

Diana da Costa e Castro Teixeira

Genes envolvidos na determinação de Parkinson



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2016

Genes envolvidos na determinação de Parkinson

Diana da Costa e Castro Teixeira

Projeto de Pós-Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Doutora Inês Lopes Cardoso

Genes envolvidos na determinação de Parkinson

Resumo

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa com maior expressão na atualidade, afetando cerca de 3% dos indivíduos com mais de 80 anos. Os sintomas clínicos desta doença são tremor em repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez, com boa resposta ao tratamento com levodopa.

Nos últimos anos desenvolveram-se vários estudos que tornaram inquestionável a contribuição de fatores genéticos para a complexa patogênese desta doença. Foram descobertas mutações altamente penetrantes capazes de produzir formas monogénicas raras da doença de Parkinson em genes como o SNCA, Parkina, DJ-1, PINK 1, LRRK2 e VPS35. Variantes únicas, com penetrâncias incompletas dos genes LRRK2 e GBA, apresentam-se como fatores de risco para a doença em determinadas populações. Além disso, mais de vinte variantes comuns, que produzem efeitos de pequenas dimensões, são tidas como responsáveis pela modelação do risco para a doença de Parkinson.

A investigação de formas Mendelianas da doença de Parkinson permitiu um conhecimento privilegiado sobre a fisiopatologia por detrás das formas idiopáticas mais comuns da doença.

Apesar de todos os avanços no campo da genética, este tipo de investigação ainda não contribuiu para o surgimento de novas terapêuticas sendo que este é o principal interesse da sua investigação futura. O desafio, na próxima década, será procurar dados que fortaleçam as informações já existentes em relação à genética da doença de Parkinson, através do conhecimento das consequências biológicas das variantes de risco. Além disso, também se espera que os estudos de associação genómica e a implementação de novas tecnologias de investigação como a “next generation sequencing” e a sequenciação do exoma sejam uma ajuda valiosa na identificação de novas variantes de risco da forma esporádica da doença de Parkinson.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Genética, Alelos de risco, Tratamento Farmacológico.

Abstract

Parkinson's disease is the second most important neurodegenerative disorder, affecting 3% of those older than 80 years of age. The clinical symptoms are resting tremor, postural instability, bradykinesia and rigidity, with a good response to levodopa therapy.

Over the last years, numerous studies have confirmed the unquestionable contribution of genetic factors to the complex pathogenesis of this disease. Highly penetrant mutations producing rare, monogenic forms of the disease have been discovered in singular genes such as SNCA, Parkin, DJ-1, PINK 1, LRRK2, and VPS35. Unique variants with incomplete penetrance in LRRK2 and GBA have been shown to be strong risk factors for Parkinson's disease in certain populations. Additionally, over 20 common variants with small effect sizes are now recognized to modulate the risk for Parkinson's disease.

Investigating Mendelian forms of PD has provided precious insight into the pathophysiology that underlies the more common idiopathic form of disease.

Despite all the advances on the genetic field, no treatment methodologies have been developed. The challenge over the next decade will be to strengthen the findings delivered through genetic discovery by assessing the direct, biological consequences of risk variants. Moreover, it is also expected that the advent of genome-wide association studies and the implementation of new technologies, like next generation sequencing and exome sequencing has undoubtedly greatly aided the identification of novel risk variants for sporadic Parkinson's Disease.

Keywords: Parkinson's Disease, Genetics, Risk Alleles, Pharmacological Treatment.

Metodologia

A realização deste trabalho teve como objetivo a revisão bibliográfica acerca do tema, Genes Evolvidos na determinação de Parkinson, sendo esta dissertação de índole teórica e estando isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental.

Em termos metodológicos e de forma a cumprir os objetivos delineados, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos e outras publicações, num período compreendido entre os meses de agosto de 2016 e outubro de 2016, recorrendo-se a fontes de pesquisa científicas como o *PubMed*, o *Science Direct* e a *b-On* e ao motor de busca *Google Académico*. A preferência por estas bases de dados na realização da pesquisa bibliográfica prendeu-se com o facto de, para além de serem de fácil acesso e utilização, compilam um grande número de artigos científicos atuais. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram: Doença de Parkinson, Genética, Alelos de risco, Tratamento Farmacológico.

Os artigos resultantes da pesquisa científica levada a cabo durante estes meses foram selecionados tendo em conta o interesse da informação neles contida para o tema, o ano de publicação e as evidências experimentais acerca do tema que contivessem. Limitou-se a pesquisa a artigos científicos e estudos escritos em inglês e português e com data de publicação não superior a 5 anos ou de ano anteriores cujo conteúdo fosse relevante dos quais se retirou a informação e os dados que conduziram à escrita desta monografia.

Ao Meu Avô

Agradecimentos

Ao meu avô, a quem dedico este trabalho, pelo enorme ser humano que é, por personificar valores como o respeito, bondade, compaixão, seriedade, trabalho e família e por ser a referência que me acompanhará para o resto da vida.

À minha mãe por me ter ensinado a ser uma pessoa capaz de defender e lutar por aquilo em que acredito e a querer sempre mais da vida.

À minha avó pelo seu sorriso e simplicidade que tantas vezes me deram alento.

Aos meus irmãos pelo companheirismo e por todas as aventuras e desventuras que vivemos, juntos.

Ao meu Santiago por ser a bonança na tempestade, o meu grande apoio.

À minha Ana pela amiga incondicional que é, em todas as circunstâncias.

À minha orientadora, Doutora Inês Lopes Cardoso, pela disponibilidade, partilha de saber e pelo tempo despendido.

Índice Geral

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
Metodologia	iii
Agradecimentos	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
I. Introdução	1
1.1. Evolução do Conceito	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Principais Sintomas	3
1.4. Diagnóstico	5
1.5. Causas da doença de Parkinson	7
1.5.1 Fatores Ambientais	8
1.5.2 Fatores Genéticos	9
1.5.3 Processos Bioquímicos Envolvidos no Desenvolvimento da doença de Parkinson	10
i. Agregação Proteica Anormal	11
ii. Disfunções Mitocondriais	11
iii. Stress Oxidativo	13
iv. Neuroinflamação	16
v. Excitotoxicidade	16
II. Genética da doença de Parkinson	17
2.1. Formas Monogénicas	17
2.1.1. Formas Autossómicas Dominantes da doença de Parkinson	19
i. α -sinucleína (SNCA)	19

Genes envolvidos na determinação de Parkinson

ii.	LRRK2	22
iii.	VPS35	24
2.1.2.	Formas Autossómicas Recessivas da doença de Parkinson	25
i.	Parkina	25
ii.	PINK1	27
iii.	DJ-1	28
iv.	ATP13A2, PLA2G6 e FBX07	29
2.2.	Fatores de Risco Genético na doença de Parkinson	31
i.	α -sinucleína (SNCA)	31
ii.	LRRK2	32
iii.	Glucocerebrosidase (GBA)	33
2.3.	Perspetivas Futuras	34
III.	Terapias para a doença de Parkinson	36
3.1.	Terapia Farmacológica	36
3.2.	Terapia Cirúrgica	37
3.3.	Terapias em Investigação	37
Conclusões		39
Bibliografia		40

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Ilustração de um indivíduo com os principais sintomas da doença de Parkinson.	4
Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos etiopatogênicos e interações das células dopaminérgicas na substância nigra, característicos da doença de Parkinson.	10
Figura 3. Aspeto citoquímico dos corpos de Lewy na Substância Nigra.	11
Figura 4. Mecanismos que levam ao stress oxidativo na DP e a influência dos produtos dos genes envolvidos no processo de aparecimento da doença com este fenómeno.	13
Figura 5. Representação esquemática da formação de radicais livres a partir da Dopamina.	14

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1. Cronograma Histórico da evolução do conceito de doença de Parkinson.	2
Tabela 2. Estados da doença de Parkinson, segundo Hoehn e Yahr.	5
Tabela 3. Sinais clínicos que devem alertar para a possibilidade de causa alternativa à doença de Parkinson (“red flags”).	6
Tabela 4. Fatores de risco mais importantes para a doença de Parkinson.	8
Tabela 5. Genes envolvidos nas formas monogênicas da doença de Parkinson e <i>loci</i> de risco genético.	18

Abreviaturas

A2A – Recetor da adenosina

AD – Autossómica Dominante

ANK – Ankirina

AP – Aparecimento Precoce

AR – Autossómica Recessiva

AT – Aparecimento tardio

ATP – Adenosina Trifosfato

COMT – Catecol O-metil Transferase

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

ECP – Estimulação Cerebral Profunda

FAD - Flavina-adenina Dinucleótido

FBX07 – Proteína 7 da “F-box”

Fe²⁺ – Ião Ferro

Foxo3a – “Forkhead box O3a”

GBA – Glucocerebrosidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione

GSSG – Dissulfido de Glutathione

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

LRRK2 – “Leucine-rich repeat kinase 2”

MAO – Monoamina Oxidase

MDS – “Movement Disorder Society”

Mn²⁺ – Ião Manganês

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

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

O₂⁻ – Radical Superóxido

PAELR – “Parkin-associated endothelin receptor-like receptor”

PINK-1 – “PTEN – induced putative kinase 1”

PJAR – Parkinsonismo Juvenil de Transmissão Autossômica Recessiva

PLA2G6 – “Phospholipase A2 group VI”

pUb – Fosfo-ubiquitina

RM – Ressonância Magnética

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SN – Sistema Nervoso

SNARE – “Soluble NSF Attachment Receptor”

SNCA – Gene codificador da alfa-sinucleína

SOD – Superóxido Dismutase

TC – Tomografia Computorizada

UbCH7 – “Ubiquitin-conjugating enzyme 7”

Genes envolvidos na determinação de Parkinson

UbCH8 – “Ubiquitin-conjugating enzyme 8”

Ubl – “Ubiquitin-like”

UCHL1 – “Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1”

UPS – Sistema Ubiquitina-Proteossoma

VMAT₂ – Transportador Vesicular da monoamina 2

VPS35 – “Vacuolar Protein Sorting 35”

Zn²⁺ – Ião Zinco

α -Sp22 – “22kilodalton glycosylated form of α -synuclein”

I. Introdução

“I don’t have any choice whether or not I have Parkinson’s, but surrounding that non-choice is a million other choices that I can make.”

Michael J. Fox



1.1 Evolução do Conceito

Há cerca de 200 anos surge a primeira descrição clínica detalhada da doença de Parkinson (DP) e desde então ficou assente a ideia de que esta patologia se tratava de uma desordem motora fundamental. Este conceito inicial não se alterou substancialmente nos 150 anos que se seguiram (Garland, 1952; Parkinson, 2002).

Só no século XXI, com o aumento do conhecimento acerca da doença de Parkinson, se percebeu realmente a importância dos sintomas não motores para a evolução da patologia.

Na Tabela 1 sintetizam-se os principais acontecimentos históricos que, hoje, nos permitem encarar a doença como uma patologia neurodegenerativa crónica.

Tabela 1: Cronograma Histórico da evolução do conceito de doença de Parkinson
(adaptado de : (Spillantini e Goedert, 2016))

1817	James Pakinson publica a sua monografia “An Essay on the Saking Palsy” onde descreve os sintomas clínicos da doença.
1825-1893	J. M. Charcot nomeou a patologia como doença de Parkinson. Descreveu sucintamente aspetos não motores da doença e definiu os seus quatro sinais cardinais.
1912	Fritz Heinrich Lewy descreveu as inclusões características da DP que surgiam na região motora do nervo vago.
1919	Konstantin Tretiakoff reportou o aparecimento de agregados proteicos (corpos de Lewy) na substância nigra, bem como a sua degradação com o avanço da doença.
1957	Carlsson descobre que a administração de levodopa, precursor da dopamina, apresenta potencial neurotransmissor.
1960	Ehringer e Hornykiewicz descobrem que a concentração de dopamina no corpo estriado se encontra diminuída nos indivíduos com DP.
2000	Carlsson recebe o Prémio Nobel da Medicina pela descoberta do potencial da levodopa em doentes de Parkinson.

1.2.Epidemiologia

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa pertencente a um grupo heterogéneo de doenças que se caracteriza pela perda progressiva e relativamente seletiva da autonomia anatómica ou fisiológica do sistema nervoso (Lang e Lozano, 1998).

