HLA-DRB5 (Hamza *et al.*, 2010; Lin & Farrer,

2014). Portanto, com a presença desses importantes genes relacionados à DP no cromossomo 6, seria interessante pesquisar variantes no gene *GRIK2* através de estudos de análise de ligação e associação do genoma.

O grupo de pacientes com DP neste estudo, predominantemente, representa a forma mais comum (esporádica) desta patologia. Como há evidências na pesquisa realizada por Maraschi e colaboradores (2014) de que a subunidade GluK2 interage com a parkina acentuando a excitotoxicidade *in vitro*, seria apropriado realizar estudos de SNPs no gene *GRIK2* em amostras representativas da DP autossômica recessiva causada pelo gene *PARK2*.

As limitações do presente estudo devem ser reconhecidas. Este foi um estudo piloto realizado em uma amostra de conveniência de pacientes com DP, condicionado à disponibilidade dos dados epidemiológicos e clínicos. Sabe-se que amostras coletadas por conveniência correm o risco de não representarem adequadamente toda a população do estudo (Miot, 2011). No entanto, apesar do grupo DP ter sido conduzido como uma amostra de conveniência, a mesma foi composta por pacientes atendidos e tratados no ambulatório de Geriatria e Neurologia do HUIBB que é um dos hospitais de referência em Alzheimer e Parkinson, e faz parte da rede de assistência do Sistema Único de Saúde (SUS) atendendo a Região Metropolitana de Belém (Pará).

O tamanho amostral dos pacientes (n=61) analisados neste trabalho limita em parte o estudo, pois enfraquece a confiabilidade estatística sobre o que foi evidenciado, porém não o inviabiliza. Acredita-se que para a maioria dos casos, se uma associação for consistente, ela deverá se revelar, ainda que a amostra seja pequena, tornando o presente estudo cientificamente relevante. Por outro, com o intuito de reforçar os dados aqui relatados, investigações adicionais, utilizando um maior número de amostra, devem ser conduzidas explicando os achados por ora descritos.

Embora este estudo tenha limitações que impedem conclusões definitivas sobre o significado desses achados, abrem-se novas perspectivas para a investigação do sistema glutamatérgico relacionado à subunidade GluK2 codificada pelo gene *GRIK2*. Estudos adicionais são necessários para confirmação desses resultados e o esclarecimento da importância destas variações genéticas do gene *GRIK2* no risco de DP e determinação de sua gravidade.

A maior contribuição que o presente estudo pode proporcionar é o pioneirismo na avaliação do gene *GRIK2* e a DP. Dessa maneira, o estudo fornece justificativa para o prosseguimento de novos estudos relacionados à evidência de associação encontrada, prestando-se como guia para novas investigações sobre o tema. A associação observada (presença do alelo T do polimorfismo rs2518261 e risco aumentado para DP; presença de genótipo TT do polimorfismo rs2518261 e tremor) poder ser utilizada como um substrato inicial para replicação em estudos com amostras maiores, uma vez que a identificação de associação é o primeiro passo que visa contribuir no entendimento da patogênese molecular de uma doença (Mossey, 1999). Contudo, no intuito de confirmar estes resultados é importante em futuros estudos proceder tratamentos estatísticos mais refinados com populações de pacientes melhor caracterizadas através de escalas de avaliação da DP, como a escala de Hoehn Yahr (desenvolvida com o objetivo de mensurar o grau de acometimento da doença e o nível de deficiência clínica dos sujeitos) e a Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (que avalia a progressão da DP e os efeitos de tratamentos e intervenções terapêuticas aplicadas) (Goetz *et al.*, 2008; Hoehn & Yahr, 1967).

Outras investigações analisando interações adicionais gene-gene e gene-ambiente possuem relevância para o entendimento do sistema glutamatérgico e seu papel na DP. O presente trabalho inicia a construção de um corpo de evidências a respeito de potenciais efeitos de polimorfismos genéticos do gene *GRIK2* sobre a DP. Como tal, estes achados preliminares fornecem suporte e abrem pistas para a continuação de estudos prospectivos sobre esta temática.