Apresenta uma etiologia complexa, envolvendo os gânglios de base e dando origem a perturbações do movimento, do tónus muscular e da postura (Nakabayashi *et al.*, 2008), contribuindo para uma marcada diminuição da qualidade de vida dos pacientes tendo implicações a nível financeiro, social e familiar.

Atualmente sabe-se que esta patologia é a mais frequentemente associada às desordens dos movimentos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum a seguir à doença de Alzheimer (Soto-Ortolaza e Ross, 2015). Nos países desenvolvidos, estima-se uma prevalência da doença de 0,3% no total da população sendo que esta aumenta com o

aumento da idade. Na população com mais de 60 anos esta percentagem sobe para 1-2% e com mais de 80 anos para os 3-4% (Corti *et al.*, 2011).

Em relação à incidência média da doença no nosso país, os valores mais consensuais apontam para 15-20 novos casos por 100.000 habitantes por ano (Twelves *et al.*, 2003).

No que respeita à taxa de prevalência da doença por géneros, observam-se diferenças entre homens e mulheres. Há uma maior incidência da doença no sexo masculino manifestando-se mais precocemente (Haaxma *et al.*, 2007). Outro dos dados relevantes é o facto de a doença de Parkinson apresentar uma forma atenuada nas mulheres e por isso a sua progressão é mais lenta (Haaxma *et al.*, 2007).

Nos dias de hoje o mundo depara-se com uma nova realidade demográfica onde se verifica um aumento exponencial da população idosa. Sendo assim, é espectável que a prevalência da doença de Parkinson aumente nos próximos anos e novos desafios económicos e sociais surjam agregados a esta realidade.

1.3. Principais Sintomas

A doença de Parkinson apresenta um desenvolvimento distinto de pessoa para pessoa pelo que há doentes com conjuntos distintos de sintomas que conduzirão ao mesmo diagnóstico.

Sendo a doença de Parkinson crónica e progressiva, os seus sintomas apresentam um agravamento com o avanço da doença, que está relacionado com a degeneração e morte celular dos neurónios dopaminérgicos na substância nigra e consequente diminuição da capacidade cerebral na produção de dopamina (Ferro e Pimentel, 2006; Tom e Cummings, 1998).

Esta doença caracteriza-se por um vasto leque de sintomatologias que vai desde os sintomas motores até aos não motores.

Os chamados sinais cardinais da doença que ajudam ao diagnóstico clínico são:

Rigidez – Caracterizada por falta de flexibilidade dos músculos que se tornam resistentes ao movimento. Normalmente a rigidez é assimétrica o que ajuda no diagnóstico (Barrero *et al.*, 2005; Tom e Cummings, 1998; Wolters *et al.*, 2008).

Acinesia e Bradicinesia – Resultado da ausência de dopamina no estriado que leva a um desequilíbrio entre sinais excitatórios e inibitórios (Ferro e Pimentel, 2006). O doente fica com os movimentos lentificados e apresenta dificuldade ao iniciar o movimento assim como de ter reações rápidas (Jankovic, 2007; Lemke e Raethjen, 2007). Estes sintomas, numa fase avançada, podem culminar no bloqueio de movimentos.



Figura 1: Ilustração de um indivíduo com os principais sintomas da doença de Parkinson (adaptado de <https://pt.pinterest.com/pin/143059725637528703/>).

Tremor – Sintoma mais frequente dos doentes de Parkinson. Em cerca de metade dos casos inicia-se nas extremidades distais. Este sintoma é observado em repouso e diminui com o início de qualquer ação (Ferro e Pimentel, 2006; McNamara, 2011; Schapira, 2011).

Instabilidade postural – Sintoma que leva a frequentes quedas e que surge numa fase avançada da doença (Jankovic, 2007; Lemke e Raethjen, 2007).

No que diz respeito aos sintomas não motores da doença de Parkinson, que podem surgir anos antes do aparecimento dos primeiros sinais motores, destacam-se os sintomas cognitivos que podem levar a demência, a hipósmia (perda parcial do olfato), a xerostomia, a alterações do sono (sonolência diurna excessiva, insónia, movimentos periódicos durante o sono, perturbações do comportamento do sono), depressão, ansiedade, fadiga, dor, disfunção sexual, disautonomia (alterações urinárias, hipotensão

ortostáica, obstipação, hipersudorese), perda da expressão facial, distúrbios de fala e problemas de pele (excesso de oleosidade ou secura intensa) (Davie, 2008; Jankovic, 2007; Lemke e Raethjen, 2007).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico correto da doença de Parkinson é um pré-requisito para que o doente possa aceder de forma correta ao melhor e mais célere tratamento disponível.

Na doença de Parkinson, a progressão dos sintomas é normalmente lenta, tendo um período de progressão de vinte ou mais anos. Foi criada uma escala, por Hoehn e Yahr (Tabela 2), que ajuda o clínico a perceber em que fase dos sintomas o paciente se encontra naquele momento.

Tabela 2: Estados da doença de Parkinson, segundo Hoehn e Yahr (adaptado de: http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons_disease/detail_parkinsons_disease.htm).

Estados	Características
Estado 1	Sintomas num único lado do corpo
Estado 2	Sintomas de ambos os lados do corpo
Estado 3	Desequilíbrio, dependência física
Estado 4	Incapacidade severa, mas ainda é possível andar ou estar de pé sem ajuda
Estado 5	Forçado a estar numa cadeira de rodas ou numa cama, exceto se tiver ajuda

Apesar dos muitos avanços que tem havido nas áreas de imagiologia e genética, o diagnóstico atual da doença de Parkinson ainda se faz através de um exame clínico onde se rastreia a existência de parkinsonismo e, em primeiro lugar, de bradicinesia.

No fundo, o diagnóstico baseia-se na observação de sinais motores alarmantes (tremor, rigidez ou instabilidade postural) e na avaliação da história clínica, familiar e farmacológica do doente.

Na primeira fase de diagnóstico, qualquer sintoma motor descrito pelo doente é avaliado pelo médico que após conversa com familiares reconhece outros sintomas (muitas vezes sintomas não motores) presentes desde há anos.

Na segunda fase do processo, são rastreadas e excluídas outras causas para o parkinsonismo (Tabela 3). É nesta altura que se faz uma análise cuidadosa da história clínica, farmacológica (onde se dá especial atenção ao consumo de fármacos antipsicóticos) e familiar do doente.

Tabela 3: Sinais clínicos que devem alertar para a possibilidade de causa alternativa à doença de Parkinson (“red flags”) (adaptado de (Massano, 2011))

Simetria dos sintomas, principalmente no início da doença
Marcadas alterações axiais ou dos membros inferiores, principalmente nas fases iniciais
Alterações posturais ou quedas frequentes nas fases iniciais, principalmente no primeiro ano de doença
Agravamento clínico rápido da doença (progressão para estadio 3 de Hoehn e Yahr em menos de 3 anos)
Ausência de tremor (ao longo do curso da doença)
Outra alteração de movimento associada (mioclonias, tiques, distonia precoce)
Alterações dos movimentos oculares
Alterações piramidais ou cerebelosas
Sintomas bulbares ou pseudobulbares
Presença de alterações sensitivas corticais, apraxia ou <i>alien limb</i> (sensação de membro estranho ou ausente)
Disautonomia marcada nas fases iniciais
Resposta clínica insuficiente à levodopa em dose adequada
Demência ou psicose grave nas fases iniciais, principalmente no primeiro ano da doença

Para aumentar a acuidade do diagnóstico, realiza-se um exame neurológico detalhado e pesquisam-se alterações bioquímicas sistémicas que possam determinar a causa do parkinsonismo. Este tipo de exames é bastante dispendioso sendo apenas realizado em circunstâncias bem fundamentadas.

A incerteza do diagnóstico é elevada e cerca de 10-30% dos pacientes inicialmente diagnosticados com a doença de Parkinson são clinicamente reclassificados em unidades especializadas (Schrag *et al.*, 2002).

A veracidade do diagnóstico varia consideravelmente consoante a duração da doença (baixa acuidade na primeira visita e superior após um longo acompanhamento do doente), experiência do médico, idade e com o conhecimento que este tem acerca da doença.

Os erros de diagnóstico estão associados à semelhança entre os sintomas apresentados noutras patologias e a sintomatologia da doença de Parkinson que causa parkinsonismo neurodegenerativo ou secundário (atrofia sistémica múltipla, paralisia supranuclear progressiva, encefalopatia subcortical arteriosclerótica, entre outras) ou à ausência de uma verdadeira doença parkinsoniana progressiva (tremor essencial, tremor distónico, entre outros).

Os mais recentes critérios clínicos de diagnóstico, propostos pela *Movement Disorder Society* (MDS), procuram atingir uma maior assertividade através da maior atenção dada aos sintomas não motores da doença. Nesta nova abordagem de diagnóstico surge uma nova classificação designada de fase prodrómica da doença de Parkinson que não é mais do que a fase inicial da doença.

O objetivo do diagnóstico na fase prodrómica é o diagnóstico precoce utilizando instrumentos de análise, tais como, biomarcadores e neuroimagem, que já provaram o seu valor na identificação desta doença. Há também progressos promissores noutras áreas de investigação como é o caso da utilização de marcadores moleculares. O mais recentemente identificado biomarcador é tecidual e pode ser recolhido através de biópsia.

Os critérios da MDS foram pensados de modo a minimizar os erros de diagnóstico apresentados pelos atuais critérios, aumentando assim a reprodutibilidade entre diferentes avaliadores e entre diferentes centros de investigação clínica, bem como permitir que o diagnóstico possa ser realizado por clínicos com menos experiência nesta doença.

1.5. Causas da doença de Parkinson

As causas da doença de Parkinson ainda não estão completamente definidas. Apesar dos avanços na investigação da doença registados nos últimos anos, esta é uma realidade ainda não esclarecida e a patologia é hoje encarada como uma cascata multifatorial de eventos.

Várias teorias foram formuladas e hoje propõe-se que quer fatores genéticos quer ambientais quer o próprio envelhecimento sejam responsáveis pelo aparecimento da doença, embora alguns não sejam ainda claros (Schapira, 2011; Ferro e Pimentel, 2006).

1.5.1. Fatores Ambientais

Vários fatores epidemiológicos como exposições ambientais, ocupacionais e estilos de vida têm sido associados ao desenvolvimento da DP.

Na tabela 4 estão sintetizados os fatores de risco mais importantes associados à DP.

Tabela 4: Fatores de risco mais importantes para a doença de Parkinson (adaptado de Campdelacreu, 2014).

Nível de Risco	Agente ambiental
Risco aumentado (evidências robustas)	Pesticidas
Risco aumentado (evidências fracas)	Elevado aporte de ferro, consumo de leite (homens), anemia crónica
Redutor do risco (evidências robustas)	Hiperuricémia, tabaco, café
Redutor do risco (evidências fracas)	Vitamina E, álcool, chá, exercício físico vigoroso

Foram estudados diferentes agentes ambientais que pudessem estar envolvidos no aparecimento da DP, entre eles a exposição a pesticidas, metais, herbicidas e toxinas.

Os diferentes estudos realizados não são consensuais. Muitos deles não conseguiram demonstrar evidências que associem a exposição a agentes ambientais como metais, herbicidas e toxinas com o desenvolvimento da DP (Campdelacreu, 2014). Apesar disso, os estudos com mais robustez relacionam a exposição a pesticidas com o desenvolvimento da DP, uma vez que estes agentes provocam a morte dos neurónios dopaminérgicos (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Estes estudos também relacionam a vida em ambiente rural, o trabalho agrícola e o consumo de água de poços com o desenvolvimento da DP (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

A nicotina é tida como um fator protetor uma vez que estimula os neurónios dopaminérgicos e inibe a formação de fibrilas de α -sinucleína, atenuando assim os sintomas da DP (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Foi provado que o risco de sofrer de DP é especialmente baixo em fumadores ativos (Peter *et al.*, 2008).

A cafeína provou ser um agente que protege contra o desenvolvimento da DP dado que se trata de um agonista dos recetores A2A da adenosina e tem um efeito neuroprotetor (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

Indivíduos com crises recorrentes de gota e que, portanto, possuem níveis plasmáticos elevados de ácido úrico no organismo apresentam um menor risco de desenvolvimento de DP e uma lenta progressão dos sintomas (Wirdefeldt *et al.*, 2011). O ácido úrico assume-se como um poderoso antioxidante com um efeito neuroprotetor (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

1.5.2 Fatores Genéticos

Apesar da maioria dos casos de DP (cerca de 85%) estar associada a causa idiopática ou de início tardio em que os pacientes não demonstram ter herdado a doença, evidências apontam para que haja, de facto, uma componente genética na DP.

Foi provado que pacientes com uma história familiar onde esta doença esteja incluída apresentam um maior risco de ela se manifestar em algum momento das suas vidas (Shannon, 2004). Nestes casos, a doença tende a manifestar-se em idades menos avançadas.

Mais adiante, neste documento, desenvolver-se-á esta temática de forma aprofundada.

1.5.3. Processos Bioquímicos envolvidos no desenvolvimento da Doença de Parkinson

Pensa-se que os processos patológicos que estão na origem do aparecimento da doença sejam diversos. Existem várias teorias explicativas da patogênese da DP baseadas em diferentes condições: i) agregação proteica anormal ii) disfunções mitocondriais; iii) stress oxidativo; iv) neuroinflamação; v) excitotoxicidade (Fukae *et al.*, 2007; Henchcliffe e Beal, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Estes processos, esquematizados na figura 2, levam à degenerescência dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra, com consequente diminuição da produção de dopamina (DA).

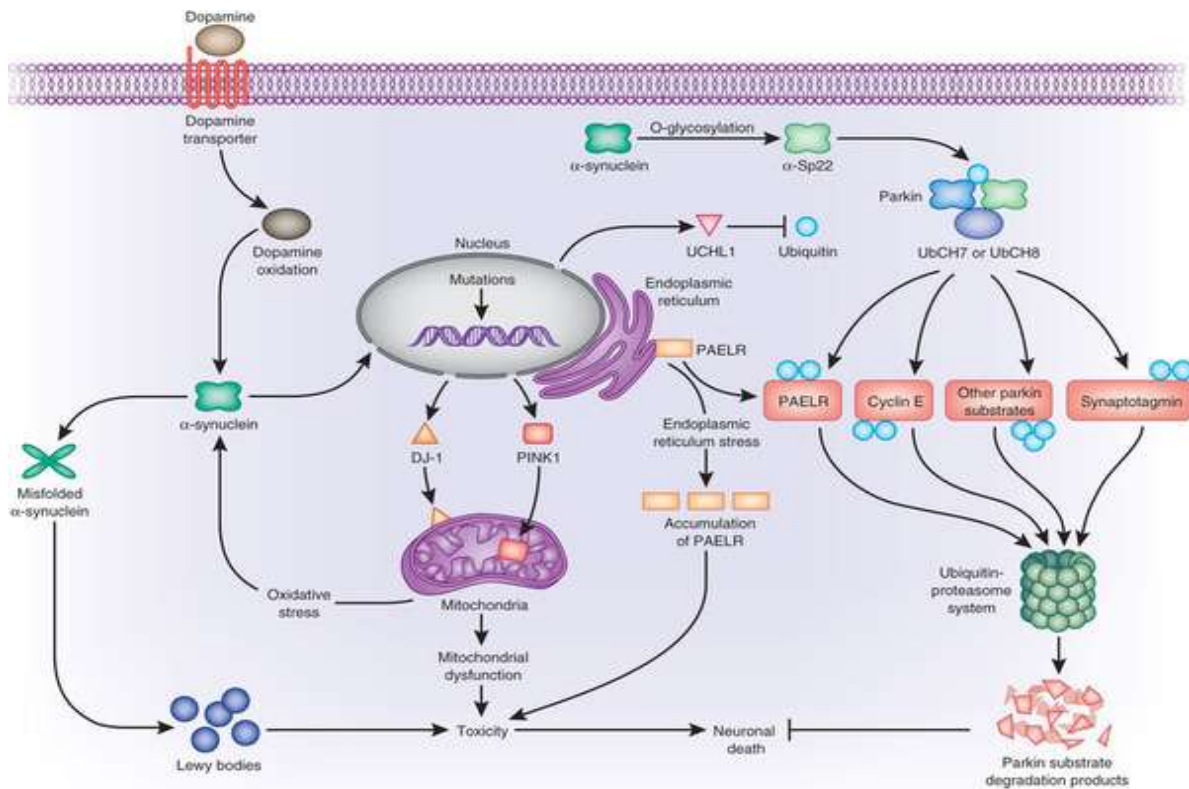


Figura 2: Esquema representativo dos mecanismos etiopatogênicos e interações das células dopaminérgicas na substância nigra, característicos da doença de Parkinson. Abreviaturas: α-Sp22 – “22kilodalton glycosylated form of α-synuclein”; PAELR – “parkin-associated endothelin receptor-like receptor”; PINK-1 – “PTEN – induced putative kinase 1” UbCH7 - “ubiquitin-conjugating enzyme 7”; UbCH8 – “ubiquitin-conjugating enzyme 8”; UCHL1 – “ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1” (adaptado de <http://www.nature.com/nm/journal/v16/n6/full/nm.2165.html>)

i. Agregação Proteica Anormal

Na maioria dos casos o processo de patogénese começa com o início da deposição da α -sinucleína nos neurónios dopaminérgicos que dará origem a inclusões citoplasmáticas eosinofílicas conhecidas como corpos de Lewy (Figura 3) (Ruiperez *et al.*, 2010). A α -sinucleína é uma pequena proteína lipofílica com elevada expressão no SNC. Os corpos de Lewy são compostos não só por esta proteína mas também por parkina, ubiquitina e neurofilamentos (Spillantini *et al.*, 1997).

A acumulação desta proteína em corpos de Lewy pode ser justificada pela não atuação do sistema ubiquitina-proteossoma, responsável pela degradação proteica. No SNC a ubiquitinação e, conseqüentemente, a degradação da α -sinucleína não ocorrem o que leva à sua acumulação ao longo do tempo (Ruiperez *et al.*, 2010). Este facto justifica a maior prevalência da doença na população envelhecida.

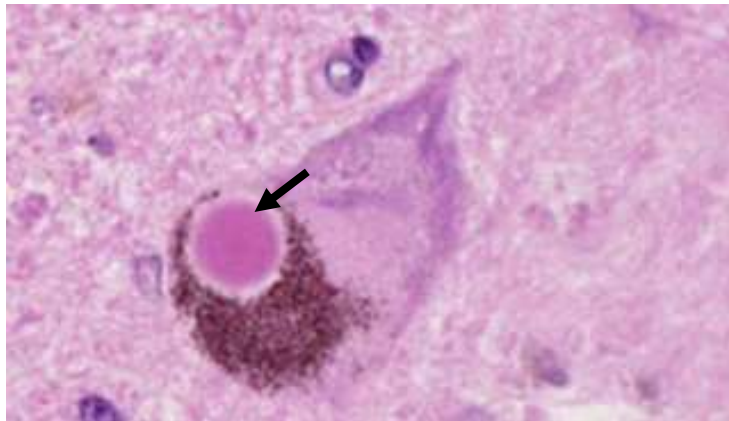


Figura 3: Aspeto citoquímico dos corpos de Lewy na Substância Nigra (adaptado de <http://www.psychiatryadvisor.com/neurocognitive-disorders/parkinsons-disease-protein-lewy-bodies-clumps-brain-dopamine/article/447827/>).

ii. Disfunções Mitocondriais

São frequentemente observadas deficiências e danos oxidativos no complexo I da cadeia transportadora de eletrões nos neurónios afetados em indivíduos com DP (Parker e Swerdlow, 1998). Alterações no complexo I (NADH-ubiquinona oxireductase) responsável pela fosforilação oxidativa e produção de trifosfato de adenosina (ATP) na cadeia respiratória mitocondrial das células da substância nigra, podem resultar no decréscimo da síntese de ATP o que provocará uma crise energética e levará à degeneração celular neuronal (Gilman *et al.*, 2003).

Para além dos danos oxidativos, várias toxinas mitocondriais bloqueiam o complexo I causando Parkinsonismo em humanos e animais de laboratório (Panov *et al.*, 2005). A toxina 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), obtida por síntese química e administrada em ratinhos, provoca a morte dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra o que permite a criação de um modelo experimental para a investigação da DP (Mizuno *et al.*, 1986, 1987 a-d, 1988 a, b). A MPTP pode induzir todos os sintomas motores da doença uma vez que inibe o complexo I mitocondrial.

As disfunções mitocondriais podem também dever-se à ação direta ou indireta de genes associados à forma familiar da DP.

O gene codificante da α -sinucleína contém uma sequência terminal com alvo mitocondrial (Devi *et al.*, 2008). A acidificação do citosol ou uma super-expressão da α -sinucleína podem levar a que esta proteína se acumule na mitocôndria (Cole *et al.*, 2008; Shavali *et al.*, 2008).

O gene *Parkina*, quando mutado, leva a deficiência mitocondrial e à diminuição da sua resistência ao stress oxidativo (Greene *et al.*, 2003; Palacino *et al.*, 2004; Pesah *et al.*, 2004). A proteína codificada por este gene está envolvida em processos de autofagia de mitocôndrias disfuncionais. Posto isto, uma mutação neste gene poderá levar à acumulação de mitocôndrias deficientes (Narendra *et al.*, 2008).

Mutações no gene *LRRK2* são a causa mais comum de DP com origem familiar ou de aparecimento esporádico (Gandhi *et al.*, 2008). Curiosamente, aproximadamente 10% da quantidade total da proteína codificada pelo gene *LRRK2* está localizada na membrana externa mitocondrial (Biskup *et al.*, 2006; West *et al.*, 2005).

A presença de mutações no gene *PINK1* mitocondrial, identificada em várias famílias com hereditariedade recessiva da DP, fornece as evidências mais convincentes do papel das disfunções mitocondriais para o desenvolvimento desta doença. Ratinhos com este gene deficiente apresentaram dificuldades na produção e libertação de dopamina (Kitada *et al.*, 2007), respiração mitocondrial alterada e sensibilidade aumentada para o stress oxidativo (Gautier *et al.*, 2008). A sobre-expressão do gene ou a perda de função da

proteína PINK1 provoca atividade antiapoptótica (Lin e Kang, 2008; Petit *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos em *Drosophila* e células HeLa (células imortais de linhagem cancerígena) indicam que o gene *PINK1* mutante leva a alterações morfológicas das mitocôndrias (Clark *et al.*, 2006; Exner *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006; Poole *et al.*, 2005).

Evidências de que o gene *PINK1* interage a nível genético com a maquinaria mitocondrial de fissão ou fusão suportou a hipótese de que este mesmo gene afeta várias funções mitocondriais por interferir com a dinâmica mitocondrial (Deng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Na figura 4 estão esquematizados os principais mecanismos que provocam stress oxidativo e a influência dos genes relacionados com a DP no processo.

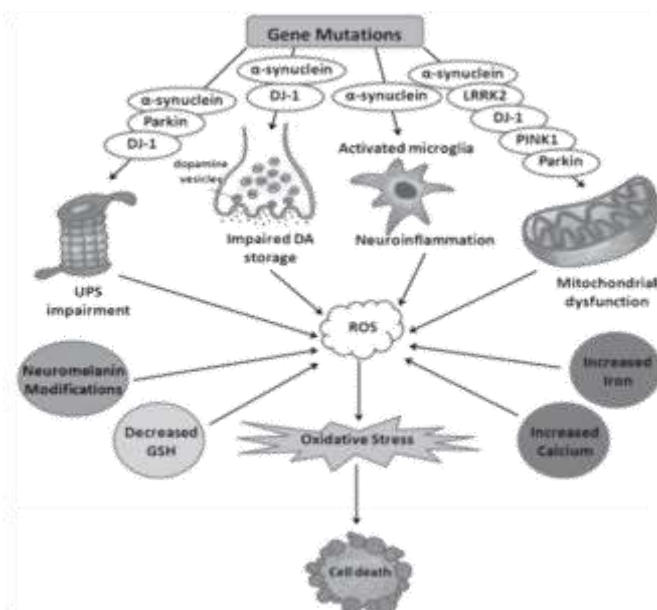


Figura 4: Mecanismos que levam ao stress oxidativo na DP e a influência dos produtos dos genes envolvidos no processo de aparecimento da doença com este fenómeno. Abreviaturas: DA=dopamina; ROS=espécies reativas de oxigênio; UPS=sistema ubiquitina-proteossoma; GSH=glutationa (adaptado de <http://content.iospress.com/download/journal-of-parkinsons-disease/jpd130230?id=journal-of-parkinsons-disease%2Fjpd130230>).

iii. Stress Oxidativo

A teoria do stress oxidativo surgiu após análise de tecidos cerebrais *post-mortem* de indivíduos portadores da DP onde se verificava a perda de coloração da substância nigra, apresentando-se esta com uma tonalidade empalidecida (Ferro e Pimentel, 2006).