6. CONCLUSÃO

No grupo DP, o tremor foi o sintoma mais relatado e a maioria dos indivíduos era do gênero masculino. Esta amostra em grande parte foi constituída por pacientes que apresentavam a forma esporádica da DP.

Foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs4839797, rs2518261, rs2227281, rs2227283, rs3213607 e rs2235076 no gene *GRIK2* no grupo DP e grupo controle. Três SNPs foram excluídos das análises de associação por não estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg (rs2227281 e 2227283) ou por apresentar frequência do menor alelo menor que 5% (rs2235076).

Quanto aos SNPs rs4839797 e rs3213607 não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (DP e controle) ou com as características clinico-epidemiológicas dos pacientes (sinais clínicos e idade de início dos sintomas).

Foi verificada a existência de uma associação do SNP rs2518261 (C/T) no grupo DP. Observou-se que o alelo T pareceu ter um efeito de risco para a DP, e que o genótipo TT foi associado com a ocorrência de tremor no grupo DP.

Os resultados obtidos entre o gene *GRIK2* e a DP neste estudo inicial, instiga a realização de investigações maiores e mais precisas, no intuito de confirmar os achados aqui relatados.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, G.E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, **6(3)**: 259-280. 2004.
- AMBROSI, G.; CERRI, S. & BLANDINI, F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, **121(8)**: 849-859. 2014.
- BARBON, A.; VALLINI, I & BARLATI, S. Genomic organization of the human GRIK2 gene and evidence for multiple splicing variants. **Gene**, **274**: 187–197. 2001.
- BISCHOFF, S.; BARHANIN, J.; BETTLER, B. ET AL. Spatial distribution of kainate receptor subunit mRNA in the mouse basal ganglia and ventral mesencephalon. **The Journal of comparative neurology**, **379**: 541-562. 1997.
- BJORKLUND, T. & KORDOWER, J. H. Gene therapy for Parkinson's disease. **Mov. Disord.** **25 (1)**: 161–173. 2010.
- BLANDINI, F. An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Functional neurology**, **25(2)**: 65 - 71. 2010.
- BOARDMAN, J.D.; BLALOCK, C.L.; CORLEY, R.P.; STALLINGS, M.C.; DOMINGUE, B.W.; MCQUEEN, M.B.; CROWLEY, T.J.; HEWITT, J.K.; LU, Y & FIELD, S.H. Ethnicity, body mass, and genome-wide data. **Biodemography and social biology**. **56**: 123–136. 2010.
- BREUSTEDT, J. & SCHMITZ, D. Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. **The Journal of neuroscience**, **24(45)**: 10093-10098. 2004.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A. & KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª Ed. Editora AMGH. Porto Alegre, 2012. 2112p.

- BURCH, D. & SHEERIN, F. Parkinson's Disease. **The Lancet Neurology**, **365**: 622-627. 2005.
- BUREAU, I.; DIEUDONNE, S.; COUSSEN, F. & MULLE, C. Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **97(12)**: 6838-6843. 2000.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. Testes não-paramétricos. **Bioestatística: princípios e Aplicações**; p165-184. Porto Alegre, 2003. Artmed.
- CANNELLA, M.; GELLERA, C.; MAGLIONE, V.; GIALONARDO, P.; CISLAGHI, G.; MUGLIA, M. & SQUITIERI, F. The gender effect in juvenile Huntington disease patients of Italian origin. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, **125(1)**: 92-98. 2004.
- CAUDLE, W. M. & ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Experimental neurology**, **220(2)**: 230-233. 2009.
- CHATTOPADHYAY, B.; GHOSH, S.; GANGOPADHYAY, P.K.; DAS, S.K.; ROY, T.; SINHA, K.K.; ... & BHATTACHARYA, A. K. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. **Neuroscience letters**, **345(2)**: 93-96. 2003.
- CHITTAJALLU, R.; BRAITHWAITE, S.P.; CLARKE, V.R. & HENLEY, J.M. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. **Trends in pharmacological sciences**. **20**: 26–35. 1999.
- CONTRACTOR, A.; MULLE, C. & SWANSON, G.T. Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. **Trends in neurosciences**, **34(3)**: 154-163. 2011.
- CORTI, O.; LESAGE, S. & BRICE, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. **Physiological reviews**, **91(4)**: 1161-1218. 2011.
- DEMAAGD, G. & PHILIP, A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. **Pharmacy and Therapeutics**, **40(8)**: 504–532. 2015.