A dopamina é uma molécula instável que sofre auto-oxidação dando origem a quinonas de dopamina e radicais livres. Esta reação é catalisada por metais, oxigénio ou enzimas como a tirosinase (Munoz *et al.*, 2012). Outras enzimas, como a MAO e a catecol O-metil transferase (COMT) também estão envolvidas no metabolismo da dopamina. As enzimas MAO-A e MAO-B, localizadas na membrana externa da mitocôndria, degradam o excesso de dopamina no citosol catalisando a sua desaminação oxidativa (Jenner e Langston, 2011). Em condições normais os níveis de dopamina são regulados pelo metabolismo oxidativo da MAO-A, localizada principalmente nos neurónios catecolaminérgicos (Riederer *et al.*, 1987).

No entanto, com a degeneração neuronal que tem lugar no envelhecimento e na DP, ocorre um aumento da MAO-B, localizada nas células gliais, tornando-se na principal enzima a metabolizar a dopamina (Saura *et al.*, 1997; Youdim *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 1997) que é recebida pelos astrócitos por mecanismos dependentes e independentes do sódio (Inazu *et al.*, 1999; Semenoff e Kimelberg; 1985; Kimelberg e Katz, 1986).

Os produtos do metabolismo da dopamina catalisado pela MAO-B são 3,4-dihidroxi-fenil-acetaldeído, uma molécula de amónio e H₂O₂. Este último é altamente permeável, entrando nos neurónios dopaminérgicos vizinhos onde pode reagir com Fe²⁺ para formar o radical hidroxilo (Nagatsu e Sawada, 2006; Kumar e Andersen, 2004).

A indução da enzima MAO-B nos astrócitos de ratinhos transgénicos adultos leva à perda seletiva e progressiva dos neurónios dopaminérgicos (Mallajosyula *et al.*, 2008). Os produtos da oxidação da dopamina, as quinonas de dopamina, podem também contribuir para a neurodegeneração (Hastings, 2009). Estas quinonas podem ciclizar formando aminocromo, que é altamente reativo e leva à formação de anião superóxido e à depleção do NADPH celular.

Os aminocromos podem combinar-se com proteínas como a α -sinucleína (Norris *et al.*, 2005) e são precursores da neuromelanina, um pigmento cerebral que pode contribuir para a neurodegeneração induzindo neuroinflamação (Zecca *et al.*, 2008).

O transporte e armazenamento de dopamina também pode contribuir para o aumento da produção de ROS e para a consequente disfunção celular. Normalmente a dopamina é captada em vesículas de armazenamento através de transporte ativo que requer o transportador monoamina 2 (VMAT2), preparando a libertação do neurotransmissor após despolarização. Portanto, VMAT2 permite manter os níveis de dopamina controlados, impedindo a formação de ROS. Deste modo, neurónios dopaminérgicos com bloqueios genéticos ou farmacológicos do VMAT2 são mais suscetíveis a agentes tóxicos (Uhl *et al.*, 2000).

A disfunção mitocondrial, provocada pelos diferentes fatores acima citados, é também uma fonte de stress oxidativo.

iv. Neuroinflamação

A perda neuronal na DP está também relacionada com a neuroinflamação crónica. Este processo é controlado pela microglia, pelas células imunológicas inatas e pelas principais células imunes do SNC.

Foram registadas reações da microglia no Sistema Nervoso (SN) de doentes com DP com origem esporádica (McGeer *et al.*, 1998) e familiar (Yamada *et al.*, 1993). A microglia é ativada em resposta a lesões ou toxicidade e, quando ativada, origina compostos oxidantes como o óxido nítrico e o anião superóxido que podem contribuir para o stress oxidativo. Se a microglia for sobre-ativada ou se esta ativação for crónica vai gerar uma situação de neuroinflamação exagerada e respostas neuroinflamatórias descontroladas (Qian *et al.*, 2010). Estes processos acabarão por gerar um ciclo de neurodegeneração.

v. Excitotoxicidade

Esta teoria defende que o aumento da atividade de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, provocado pela escassez de dopamina, pode aumentar a quantidade de ião cálcio dentro da célula o que pode desencadear processos bioquímicos que culminam na morte celular (Gilman *et al.*, 2003).

II. Genética da doença de Parkinson

A DP foi durante muito tempo encarada como unicamente esporádica, sem se considerar qualquer contribuição da genética para a sua complexa patogénese. No entanto, em 1997, Polymeropoulos *et al.* identificaram mutações responsáveis pelo aparecimento da doença, no gene codificante da α -sinucleína (SNCA) (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Esta descoberta mudou para sempre a visão da comunidade científica em relação à DP e deu início a uma era de investigação da genética da doença.

Pouco tempo após esta descoberta foram associados à DP novos genes, localizados em regiões cromossómicas diferentes do anteriormente identificado o que levou à percepção de que a DP é uma doença poligénica. Desde então foram identificados vários outros genes implicados no aparecimento da DP bem como várias formas monogénicas da doença e numerosos fatores de risco genético.

Mutações altamente penetrantes produzem formas monogénicas raras da doença em genes como SNCA, Parkina, DJ-1, PINK1, LRRK2 e VPS35. Verificou-se também que penetrâncias incompletas nos genes LRRK2 e GBA são fortes fatores de risco para a DP. Adicionalmente, mais de vinte variantes genéticas comuns foram associadas à modulação do risco para a DP.

A investigação de formas Mendelianas da doença forneceu informações preciosas no que respeita à compreensão da fisiopatologia das formas idiopáticas mais comuns da doença. Apesar destas importantes descobertas, ainda não se sabe exatamente o processo que desencadeia o aparecimento de alelos de risco.

2.1. Formas Monogénicas

A compreensão das formas monogénicas da DP fornece uma visão mais alargada em relação à arquitetura genética da doença. Esta possibilidade de conhecimento mais aprofundado é aliciante uma vez que, aparentemente, existe uma correlação entre os genes com mutações que causam a DP e aqueles que possuem variantes de risco (Tabela 5).

Tabela 5: Genes envolvidos nas formas monogénicas da doença de Parkinson e *loci* de risco genético (adaptado de Hernandez *et al.*, 2016; Kalinderi *et al.*, 2016).

Denominação do Locus	Gene	Locus	Proteína sintetizada	Doença	Tipo de hereditariedade
<i>Park1</i>	<i>SNCA</i>	4q21-22	α -sinucleína	DP de AP	AD
<i>Park2</i>	<i>Parkina</i>	6q25.2-q27	Parkina	DP de AP	AR
<i>Park3</i>	Desconhecido	2p13	Desconhecido	DP clássica	AD
<i>Park4</i>	<i>SNCA</i>	4q21-q23	α -sinucleína	DP de AP	AD
<i>Park5</i>	<i>UCHL1</i>	4p13	Terminal C da ubiquitina hidrolase	DP clássica	AD
<i>Park6</i>	<i>PINK1</i>	1q35-p36	Quinase PTEN-induzida 1	DP de AP	AR
<i>Park7</i>	<i>DJ-1</i>	1p36	DJ-1	DP de AP	AR
<i>Park8</i>	<i>LRRK2</i>	12q12	Dardarina	DP clássica	AD
<i>Park9</i>	<i>ATP13A2</i>	1p36	ATPase lisossomal tipo 5	DP atípica com demência, spasticity e gaze palsy supranuclear	AR
<i>Park10</i>	Desconhecido	1p32	Desconhecido	DP clássica	<i>Locus de risco</i>
<i>Park11</i>	Desconhecido	2q36-37	Proteína GYF 2; GRB	DP de AT	AD
<i>Park12</i>	Desconhecido	Xq21-q25	Desconhecido	DP clássica	Ligada ao cromossoma X
<i>Park13</i>	<i>HTRA2</i>	2p12	Peptidase serina HTRA 2	DP clássica	AD
<i>Park14</i>	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	Fosforilase A2	Distonia-parkinsonismo de AP	AR
<i>Park15</i>	<i>FBX07</i>	22q12-q13	Proteína 7 da “F-box”	Síndrome de parkinsonismo piramidal de AP	AR
<i>Park16</i>	Desconhecido	1q32	Desconhecido	DP clássica	<i>Locus de risco</i>
<i>Park17</i>	<i>VPS35</i>	16q11.2	Proteína vacuolar 35	DP clássica	AD
<i>Park18</i>	<i>EIF4G1</i>	3q27.1	Fator 4 y-1 de iniciação da tradução eucariótica	DP clássica	AD
<i>Park19</i>	<i>DNAJC16</i>	1p31.3	DNAJ/HSP40	DP atípica, juvenil	AR
<i>Park20</i>	<i>SYNJ1</i>	21q22.1		DP atípica, juvenil	AR
<i>Park21</i>	<i>DNAJC13</i>	3q22.1		DP de AT	AD
-----	<i>SNCA</i>		α -sinucleína		<i>Locus de risco</i>
-----	<i>LRRK2</i>		LRRK2		<i>Locus de risco</i>
-----	<i>GBA</i>		Glucocerebrosidase		<i>Locus de risco</i>

Legenda: Autossômica Recessiva (AR); Autossômica Dominante (AD); Doença de Parkinson (DP); Aparcimento Precoce (AP); Aparcimento Tardio (AT)

Mutações em três genes, SNCA (PARK1; codifica a α -sinucleína), *LRRK2* (PARK8; codifica a dardarina) e VPS35 (codifica a proteína vacuolar 35) estão associadas a formas autossômicas dominantes da DP (Hernandez *et al.*, 2016). Mutações em seis genes, PINK1 (PARK6; quinase PTEN-induzida 1), DJ-1 (PARK7), Parkina (PARK2), ATP13A2 (PARK9), FBXO7 e PLA2G6 estão associadas a formas autossômicas recessivas da doença (Hernandez *et al.*, 2016).

As formas monogênicas conhecidas da DP explicam apenas 30% dos casos familiares e 3-5% dos casos esporádicos da doença (Kumar *et al.*, 2011).

2.1.1. Formas Autossômicas Dominantes da doença de Parkinson

i. α -sinucleína (SNCA)

Como se referiu acima, o gene que codifica para a α -sinucleína (SNCA) foi o primeiro a ser associado à DP. Esta descoberta data de 1996 e foi através da técnica de mapeamento de ligação que se localizou este gene, no braço longo do cromossoma 4 (4q21) (Polymeropoulos *et al.*, 1996).

Um ano após esta descoberta, identificou-se a mutação *missense* A53T no gene codificante da proteína α -sinucleína de duas famílias, uma italiana e outra grega, com formas autossômicas dominantes da doença (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Esta mutação foi, mais tarde, detetada em várias outras famílias com o mesmo *halótipo*, o que fortaleceu a possibilidade da existência de um ancestral mediterrânico comum (Papadimitriou, 1999; Athanassiadou, 1999; Bostantjopoulou, 2001).

Pouco tempo após a descoberta de mutações no gene SNCA, causadoras de formas familiares raras da DP, Spillantini *et al.* descobriram que a α -sinucleína era o principal constituinte dos corpos de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997). Esta descoberta contribuiu grandemente para a percepção dos processos que ocorriam a nível cerebral em pacientes com DP esporádica e assumiu-se como um elo de ligação entre a etiologia e a patogénese destas formas da doença com formas familiares raras da mesma.

Apenas quatro outras mutações foram descobertas no gene da α -sinucleína em famílias com hereditariedade dominante para a DP: a A30P (Kruger *et al.*, 1998), E46K (Zarranz *et al.*, 2004), G51D (Kiely *et al.*, 2013; Lesage *et al.*, 2013) e H50Q (Proukakis *et al.*, 2013; Appel-Cresswell *et al.*, 2013). As duas últimas foram identificadas recentemente. Pacientes com este tipo de mutações na α -sinucleína apresentam um espectro clínico amplo que vai desde manifestações clássicas da DP até sintomatologia mais atípica que inclui não só parkinsonismo como também mioclonia, disfunção autonómica severa e demência.

A mutação A53T é responsável pela instalação da doença em idades menos avançadas, pela sua rápida progressão e pela prevalência de sintomas como demência, distúrbios psiquiátricos e autonómicos (Kruger *et al.*, 1998).

A mutação A30P parece estar associada à instalação tardia da doença e a um fenótipo atenuado enquanto a mutação E46K está associada a um fenótipo semelhante ao dos pacientes com Demência de Corpos de Lewy (Zarranz *et al.*, 2004).

No que diz respeito às duas mutações do gene da α -sinucleína mais recentemente descritas, a G51D é apresentada como co-segregador de doenças em famílias francesas, britânicas e nipónicas (Kiely *et al.*, 2013; Lesage *et al.*, 2013; Tokutake, 2014). Esta mutação não foi detetada no grupo controlo e prevê-se que seja do tipo funcional. Estes dados suportam a crença de que se trata de uma mutação patogénica que está associada a um fenótipo clínico semelhante ao produzido pela mutação A53T. Em relação à mutação H50Q, detetada num paciente com uma história familiar de parkinsonismo e demência e noutro com DP de aparecimento esporádico tardio, à semelhança do que acontece com a mutação G51D, também não foi detetada no grupo controlo (Proukakis *et al.*, 2013; Appel-Cresswell *et al.*, 2013). Contudo, assumir que esta mutação é patogénica não é para já aconselhado uma vez que os estudos de co-segregação não estão ainda disponíveis e os estudos funcionais apresentam limitações.

Duplicações e triplicações da região codificante do gene SNCA também foram associadas a casos familiares de DP (Farrer *et al.*, 2004; Chartier-Harlin *et al.*, 2004). Foi observada uma relação direta entre o número de cópias do gene da α -sinucleína e a idade de instalação e progressão da doença e severidade do fenótipo. Especificamente, a

triplicação genómica da α -sinucleína foi associada à instalação precoce da doença e a uma evidente progressão acelerada da mesma, caracterizada por demência e longevidade diminuída. Pacientes com duplicações deste gene apresentam um fenótipo clínico atenuado (Farrer *et al.*, 2004) e estas são tidas como a causa mais comum da doença familiar e de casos esporádicos (Troiano *et al.*, 2008; Uchiyama *et al.*, 2008).

Um estudo recente revelou que pacientes com quatro cópias da α -sinucleína (originadas devido à duplicação de ambos os alelos ou a uma única triplicação do alelo associada a um alelo normal) apresentam, segundo a *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*, uma progressão mais acelerada da doença em comparação com aqueles que possuem apenas três cópias da α -sinucleína (Ferese, 2015). Por conseguinte, o aumento dos níveis da α -sinucleína parece diminuir a idade de instalação da DP e aumentar a sua severidade.

Mutações na α -sinucleína são raras e as multiplicações do gene foram detetadas apenas em 1-2% das famílias com hereditariedade autossómica dominante da DP.

Apesar de todo o avanço que se tem registado no entendimento da genética da DP, as funções normais da α -sinucleína ainda não são bem conhecidas. A α -sinucleína é principalmente encontrada no citosol onde está ligada às jangadas lipídicas (microdomínios da membrana plasmática que possuem uma elevada concentração de colesterol e de esfingolípidos e que concentram recetores específicos e moléculas envolvidas na sinalização celular), numa interação que é necessária pela sua associação aos processos de sinapse (Fortin *et al.*, 2004). Esta proteína interage com membros das famílias proteicas Rab e SNARE, o que aponta para o seu envolvimento no tráfego vesicular (Gitler *et al.*, 2008; Burre *et al.*, 2010; Thayanidhi *et al.*, 2010). Outra investigação que reforça a intervenção da α -sinucleína no processo de sinapse foi desenvolvida por Nemani *et al.* e mostra que a sobre-expressão do gene SNCA humano em ratinhos inibe a transmissão sináptica (Nemani *et al.*, 2010). Estes investigadores também observaram inibição sináptica aquando da sobre-expressão das mutações A53T e E46K mas não da A30P (Nemani *et al.*, 2010).

Fizeram-se experiências usando mutações humanas no gene SNCA em ratinhos e percebeu-se que as mutações que favorecem a produção de oligómeros com baixo peso

molecular, que se ligam às membranas (E35K e E57K), causam um maior número de mortes dos neurónios dopaminérgicos na substância nigra do que aquelas que estimulam a rápida formação de fibrilas (A30P e A53T) (Winner *et al.*, 2011).

Este mecanismo explicativo é ainda controverso mas demonstra a importância do gene SNCA no trânsito intracelular, interação membranar e atividade sináptica. No entanto, mais trabalho e investigação são necessários para que se perceba completamente os mecanismos por detrás da doença e da função normal deste gene.

ii. LRRK2

A descoberta, em 2004, de mutações no gene LRRK2 em famílias com hereditariedade autossómica dominante para a DP foi um ponto de viragem no campo da genética desta doença. Estas mutações revelaram-se como a primeira alteração genética não só frequente como encontrada quer em casos esporádicos quer familiares da doença, o que alimentou a teoria da existência de uma via comum implicada na patogénese de ambas as formas da doença (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004).

Atualmente, já estão identificadas mais de cem mutações no gene LRRK2, ligadas às formas autossómicas dominantes da DP, representando cerca de 10% dos casos familiares e uma fração significativa dos casos esporádicos da doença (Rubio *et al.*, 2012).

Apesar de estarem já identificadas várias mutações no gene LRRK2, apenas se conhece a patogenicidade de sete dessas mutações (R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S, I2020T, N1437H) (Healy *et al.*, 2008; Aasly *et al.*, 2010; Lorenzo-Betancor *et al.*, 2012). Estas modificações patogénicas estão agrupadas em exões que codificam o grupo Ras de proteínas complexas, o terminal C destas proteínas ou o seu domínio cinase. Os dados atuais indicam que a prevalência das mutações do gene LRRK2 variam consideravelmente entre populações (Gorostidi *et al.*, 2009; Toft *et al.*, 2007).

A mutação G2019S, que leva à substituição de um aminoácido, é responsável por aproximadamente 40% dos casos familiares e esporádicos da DP em indivíduos árabes que habitam o Norte de África (Lesage *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2005),

aproximadamente 30% das formas familiares da doença nas populações judias proveniente da Europa Central e Oriental (Ozelius *et al.*, 2006), cerca de 6% dos casos familiares na Europa (Di Fonzo *et al.*, 2005; Kachergus *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2005) e cerca de 3% dos casos esporádicos na Europa e América do Norte (Gilks *et al.*, 2005). É uma mutação muito rara nas populações Asiáticas. Acredita-se que esta mutação foi transmitida por um ancestral comum, originário do Norte de África e difundida devido à emigração judaica (Brice, 2005; Farrer *et al.*, 2005; Ozelius *et al.*, 2006; Healy *et al.*, 2008). Além disso, a penetrância desta mutação parece ser dependente da idade, uma vez que este parâmetro apresenta valores de 28% para idades de 59 anos, 51% aos 69 anos e aumenta até aos 74% aos 79 anos (Healy *et al.*, 2008).

As restantes seis mutações patogénicas são bem menos frequentes, no entanto, a mutação R1441G é comum no país Basco com uma prevalência de 15% nos pacientes com DP desta região (Mata *et al.*, 2005; Hatano *et al.*, 2014). A idade de instalação da doença é variável, oscilando entre a quarta e a nona década de vida e a apresentação clínica é comparável com a DP esporádica típica.

Os achados patológicos em pacientes com mutações no gene LRRK2 são diversos e compreendem patologia dos corpos de Lewy e taupatia com emaranhados neurofibrilares (Zimprich *et al.*, 2004). Esta diversidade de sintomatologia sugere que este gene está envolvido em vários processos celulares e poderá ser um componente central de várias vias de sinalização, crucial para o correto funcionamento dos neurónios.

Apesar de todos os dados disponíveis nos dias de hoje, os mecanismos patogénicos, liderados por mutações no gene LRRK2 que levam à DP, continuam a ser investigados uma vez que a proteína LRRK2 é complexa. Esta proteína possui dois domínios enzimáticos e muitos domínios de interação e por essa razão, mutações que a afetem podem afetar diversas funções proteicas, o que dificulta o trabalho dos investigadores.

iii. VPS35

A recente introdução de métodos de sequenciação de alto rendimento revolucionou a pesquisa do genoma humano. A sequenciação do exoma total permitiu a deteção das

proteínas que são codificadas por regiões específicas do genoma. O exoma, que não é mais do que a fração do genoma codificada pelos genes, representa cerca de 1% do genoma humano mas contribuiu para a detecção de aproximadamente 85% das mutações identificadas em doenças com hereditariedade Mendeliana.

Este tipo de análise genética facilita a rápida identificação de mutações patogénicas e é ideal para o estudo de famílias em que só se consegue recolher um número limitado de amostras. Foi o recurso a este tipo de métodos que permitiu a recente descoberta da mutação D620N no gene da proteína vacuolar 35 (VPS35) como sendo a causa da DP de instalação tardia e com hereditariedade autossómica dominante em dois estudos independentes na Suíça e Austrália (Zimprich *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

O gene VPS35 está presente no cromossoma 16 (16q11.2) e codifica o homólogo da proteína vacuolar 35 que é uma subunidade do complexo “Retromer” que está envolvido no transporte endossomal-lisossomal. A frequência da mutação D620N é baixa e oscila entre valores de 0,1% a 1% dos casos familiares com hereditariedade autossómica dominante da DP (Vilariño-Guell *et al.*, 2011).

De uma forma geral, a distribuição das mutações do gene VPS35 varia consoante a etnia. A mutação D620N é mais frequente em judeus iemenitas (1,67%), em França (1,2%) e na Tunísia (0,5%), no entanto, esta mutação não foi encontrada em canadianos, noruegueses, polacos, irlandeses, taiwaneses, alemães, chineses, belgas da região de Flandres, sul-africanos, indianos e gregos (Kalinderi *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2013). Além disso, e embora os dados atualmente disponíveis sejam limitados, o impacto da mutação D620N na DP parece ser significativo em pacientes com uma história familiar positiva e com boa resposta ao tratamento com levodopa (Deng *et al.*, 2013).

Mutações no gene VPS35 raramente causam DP e apenas contribuem para 1% da forma familiar e 0,2% da forma esporádica (Zimprich *et al.*, 2011; Nuytemans *et al.*, 2013). A idade média de instalação da doença ronda os 51 anos, com taxas elevadas de bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural numa percentagem de aproximadamente 60%.

Atualmente estão a desenvolver-se estudos e procura-se verificar se as mutações na proteína codificada pelo gene VPS35 alteram o tráfego da catepsina D, uma proteína implicada na degradação da α -sinucleína (Cullen *et al.*, 2009; Follett *et al.*, 2014). Espera-se igualmente que estudos genéticos e funcionais clarifiquem os mecanismos subjacentes à DP associada ao gene VPS35.

2.1.2. Formas autossómicas recessivas da doença de Parkinson

Foram identificadas mutações em seis genes que são causadoras de DP autossómica recessiva: PARK2 (codifica a parkina), PINK1 (PARK6; Quinase PTEN-induzida 1), DJ-1 (PARK7), ATP13A2 (PARK9; ATPase tipo 13A2), PLA2G6 (PARK14; fosofrilase A2, grupo VI) e FBX07 (PARK15; Proteína 7 da “F-box”) (Hernandez *et al.*, 2016). Mutações nestes genes causam DP de instalação precoce num pequeno número de pacientes.

i. Parkina

Um ano após a descoberta das mutações no gene codificante da α -sinucleína, foram descobertas mutações noutra gene, o gene Parkina. Estas novas mutações foram encontradas numa família Japonesa com parkinsonismo juvenil de transmissão autossómica recessiva (PJAR) (Kitada *et al.*, 1998).