- DOHERTY KM, VAN DE WARRENBURG BP, PERALTA MC, ET AL. Postural deformities in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2011;10:538–549.
- DONG, X. X.; WANG, Y. & QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, **30(4)**: 379-387. 2009.
- DUQUE, A.F.; LOPEZ, J.C.; BENITEZ, B.H.; HERNANDEZ H.; YUNIS, J.J.; FERNANDEZ, W.; ARBOLEDA, H. & ARBOLEDA, G. Analysis of the LRRK2 p.G2019S mutation in Colombian Parkinson's Disease Patients. **Colombia Médica**, **46(3)**: 117-121. 2015.
- DUTTA, S.; DAS, S. & GUHATHAKURTA, S. et al. Glutamate receptor 6 gene (GluR6 or GRIK2) polymorphisms in the Indian population: a genetic association study on autism spectrum disorder. **Cellular and molecular neurobiology**. **27**: 1035–1047. 2007.
- EGEBJERG, J., & HEINEMANN, S. F. Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **90(2)**: 755-759. 1993.
- EMMEL, V.E. **Análise de modificadores genéticos do fenótipo da ataxia espinocerebelar tipo 3**. Tese de Doutorado. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. 156p.
- EMRE, M. What causes mental dysfunction in Parkinson's disease?. **Movement Disorder Society**, **18(6)**: 63-71. 2003.
- FINLAY, C. & DUTY, S. Therapeutic potential of targeting glutamate receptors in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, **121(8)**: 861-880. 2014.
- GEREAU, R.W. & SWANSON, G.T. **The glutamate receptors**. Ed. Springer Science & Business Media. New Jersey (USA), 2008. 576p.
- GILLIES, G.E.; PIENAAR, I.S.; VOHRA, S. & QAMHAWI, Z. Sex differences in Parkinson's disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, **35(3)**: 370-384. 2014.

- GOETZ, C. G.; TILLEY, B.C.; SHAFTMAN, S.R.; STEBBINS, G.T.; FAHN, S.; MARTINEZ-MARTIN, P.; DUBOIS, B. *et al.* Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. **Movement disorders**, **23(15)**: 2129-2170. 2008.
- GREENAMYRE, J. T. Glutamatergic influences on the basal ganglia. **Clinical neuropharmacology**, **24(2)**: 65-70. 2001.
- HAMZA, T. H.; ZABETIAN, C. P.; TENESA, A.; LAEDERACH, A.; MONTIMURRO, J.; YEAROUT, D. & Kusel, V.I. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. **Nature genetics**, **42(9)**: 781-785. 2010.
- HARDY, J. Impact of genetic analysis on Parkinson's disease research. **Movement Disorders**, **18(6)**: S96-98. 2003.
- HASSEL, B. & DINGLEDINE, R. Glutamate. In: SIEGEL, G.J. *et al* (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**: Academic Press. 2006.
- HELMICH, R.C.; TONI, I.; DEUSCHL, G. & BLOEM, B.R. The pathophysiology of essential tremor and Parkinson's tremor. **Current neurology and neuroscience reports**, **13(9)**: 1-10. 2013.
- HOEHN, M.M. & YAHR, M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. **Neurology**, **17(5)**: 427-442. 1967.
- HOLT, R.; BARNBY, G.; MAESTRINI, E.; BACCHELLI, E.; BROCKLEBANK, D.; SOUSA, I.; MULDER, E.J.; KANTOJÄRVI, K.; JÄRVELÄ, I.; KLAUCK, S.M.; POUSTKA, F.; BAILEY, A.J. & MONACO, A.P. Autism MOLGEN Consortium Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. **European Journal of Human Genetics**. **18**: 1013–1019. 2010
- HUETTNER, J.E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Progress in neurobiology**, **70**: 387-407. 2003.

- HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E. & LEES, A. J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, **57(8)**: 1497-1499. 2001.
- HUGHES, A. J.; DANIEL, S.E.; KILFORD, L. et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, **55(3)**: 181-184. 1992.
- JAKUBAUSKIENE, E.; JANAVICIUTE, V.; PECIULIENE, I.; SÖDERKVIST, P. & KANOPKA, A. G/A polymorphism in intronic sequence affects the processing of MAO-B gene in patients with Parkinson disease. **FEBS Lett.** **586**: 3698–704. 2012.
- JAMAIN, S.; BETANCUR, C.; QUACH, H.; PHILIPPE, A.; FELLOUS, M.; GIROS, B.; GILLBERG, C.; LEBOYER, M.; BOURGERON, T. Paris Autism Research International Sibpair (PARIS) Study. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. **Molecular psychiatry**. **7**: 302–310. 2002.
- JANE, D.E.; LODGE, D. & COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. **Neuropharmacology**, **56(1)**: 90-113. 2009.
- JASKOLSKI, F.; COUSSEN, F. & NAGARAJAN, N. ET AL. Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. **Journal of Neuroscience**, **24**: 2506-2515. 2004.
- JELLINGER, K. Overview of morphological changes in Parkinson's disease. **Advances in Neurology**, **45**: 1-18. 1987.
- KALINDERI, K.; FIDANI, L.; KATSAROU, Z. & BOSTANTJOPOULOU, S. Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. **Int. J. Clin. Pract.** **65**: 1289–94. 2011.
- KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S. & HUDSPETH, A.J. **Princípios de Neurociências**. 5ª Ed. Editora AMGH. Porto Alegre, 2014. 1544p.
- KAWAHARA, Y.; ITO, K.; SUN, H. et al. Regulation of glutamate receptor RNA editing and ADAR mRNA expression in developing human normal and Down's syndrome brains. **Brain research. Developmental brain research**, **148**: 151-155. 2004.

- KIM, S.A.; KIM, J.H.; PARK, M. et al. Family-based association study between GRIK2 polymorphisms and autism spectrum disorders in the Korean trios. **Neuroscience research**, **58**: 332-335. 2007.
- KLEIN, C. & WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, **2(1)**: a008888. 2012.
- KUMAR, J.; & MAYER, M. L. Functional Insights from Glutamate Receptor Ion Channel Structures. **Annual Review of Physiology**, **75**: 313–337. 2013.
- LAU, L.M.L. & BRETHER, M.M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, **5(6)**: 525-535. 2006.
- LEE, M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. **Current protein & peptide science**, **14**: 21-32. 2013.
- LIN, M.K., & FARRER, M.J. Genetics and genomics of Parkinson's disease. **Genome medicine**, **6(6)**: 1. 2014.
- LONGO, G.S., PINHEL, M.A.; GREGÓRIO, M.L.; OLIVEIRA, B.A.; QUINHONEIRO, D.C., TOGNOLA, W.A. & NAKAZONE, M. A. Alpha-synuclein A53T mutation is not frequent on a sample of Brazilian Parkinson's disease patients. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, **73(6)**: 506-509. 2015.
- MARASCHI, A.; CIAMMOLA, A.; FOLCI, A. et al. Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. **Nature communications**, **5**. 2014.
- MARCO, S.; OTAÑO1, I.P. & LUJÁN, R. Los receptores de glutamato como dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas. **The Spanish Ion Channel Initiative**. 2011. Disponible em: <http://sici.umh.es/Articulo%20SICI%20MARZO%20R.Luj%C3%A1n%20e%20I.%20P%20A9rez%20Ota%C3%B1o.pdf>
- MARINO, M.J.; ORNELLA, V. & CONN, P.J. Glutamate receptors and Parkinson's disease. **Drugs & aging**, **20(5)**: 377-397. 2003.