As mutações do gene Parkina foram igualmente encontradas em pacientes de diferentes etnias e foram consideradas o principal fator predisponente para o PJAR familiar (Schulte e Gasser, 2011). Estas mutações são não só a causa primária de PJAR como também de parkinsonismo de instalação precoce e esta afirmação é confirmada pelos dados científicos que revelam que 50% dos pacientes com este tipo de parkinsonismo têm menos de 25 anos e 3-7% têm entre 30 a 45 anos (Schulte e Gasser, 2011). Estas mutações estão presentes em 77% dos casos esporádicos da DP que se instala antes dos 20 anos (Lucking *et al.*, 2000).

Até aos dias de hoje foram identificadas mais de cem mutações neste gene, incluindo deleções, inserções, duplicações, triplicações e mutações pontuais. A maioria das

mutações do gene Parkina (54%) são grandes deleções ou duplicações de um ou mais exões, um terço são alterações simples de nucleótidos e 13% são deleções menores (Grunewald *et al.*, 2012).

Pacientes com mutações no gene Parkina, à exceção dos de idades mais jovens, apresentam sintomas clínicos indistinguíveis dos da DP idiopática, com boa resposta ao tratamento com levodopa mas com flutuações motoras mais precoces. A patologia da doença associada a mutações neste gene consiste numa perda significativa de neurónios da substância nigra, patologias ocasionais nas proteínas Tau e, na maioria dos casos, uma marcada ausência *post-mortem* de corpos de Lewy (van Warrenburg *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2003). A explicação encontrada para a ausência de corpos de Lewy em análises *post-mortem* é o facto de a DP associada a mutações da Parkina se instalar em idades muito jovens (Doherty e Hardy, 2013).

O gene Parkina está localizado no cromossoma 6 (6q25.2-27), sendo o segundo maior gene do genoma humano e codifica a ubiquitina E3 ligase, formada por um domínio “ubiquitin-like” (Ubl) e por dois domínios de ligação (Scuderi *et al.*, 2014). A enzima ubiquitina E3 ligase é sobretudo expressa no sistema nervoso, participando no sistema de degradação do proteossoma (Shimura *et al.*, 2000). O efeito de perda de função provocado por mutações no gene Parkina resulta na inativação do seu papel como ligase E3, na falha da ubiquitinação das proteínas alvo e, portanto, numa acumulação tóxica de proteínas que já não são degradadas pela via ubiquitina/proteossoma dependente da Parkina (Shimura *et al.*, 2000). A formação destes agregados tóxicos parece ter um papel crucial na patogénese da DP nomeadamente no que diz respeito à degradação dos neurónios da substância nigra. Outras evidências suportam a importância do papel da ligase E3 na DP e revelam que mutações no gene Parkina podem levar a dano mitocondrial (Palacino *et al.*, 2004).

Foi proposto um modelo em que se considera que o gene Parkina interage com o gene PINK1, também associado à DP. Num estudo recente, envolvendo a cinase PINK1, descobriu-se que esta estrutura é responsável pela fosforilação da parkina e ubiquitina, através do recrutamento da proteína parkina para mitocôndrias despolarizadas, ativando

a sua atividade de ligase E3 e promovendo a eliminação de mitocôndrias lesadas, através do processo de mitofagia (Koyano *et al.*, 2014).

Outro modelo proposto para justificar a ativação da Parkina foi o da alternância Ubl/ubiquitina. De acordo com este modelo, quer a fosforilação da ligação fosfo-ubiquitina (pUb) quer do domínio Ubl são passos fundamentais para a ativação da Parkina nas mitocôndrias. Após a fosforilação inicial, realizada pela PINK1, da ubiquitina presente nas proteínas da membrana mitocondrial, a Parkina é recrutada e o seu domínio Ubl dissocia-se. O domínio Ubl recentemente libertado é, por sua vez, fosforilado pela PINK1 o que resulta na translocação da Parkina para a superfície da mitocôndria danificada. O facto da Parkina ter perdido o seu domínio Ubl aumenta a sua afinidade para o domínio pUb e a sua atividade de ubiquitina ligase para as proteínas presentes na membrana mitocondrial que sofrerão ubiquitinação e, graças a esse processo, serão sinalizadas, e posteriormente eliminadas (Sauvé *et al.*, 2015; Narendra *et al.* 2008, 2010).

ii. PINK1

Em 2004, o locus Park6 foi mapeado no cromossoma 1p35-p36 de uma família italiana com DP de transmissão autossómica recessiva (Valente e Abou-Sleiman, 2004). Uma mutação recessiva *missense* (G309D) e uma mutação recessiva *nonsense* (W437X) foram detetadas em famílias espanholas e italianas com DP (Valente e Abou-Sleiman, 2004). Após estas descobertas, várias mutações *missense*, *nonsense* e *frameshift* bem como deleções de múltiplos exões foram associadas ao gene PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) de famílias de diferentes etnias (Valente e Abou-Sleiman, 2004; Bonifati *et al.*, 2005; Ibanez *et al.*, 2006).

Mutações no gene PINK1 são tidas como a segunda causa mais comum de DP com hereditariedade autossómica recessiva de instalação precoce (Bonifati *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Marongiu *et al.*, 2007) e foram detetadas em 2-4% dos casos de pacientes caucasianos com DP de instalação precoce e 4-9% dos pacientes asiáticos com a mesma forma da doença (Schulte e Gasser, 2011).

Os pacientes que carregam mutações no gene PINK1 sofrem de DP de instalação precoce, de progressão lenta e apresentam características atípicas como distonia, sinais piramidais e co-morbilidades psiquiátricas como ansiedade e depressão (Bonifati *et al.*, 2005). Relatos patológicos iniciais demonstram que estes pacientes padecem da doença dos corpos de Lewy típica (Samaranch *et al.*, 2010).

O gene PINK1 codifica uma cinase que está localizada na mitocôndria (Valente *et al.*, 2004). Como anteriormente referido, este gene é responsável pelo processo de fosforilação da parkina, sendo esta responsável pela regulação da mitofagia de mitocôndrias lesadas (Narendra *et al.*, 2010; Kane *et al.*, 2014).

Demonstrou-se também que a sobre-expressão da forma selvagem do gene PINK1, mas não da mutação G309D, é capaz de evitar a morte por apoptose induzida pelo stress, mediada pelo processo de mitofagia (Valente *et al.*, 2004). A convergência dos dois genes (PINK1 e Parkina) no processo de mitofagia confirma a sua importância para o bom funcionamento neuronal e pode ser um excelente alvo terapêutico em pacientes com DP de instalação precoce.

iii. DJ-1

O gene DJ-1 também foi reconhecido como causador de parkinsonismo juvenil, de transmissão autossômica recessiva (PJAR). Mutações neste gene são responsáveis por 1-2% dos casos de PJAR (Bonifati *et al.*, 2003).

Pensa-se que este gene é um fator protetor contra o stress oxidativo e contra o dano mitocondrial, participando, possivelmente, numa via comum com as proteínas parkina e PINK1. Num estudo de Requejo-Aguilar *et al.*, o gene DJ-1 foi associado à regulação do metabolismo celular e à proliferação através do PINK1 (Requejo-Aguilar *et al.*, 2015). Na verdade, este gene foi indicado como um regulador transcricional positivo do gene PINK1 através da sua ligação ao seu promotor, provavelmente interagindo com a proteína “forkhead box O3a” (Foxo3a). Este estudo forneceu uma nova perspectiva acerca da patogênese da DP mas, apesar disso, ainda não se percebeu exatamente qual o papel do gene DJ-1 na modulação da via PINK–Parkina (Requejo-Aguilar *et al.*, 2015).

Importa ainda referir que o aumento da glicólise e a perda da função do gene DJ-1 contribuem para o aumento do stress oxidativo e para a neurodegeneração dopaminérgica, característicos da DP.

iv. ATP13A2, PLA2G6 e FBXO7

Formas mais raras e atípicas da DP autossómica recessiva são causadas por mutações em três genes: ATP13A2 (codifica a ATPase tipo 13A2), PLA2G6 (codifica a fosfolipase A2, grupo VI) e FBXO7 (codifica a proteína 7 da F-box).

Mutações no gene ATP13A2 causam a rara, de instalação juvenil, síndrome de Kufor-Rakeb, caracterizada pela baixa resposta ao tratamento com levodopa e por traços atípicos como distonia e paralisia supranuclear (Ramirez *et al.*, 2006; Bruggemann *et al.*, 2010). Pelo menos onze famílias com numerosas e diferentes mutações *missense*, *nonsense* e deleções neste gene foram até hoje identificadas. A severidade do fenótipo é altamente variável entre pacientes e parece estar relacionada com o tipo de mutação herdada (Park *et al.*, 2015).

Este gene codifica um membro da família das ATPases. A ATP13A2 é uma proteína multifuncional com dez domínios transmembranares que, hipoteticamente, tem um papel na dinâmica endossoma-lisossoma (Dehay *et al.*, 2012; Usenovic *et al.*, 2012), no bom funcionamento mitocondrial (Grunewald *et al.*, 2012; Gusdon *et al.*, 2012) e na proteção das células contra a toxicidade induzida por metais como o manganês (Mn^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}) (Kong *et al.*, 2014). Estes estudos também indicam que a proteína ATP13A2 está presente nos corpos de Lewy de pacientes com DP (Dehay *et al.*, 2012) e que a sobre-expressão do gene ATP13A2 impede a acumulação de α -sinucleína nos neurónios (Kong *et al.*, 2014). Mutações neste gene são uma causa muito rara de parkinsonismo mas são tidas como um elo de ligação entre a função de autofagia dos lisossomas, bom funcionamento mitocondrial e neurodegeneração.

Mutações no gene PLA2G6 causam DP autossómica recessiva associada a distonia e a uma boa resposta ao tratamento com levodopa (Doherty *et al.*, 2013). A acumulação de ferro no cérebro é característica da maioria dos indivíduos afetados (Morgan *et al.*, 2006;

Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Sina *et al.*, 2009). Estas mutações também foram associadas à neurodegeneração com acumulação de ferro a nível cerebral e à síndrome de Karak, ambas formas severas da neurodegeneração infantil (Mubaidin *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 2008). A DP associada a este gene possui hereditariedade recessiva ou dominante no caso de várias mutações *missense* (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Sina *et al.*, 2009; Yoshino *et al.*, 2010).

O gene PLA2G6 codifica uma proteína chamada fosforilase A2 do grupo VI com sete repetições ANK (ankirina), um domínio lipase e um domínio de ligação da calmodulina (Doherty *et al.*, 2013). Esta enzima hidrolisa glicerofosfolípidos para produzir ácidos gordos livres e 2-lisofosfolípidos (Balsinde e Balboa, 2005).

Estudos recentes efetuados em *Drosophila* mostraram que a exclusão de homólogos do gene PLA2G6 resulta em disfunção mitocondrial e neurodegeneração. A análise de fibroblastos de um paciente com DP associada à mutação R747W também demonstrou existência de um dano mitocondrial semelhante (Kinghorn *et al.*, 2015). Embora as mutações neste gene sejam raras, elas fazem a ligação entre um gene causador da DP com formas mais severas de neurodegeneração que merecem ser estudadas mais aprofundadamente.

A investigação levada a cabo por Shojaee e colaboradores foi a primeira a identificar mutações no gene FBXO7 (Shojaee *et al.*, 2008). Para se chegar a esta conclusão usou-se mapeamento de ligação seguido de sequenciação do referido gene numa família iraniana com síndrome parkinsoniana piramidal de instalação juvenil de transmissão autossómica recessiva (Shojaee *et al.*, 2008). Os indivíduos desta família afetados pela patologia demonstraram sofrer de paralisia espástica de instalação precoce e, mais tarde, parkinsonismo com boa resposta ao tratamento com levodopa. Indivíduos de outras duas famílias, com sintomas semelhantes, apresentaram três mutações diferentes no gene FBXO7 quer no estado homozigótico quer no heterozigótico (Di Fonzo *et al.*, 2006).

Este gene codifica a proteína 7 da F-box que interage diretamente com os genes Parkina e PINK1, quer na manutenção da saúde mitocondrial quer na mitofagia (Burchell *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Estes estudos demonstram que o gene FBXO7 ajuda na

translocação da parkina para a mitocôndria, em resposta ao stress celular. Mutações neste gene são causas raras de parkinsonismo juvenil autossômico recessivo mas, apesar da sua pouca frequência, são encontradas no estado heterozigótico de muitas populações diferentes.

Além dos genes acima descritos, vários outros genes e *loci* foram associados à forma Mendeliana da DP: PARK3 (Gasser *et al.*, 1998), PARK5 (UCHL1) (Leroy *et al.*, 1998), PARK10 (Hicks *et al.*, 2002), PARK11 (Pankratz *et al.*, 2003a), PARK12 (Pankratz *et al.*, 2003b), PARK13 (HTRA2) (Strauss *et al.*, 2005), PARK16 (Satake *et al.*, 2009), PARK18 (EIF4G1) (Chartier-Harlin *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2015) e PARK21 (DNAJC13) (Vilariño-Guell, 2012). No entanto, ou o gene responsável não foi identificado ou os resultados têm, neste momento, uma baixa replicação e a sua ligação à DP permanece incerta.

2.2. Fatores de Risco Genético na Doença de Parkinson

Durante os últimos anos, vários genes de suscetibilidade e numerosos *loci* de risco foram associados à DP. O sucesso neste campo de investigação foi conseguido graças a estudos do genoma humano mas alguns estudos não foram tão bem sucedidos. Neste momento reconhecem-se três genes como fatores de risco genético comuns para a DP: SNCA, LRRK2 e GBA.

i. α -sinucleína (SNCA)

Após a descoberta das mutações raras no gene SNCA, seguiu-se uma era de forte investigação na área da genética da DP. Kruger e colegas procuraram verificar se existia variabilidade comum no gene SNCA de forma a perceber se este gene estaria também associado ao risco de aparecimento da forma esporádica da DP (Kruger *et al.*, 1998).

Inicialmente, o estudo de Kruger indicou que o genótipo APOE, um importante fator de risco para a doença de Alzheimer de instalação tardia (Chouraki e Seshadri, 2014), interagia com um dinucleótido variável presente no gene SNCA. A combinação do alelo APOE4 e do alelo NACP 1 do promotor do polimorfismo do gene SNCA mostrou ser

significativamente diferente entre os pacientes com a forma esporádica da DP e o grupo controlo. Os pacientes com este genótipo apresentam um risco relativo 12,8 vezes mais elevado de sofrer da DP (Chouraki e Seshadri, 2014). Infelizmente, esta interação entre o gene SNCA e o genótipo APOE não apresenta replicação, no entanto, Maraganore e colegas demonstraram, mais tarde, a existência de variantes de risco para a DP entre os alelos promotores do gene SNCA (Maraganore *et al.*, 2006). Desta forma, estes investigadores demonstraram, inequivocamente, a ocorrência de uma associação entre a variabilidade genética que ocorre no *locus* SNCA e a DP (Maraganore *et al.*, 2006).

Desde então, a associação da DP ao gene SNCA tem sido altamente comprovada através de estudos de associação genética, permitindo identificar uma quantidade significativa de polimorfismos em nucleótidos e revelando mais acerca da arquitetura do risco genético deste *locus*.

ii. LRRK2

A identificação das mutações no gene LRRK2 como uma das causas de DP monogénica foi conseguida graças à análise, em várias populações, de variabilidade comum deste gene (Gitler *et al.*, 2008; Burre *et al.*, 2010). Em populações asiáticas, a variante G2385R foi a primeira a ser identificada como uma causa da DP (Mata *et al.*, 2005a). Esta variante estava presente em 5% da população e, mais tarde, provou-se que se tratava de um alelo que duplicava o risco de instalação da DP (Di Fonzo *et al.*, 2006). Esta descoberta foi largamente observada em indivíduos asiáticos que habitavam diferentes áreas geográficas como Singapura, Taiwan, China, Coreia e Japão (Farrer *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Zabetian *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013).

Em 2008 foi descrita outra variante, a R1628P, que foi associada à duplicação do risco de desenvolvimento da DP e foi observada em várias populações asiáticas incluindo tailandeses, chineses e taiwaneses (Pulkes *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013; Wu-Chou *et al.*, 2013). Várias outras variantes do gene LRRK2 foram avaliadas e mostraram ter níveis de variação suficientes para serem associadas ao risco de aparecimento da DP (Ross *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012).

O *locus* LRRK2 é várias vezes identificado, através de estudos de associação genética, em populações caucasianas mas, a variante danosa para estas populações, continua a ser uma incógnita requerendo análises mais aprofundadas (Hernandez *et al.*, 2016).

iii. Glucocerebrosidase (GBA)

A descoberta do fator de risco para a DP, GBA, foi conseguida não por estudos de associação genética mas sim por observação clínica. Este gene estava desde há muito associado à doença de armazenamento lisossomal conhecida como doença de Gaucher (Tsuji *et al.*, 1987).

Um grupo de investigadores percebeu que uma porção significativa dos pacientes com doença de Gaucher apresentavam sintomas de parkinsonismo, permitindo estes dados formular uma hipótese que associava a deficiência no gene GBA à predisposição para o parkinsonismo (Tayebi *et al.*, 2003). Um ano mais tarde, Aharon-Peretz e colegas foram capazes de provar que a herança de uma única mutação neste gene aumenta o risco para a DP (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

Meta análises de dados já existentes foram realizadas para mostrar que, em populações judias oriundas da Europa Central e Oriental, a frequência de duas mutações no gene GBA (N370S e L444P) era de 15% em pacientes com DP e de 3% em controlos enquanto em populações judias de outros pontos do globo, esta frequência era bem mais baixa sendo de 3% em pacientes com DP e inferior a 1% para os controlos (Sidransky *et al.*, 2009). De um modo geral, estes dados indicam que uma única cópia desta mutação aumenta em cerca de cinco vezes o risco para a DP. Estas duas variantes (N370S e L444P) também foram associadas ao risco de demência dos corpos de Lewy e à DP com sintomas de demência (Nalls *et al.*, 2013).

A glucocerebrosidase é uma enzima necessária para a quebra dos glucocerebrosídeos em ceramida. Após a associação do gene GBA à DP, Mazzulli *et al.* mostraram que a diminuição dos níveis de glucocerebrosidase nos neurónios corticais provocava a acumulação de α -sinucleína (Mazzulli *et al.*, 2011). Mais tarde, os mesmos investigadores demonstraram um aumento dos níveis da proteína α -sinucleína em neurónios

dopaminérgicos derivados de células estaminais pluripotentes de pacientes com doença de Gaucher (Mazzulli *et al.*, 2011). Não foi registrada acumulação de proteínas Tau o que indica que, na DP associada ao gene GBA, há uma preferência pela α -sinucleína (Mazzulli *et al.*, 2011).

Vários estudos provaram que a atividade da glucocerebrosidase é mais baixa em pacientes com mutações no gene GBA e em pacientes com formas esporádicas da DP, o que prova o seu vincado papel na patogênese da DP (Gegg *et al.*, 2012; Alcalay *et al.*, 2015).

2.3. Perspetivas Futuras

Como já se referiu, os últimos anos foram bastante férteis no que toca ao progresso na área da genética da DP. Apesar disso, os estudos de associação génica, os estudos de associação e os genes até hoje identificados explicam apenas uma pequena parte da hereditariedade genética desta doença.

Várias propostas explicativas têm surgido para as formas ainda desconhecidas da doença que admitem a contribuição de fatores ambientais associados a variantes genéticas com diferentes penetrâncias, combinação de variantes frequentes ou mesmo variantes que escapam à análise genómica pelos métodos atuais.

Espera-se que, nos próximos anos, surjam avanços importantes nas tecnologias e nos sistemas informáticos que os tornem capazes de abarcar a enorme quantidade de dados gerados em cada análise genética e de fornecer informação mais específica acerca dos antecedentes genéticos da doença e potenciais fatores predisponentes. O campo da farmacogenética é também muito promissor, aumentando a possibilidade da existência de terapêuticas individualizadas (Kalinderi *et al.*, 2011).

Acredita-se que a perceção dos mecanismos moleculares implicados na patogênese da DP ajudará a alcançar terapias alvo como por exemplo, a redução dos níveis de α -sinucleína que modulam a atividade da cinase LRRK2 e aumentam a atividade do complexo “retromer”, pode ser um tratamento efetivo, no futuro. Um estudo, realizado numa cultura de células e em ratinhos, revelou um processo eficaz na redução dos níveis de α -sinucleína

e de neurodegeneração que consiste em induzir a autofagia mediada pelas chaperonas, através da modulação do recetor LAMP2A lisossomal (Xilouri *et al.*, 2013).

O caminho para a descoberta de terapias para a DP é ainda longo e a transição da fase pré-clínica para a fase clínica em estudos de introdução de fármacos no mercado ainda é difícil de se conseguir. Perspetiva-se que, num futuro próximo, o tratamento vá além do sintomático e novas respostas surjam para as muitas dúvidas que ainda pairam na comunidade científica acerca desta complexa doença.

III. Terapias para a doença de Parkinson

Atualmente a cura para a DP ainda não foi encontrada e, por isso, o tratamento disponível é sintomático. Posto isto, e com a previsão de um aumento da prevalência da doença provocado pelo envelhecimento populacional, torna-se imperativa a procura de soluções terapêuticas que vão além do controlo dos sintomas. O objetivo é procurar novos fármacos e substâncias que sejam capazes de inibir ou retardar o processo de neurodegeneração e reabilitar os neurónios danificados (Caramona *et al.*, 2010)

3.1. Terapia Farmacológica

Na seleção de uma estratégia farmacológica, o clínico tem que ter em conta não só os sintomas apresentados pelo doente como também a idade e a fase da doença. Como nos dias de hoje apenas se consegue uma abordagem sintomática do tratamento, a escolha e combinação de fármacos terá que ser ajustada ao longo dos anos, à medida que os sintomas vão surgindo.

A atual terapia baseia-se na reposição de dopamina e inclui fármacos precursores deste neurotransmissor, como a levodopa, ou agonistas diretos dos recetores dopaminérgicos, como o pramipexol ou ropinirol. As limitações da levodopa prendem-se com o facto de este substituto da dopamina originar flutuações motoras e discinesia em tratamento prolongado. Ocorrem reações como a deterioração de final de dose (“wearing-off”), que implicam a prescrição de novas dosagens de fármaco e mudanças bruscas e imprevisíveis do estado de mobilidade do doente (efeito “ON-OFF”) (Fahn, 1974).

Outro tratamento sintomático é o que inibe o metabolismo da dopamina e consiste na utilização de inibidores da COMT, uma enzima que degrada as catecolaminas, como a entacapona ou inibidores da MAO-B, como a selegilina (Wu e Frucht, 2005). A associação de um destes fármacos à levodopa reduz o efeito de “wearing-off”.

Estes fármacos, apesar de serem as únicas alternativas terapêuticas disponíveis, apresentam inúmeras limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas como a dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica e vários efeitos adversos.

3.2. Terapia Cirúrgica

Em meados do século XX, com a descoberta do potencial da levodopa no tratamento da DP, o recurso a cirurgia como terapia para esta doença caiu em desuso. No entanto, este tipo de abordagem terapêutica evoluiu nos últimos anos devido às muitas limitações apresentadas pelo tratamento farmacológico e ao avanço do conhecimento nas áreas de neuro-imagiologia, em especial nas técnicas de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (Levy e Ferreira, 2003; Bacheschi e Nitrini, 2005).

É sabido que o tratamento cirúrgico implica riscos consideráveis pelo que, a seleção desta terapêutica exige critérios rigorosos. Estes critérios baseiam-se fundamentalmente na idade do doente, na incapacidade provocada pela doença, no grau de resposta à levodopa e na avaliação neuro-psicológica.