- MASSANO, J. Doença de Parkinson: actualização clínica. **Acta Médica Portuguesa, 24:** 827-834. 2011.
- MATTSON, M.P. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences, 1144:** 97-112. 2008.
- MEISSNER, W.G. When does Parkinson's disease begin? From prodromal disease to motor signs. **Revue Neurologique, 168: 809–814.** 2012.
- MIOT, H.A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro, 10(4): 275-278.** 2011.
- MORALES, I.; SABATE, M. & RODRIGUEZ, M. Striatal glutamate induces retrograde excitotoxicity and neuronal degeneration of intralaminar thalamic nuclei: their potential relevance for Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience, 38(1): 2172-2182.** 2013.
- MORIYAMA, Y.; HAYASHI, M.; YATSUSHIRO, S. ET AL. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. **The Journal of experimental biology, 203(1): 117-125.** 2000.
- MOSSEY, P. A. The heritability of malocclusion: part 2 – the influence of genetics in malocclusion. **Br. J. Orthod., Oxford, 26(3): 195-203.** 1999.
- MOTAZACKER, M.M.; ROST, B.R. & HUCHO, T. et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. **The American Journal of Human Genetics, 81: 792–798.** 2007.
- NODA, M. & BEPPU, K. Possible contribution of microglial glutamate receptors to inflammatory response upon neurodegenerative diseases. **Journal of Neurological Disorders, 1: 131.** 2013.
- OLIVE, M.F. Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. **Current drug abuse reviews, 2: 83-98.** 2009.

- PASCHEN, W.; HEDREEN, J.C. & ROSS, C.A. RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in human brain tissue. **J Neurochem** **1994**; **63**: 1596-1602.
- PERRAIS, D.; PINHEIRO, P.S.; JANE, D.E. & MULLE, C. Antagonism of recombinant and native GluK3-containing kainate receptors. **Neuropharmacology**, **56(1)**: 131-140. 2009.
- PETERNELLA, F.M.N & MARCON, S.S. Descobrimos a Doença de Parkinson: impacto para o parkinsoniano e seu familiar. **Revista Brasileira de Enfermagem** **62(1)**: 25-31. 2009.
- PETRUCCI, S.; CONSOLI, F. & VALENTE, E.M. "Parkinson disease genetics: a "continuum" from Mendelian to multifactorial inheritance." **Current molecular medicine** **14(8)**: 1079-1088. 2014
- PLANELLAS-CASES, R.; LERMA, J. & MONTIEL, A.F. Pharmacological intervention at ionotropic glutamate receptor complexes. **Current pharmaceutical design** **12(28)**: 3583-3596. 2006.
- PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN K.; THOMAS L.; FERREIRA, M.A.R.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; DE BAKKER, P.I.W.; DALY, M.J. & SHAM, P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **The American Journal of Human Genetics**. **81**: 559–575. 2007.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; McNAMARA, J.O. & WHITE, L.E. **Neurociências**. 4ª Ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2010. 928p.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL D.W. **Molecular Cloning – a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- SCHEFFER, D.L. **O papel da dopamina no desenvolvimento de fadiga em modelo experimental de doença de Parkinson**. **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013. 97p.

- SCHIFFMANN, S.N.; FISIONE, G.; MORESCO, R.; CUNHA, R.A. & FERRÉ, S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. **Progress in Neurobiology**, **83(5)**: 277-292. 2007.
- SCHIMITZ, D.; MELLOR, J.; BREUSTEDT, J. & NICOLL, R. A. Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. **Nature neuroscience**, **6(10)**: 1058-1063. 2003.
- SCHRAG, A.; HORSFALL, L.; WALTERS, K. ET AL. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. **The Lancet Neurology**, **14(1)**: 57–64. 2015.
- SHIBATA, H.; SHIBATA, A. & NINOMIYA, H. et al. Association study of polymorphisms in the GluR6 kainate receptor gene (*GRIK2*) with schizophrenia. **Psychiatry research**, **113(1)**: 59-67. 2002.
- SHUANG, M.; LIU, J.; JIA, M.X.; YANG J.Z.; WU, S.P. GONG, X.H. LING, Y.S.; RUAN, Y.; YANG, X.L. ZHANG, D. Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, **131B**: 48–50. 2004.
- SIMEONE, T.A.; SANCHEZ, R.M. & RHO, J.M. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Journal of child neurology**, **19**: 343-361. 2004.
- SMITH, A.K.; FANG, H.; WHISTLER, T.; UNGER, E.R. & RAJEEVAN, M. S. Convergent Genomic Studies Identify Association of *GRIK2* and *NPAS2* with Chronic Fatigue Syndrome. **Neuropsychobiology**, **64(4)**: 183–194. 2011.
- SOUZA, C.F.; ALMEIDA, H. C.; SOUZA, J. M.; COSTA, P.H.; SILVEIRA, Y.S. & BEZERRA, J. C. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. **Revista de neurociência**, **19(4)**: 718-723. 2011.
- SPILLANTINI M.G.; SCHMIDT M.L.; LEE V.M.; TROJANOWSKI J.Q.; JAKES R.; GOEDERT M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, **388**: 839–840. 1997.

- UC, E.Y. & FOLLET, K.A. Deep Brain Stimulation in Movement Disorders. **Seminars in Neurology**, **27(2)**: 170-182. 2007.
- WU, K.; HANNA, G.L.; EASTER, P.; KENNEDY, J.L.; ROSENBERG, D.R. & ARNOLD, P.D. Glutamate System Genes and Brain Volume Alterations in Pediatric Obsessive-Compulsive Disorder: A Preliminary Study. **Psychiatry Research**, **211(3)**: 214–220. 2013.
- XU, J.; GONG, D.D.; MAN, C.F. & FAN, Y. Parkinson's disease and risk of mortality: meta-analysis and systematic review. **Acta Neurologica Scandinavica**, **129(2)**: 71-79. 2013.
- YAN, S.; SANDERS, J.M. & XU, J. ET AL. A C-terminal determinant of GluR6 kainate receptor trafficking. **Journal of Neuroscience**, **24**: 679-691. 2004.
- YUAN, L.; SONG, Z.; XU, H.; GU, S.; ZHU, A.; GONG, L. ... & DENG, H. EIF4G1 Ala502Val and Arg1205His variants in Chinese patients with Parkinson disease. **Neuroscience letters**, **543**: 69-71. 2013.
- ZAVARIZ, R.C., & LIMEIRA, D.M. Possíveis Etiologias Para a Doença de Parkinson: Uma Breve Revisão Bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, **5(2)**: 388-398. 2012.
- ZENG, W.; GILLIS, T. & HAKKY, M. et al. Genetic analysis of the GRIK2 modifier effect in Huntington's disease. **Biomed Central Neuroscience**, **7(1)**: 1. 2006.
- ZHANG, X.M. & ZHU, J. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. **Current Neuropharmacology**, **9**: 388-398. 2011.

ANEXOS

Anexo I – Critérios Clínicos de Diagnóstico de DP

Critérios Clínicos de Diagnóstico do Banco de Cérebro da Sociedade de Doença de Parkinson do Reino Unido (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria)

Etapa 1: Diagnóstico de síndrome parkinsoniana

Bradicinesia e pelo menos um dos seguintes: rigidez muscular, tremor de repouso de 4 a 6 Hz, instabilidade postural não causada por disfunção primária visual, vestibular, cerebelar ou proprioceptiva.

Etapa 2: Critérios de Exclusão para Doença de Parkinson

História de acidente cerebrovascular de repetição com progressão em degrau das características parkinsonianas; história de traumatismo craniano de repetição; história de encefalite definida; crises oculógiras; tratamento com neurolépticos no início dos sintomas; mais de um parente afetado; remissão sustentada; características estritamente unilaterais após 3 anos; paralisia supranuclear do olhar; sinais cerebelares; envolvimento autonômico precoce grave, demência precoce grave com distúrbios de memória, linguagem e praxia; sinal de Babinski; presença de tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante na tomografia computadorizada; resposta negativa a altas doses de levodopa (excluindo-se má absorção); exposição a MPTP.

Etapa 3: Critérios Prospectivos Positivos de Suporte para Doença de Parkinson (são requeridos três ou mais para o diagnóstico de doença de Parkinson definida)

Início unilateral, tremor de repouso presente, doença progressiva, assimetria persistente afetando mais do lado de início, resposta excelente (70 a 100%) à levodopa, coréia grave induzida por levodopa, resposta à levodopa por 5 ou mais anos, curso clínico de 10 anos ou mais.

Anexo II – Aprovação em Comitê de Ética e Pesquisa



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



TERMO DE APROVAÇÃO

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

Belém, 29 de setembro de 2006


Dr. Eduardo Leitão Maia

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa / HUJBB/UFPA