Atualmente o único tratamento cirúrgico aplicado a indivíduos com DP é a Estimulação Cerebral Profunda (ECP) que substituiu a palidotomia e a talamotomia por estas apresentarem inúmeras limitações (Toulouse e Sullivan, 2008). A ECP não previne a progressão da doença, mas atua reduzindo o tremor, a rigidez e a bradicinésia. Também é utilizada para reduzir a necessidade de levodopa e outros fármacos, aliviando os sintomas de discinésias e as flutuações motoras.

3.3. Terapias em Investigação

É crescente a expectativa de obter fármacos com mecanismos de ação não dopaminérgicos para o tratamento da DP. Os compostos antagonistas do recetor A2a da adenosina, altamente seletivos e capazes de atuar em vias de sinalização específicas são bastante promissores (Williams *et al.*, 1997; Linazasoro *et al.*, 2008) uma vez que estes melhoram a atividade motora (Lewitt *et al.*, 2008) e podem atuar como agentes neuro-protetores.

Na última década têm sido testados em doentes com DP compostos que atuam nos sistemas de neurotransmissão glutaminérgico, noradrenérgico, adenosinérgico, serotoninérgico, GABAérgico, canabinóide e opióide uma vez que todos estes sistemas

são ativados aquando da diminuição da dopamina no corpo estriado. Estes testes não têm produzido os efeitos desejados e este insucesso deve-se à falta de eficácia preditiva dos modelos pré-clínicos e aos efeitos colaterais originados pelos compostos testados (Linazasoro *et al.*, 2008).

Derivados das fenil-cromonas-carboxamidas, com origem no núcleo base das cromonas ao qual se adiciona grupos funcionais, têm sido estudados devido à sua potencial aplicação na DP (Follmer e Netto, 2013). Estes compostos são capazes de inibir a MAO-B produzindo menos efeitos adversos do que os inibidores desta enzima comercializados atualmente (Follmer e Netto, 2013). Acredita-se também que estes compostos possam atuar como inibidores dos recetores A2a da adenosina.

Os recentes avanços na área da genética da DP fazem com que a terapia génica seja uma das mais promissoras terapêuticas futuras. Pensa-se que o caminho é conhecer detalhadamente o que acontece a nível molecular para se poder aplicar uma terapia que vise introduzir, corrigir ou inativar genes de forma a atrasar o avanço da doença ou mesmo a extingui-la. A possibilidade de utilizar vetores virais como método eficaz na entrega de material genético na DP, revolucionou a forma como a terapia génica é encarada enquanto terapia viável para esta doença.

Há ainda outras abordagens terapêuticas em investigação como é o caso da substituição enzimática, administração de fatores neuropáticos, terapia com células estaminais, inibidores da agregação da α -sinucleína, o neuro-transplante, o uso de imunoterapia e a inibição da neuro-inflamação (Reichmann, 2016; Inamdar *et al.*, 2007; Khatri e Chaudhry, 2009). Destas novas possibilidades ainda há teorias que defendem o uso de substâncias com ação neuro-protetora como os sequestradores de espécies reativas do oxigénio, quelantes de metais, antioxidantes naturais como os polifenóis e fármacos que inibem a apoptose usados em monoterapia ou associados a um antioxidante (Mandel, 2004).

Conclusões

A patogênese da doença de Parkinson é ainda hoje uma incógnita que paira na comunidade científica e que se apresenta como um desafio aliciante para os investigadores.

Nas últimas décadas confirmou-se, inequivocamente, que há uma componente hereditária nesta doença. Apesar desta certeza, a contribuição genética é atribuída apenas a uma pequena percentagem de casos diagnosticados da doença de Parkinson sendo que o grosso dos pacientes vê a sua doença associada a causas esporádicas.

Cada vez mais se encara esta patologia como multifatorial e assume-se que, para o seu aparecimento, contribuíram fatores ambientais, genéticos e o próprio envelhecimento. Sendo assim, facilmente se percebe que esta problemática está prestes a adensar-se uma vez que a população está cada vez mais envelhecida.

O futuro trará variados desafios que incluem não só a descoberta de novos alelos de risco e das suas consequências a nível biológico como também o fortalecimento dos dados até hoje recolhidos. Há que perceber que a área da genética fornece apenas pistas daquilo que acontece no complexo universo que é o organismo humano sendo necessário interpretá-las e perceber o comportamento dos genes, das regiões reguladoras, das proteínas e dos sistemas celulares. O advento de tecnologias de sequenciação e dos sistemas disponíveis para análise e armazenamento de dados será o grande aliado dos investigadores na procura do progresso na genética da intrincada doença de Parkinson.

Em última instância, o objetivo será construir um mapa genético que relacione diferentes variantes de risco e que contribua para o diagnóstico e, mais importante ainda, para a descoberta de fármacos que atuem especificamente na doença de Parkinson e não apenas no controlo de sintomas.

Bibliografia

Aasly, O.; Vilarino-Guell, C.; Dachsel, C. *et al.* (2010). Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25, pp. 2156–63.

Aharon-Peretz, J.; Rosenbaum, H.; Gershoni-Baruch, R. (2004). Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 351, pp. 1972–77.

Alcalay, N.; Levy, A.; Waters, C. *et al.* (2015). Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* 138(Pt 9), pp. 2648–58.

Appel-Cresswell, S.; Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M. *et al.* (2013). Alpha-synuclein p. H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28, pp. 811–13.

Athanassiadou, A.; Voutsinas, G.; Psiouri, L. *et al.* (1999). Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am J Hum Genet.* 65, pp. 555–58.

Bacheschi, A.; Nitrini, A (2005). *Neurologia que todo Médico deve saber, Parte II.* São Paulo: Atheneu. 4, pp. 297-313.

Balsinde, J.; Balboa, A. (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell. Signal.* 17, pp. 1052–62.

Barrero, F.; Ampuero, I.; Morales, B.; Vives, F.; Castillo, J.; Hoenicka, J.; Garcia, J. (2005). Depression in Parkinson's disease is related to a genetic polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1). *Pharmacogenomics Journal.* 5. 135-41.

Biskup, S.; Moore, J.; Celsi, F.; Hisashi, S.; West, B.; Andrabi, A.; Kurkinen, K.; Yu, W.; Waldvogel, J. *et al.* (2006). Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol.* 60, pp. 557-69.

Bonifati, V.; Rizzu, P.; Squitieri, F. *et al.* (2003). DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* 24, pp. 159–60.

Bonifati, V.; Rohe, F.; Breedveld, J. *et al.* (2005). Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology.* 65, pp. 87–95.

Bostantjopoulou, S.; Katsarou, Z.; Papadimitriou, A.; Veletza, V.; Hatzigeorgiou, G.; Less, A. (2001) Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation. *Mov Disord.* 16, pp. 1007–13.

Brice, A. (2005). Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain.* 128 (Pt 12), 2760–62.

Bruggemann, N.; Hagenah, J.; Reetz, K. *et al.* (2010). Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch. Neurol.* 67, pp. 1357–63.

Burchell, S.; Nelson, E.; Sanchez-Martinez, A. *et al.* (2013). The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat. Neurosci.* 16, pp. 1257–65.

Burre, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V. *et al.* (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 329, pp. 1663–67.

Campdelacreu, J. (2014). Parkinson's disease and Alzheimer disease: environment risk factors. *Elsevier.* 29. 541-49

Caramona, A.; Esteves M.; Gonçalves, P. *et al.* (2010). *Prontuário Terapêutico* 9. Infarmed. pp.77-83.

Chartier-Harlin, C.; Dachsel, C.; Vilariño-Guell, C. *et al.* (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 89, pp. 398–406.

Chartier-Harlin, M.; Kachergus, J.; Roumier, C. *et al.* (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 364, pp. 1167–9.

Chinta, J.; Andersen, K. (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1780, 13621367.

Choi, M.; Woo S.; Ma, I. *et al.* (2008). Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics.* 9, pp. 263–69.

Chouraki, V.; Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Adv. Genet.* 87, pp. 245–94.

Clark, E.; Dodson, W.; Jiang, C.; Cao, H.; Huh, R.; Seol, H.; Yoo, J.; Hay, A.; Guo, M. (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature.* 441, pp. 1162-66.

Cole, N.; Dieuliis, D.; Leo, P.; Mitchell, D.; Nussbaum, R. (2008). Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res.* 314, pp. 2076-89.

Corti, O.; Lesage, S.; Brice, A. (2011). What Genetics Tells Us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiological Reviews*, 91, pp.1161–1218.

Cullen, V.; Lindfors, M.; Ng, J. *et al.* (2009). Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol. Brain.* 2, pp. 5.

Davie, C. (2008). A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin.* 86. 109-127

Dehay, B.; Ramirez, A.; Martinez-Vicente, M.; Perier, C. *et al.* (2012) Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc. Natl Acad. Sci.* 109, pp. 9611–16.

Deng, H.; Dodson, W.; Huang, H; Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, pp. 14503-08.

Deng, H.; Gao, K.; Jankovic, J. (2013). The VPS35 gene and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28, pp. 569–75.

Deng, H.; Wu, Y.; Jankovic, J. (2015). The EIF4G1 gene and Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 132, pp. 73–8.

Devi, L.; Raghavendran, V.; Prabhu, B.; Avadhani, N.; Anandatheerthavarada, H. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry.* 283, pp. 9089-100.

Di Fonzo, A.; Rohe, F.; Ferreira, J. *et al.* (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet.* 365, pp. 412–15.

Di Fonzo, A.; Wu-Chou, H.; Lu, S. *et al.* (2006). A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics.* 7, pp. 133–38.

Doherty, M.; Hardy, J. (2013). Parkin disease and the Lewy body conundrum. *Mov. Disord.* 28, pp. 702–704.

Exner, N.; Treske, B.; Paquet, D.; Holmstrom, K.; Schiesling, C.; Gispert, S.; Carballo-Carbajal, I.; Berg, D.; Hoepken, H.; Gasser, T. *et al.* (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in

mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *Journal of Neuroscience*. 27, pp. 12413-18.

Fahn, S. (1974). "On-off" phenomenon with levodopa therapy in parkinsonism. *Neurology*. 24, 431-41.

Farrer, J.; Stone, T.; Lin, H.; Dachsel, C. *et al.* (2007). Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13, pp. 89–92.

Farrer, M.; Kachergus, J.; Forno, L. *et al.* (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol*. 55, pp. 174–9.

Farrer, M.; Stone, J.; Mata, F.; Lincoln, S. *et al.* (2005). LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology*. 65, pp. 738–40.

Ferese, R.; Modugno, N.; Campopiano, R. *et al.* (2015) Four Copies of SNCA Responsible for Autosomal Dominant Parkinson's Disease in Two Italian Siblings. *Parkinsons Dis*. ID: 546462.

Ferro, J.; Pimentel, J. (2006). Neurologia - Princípios, Diagnóstico e Tratamento. *Lidel*.

Follett, J.; Norwood, J.; Hamilton, A. *et al.* (2014). The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer. *Traffic*. 15, pp. 230–244.

Follmer, C.; Netto, J. (2013). Fármacos multifatoriais: monoamina oxidase e a sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. *Quím. Nova*. 36, pp.306-13.

Fortin, L.; Troyer, D.; Nakamura, K.; Kubo, S.; Anthony, D.; Edwards, H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci*. 24, pp. 6715–23.

Fowler, J.S.; Volkow, N.; Wang, G.J.; Logan, J.; Pappas, N.; Shea, C.; MacGregor, R. (1997). Age-related increases in brain monoamine oxidase B in living healthy human subjects. *Neurobiol Aging*, 18, 431-435.

Fu, X.; Zheng, Y.; Hong, H. *et al.* (2013). LRRK2 G2385R and LRRK2 R1628P increase risk of Parkinson's disease in a Han Chinese population from Southern Mainland China. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, pp. 397–98.

Fukae, J.; Mizuno, Y; Hattori, N. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 7, pp.58-62.

Gandhi, N.; Wang, X.; Zhu, X.; Chen, G.; Wilson-Delfosse, L. (2008). The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules. *Journal Neuroscience Research*. 86, pp. 1711-20.

Garland, H. (1952). Parkinsonism. *Br Med*, 1, 153-56.

Gasser, T.; Muller-Myhsok, B.; Wszolek, K. *et al.* (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*. 18, pp. 262-65.

Gautier, A.; Kitada, T.; Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, pp. 11364-69.

Gegg, E.; Burke, D.; Heales, J.; Cooper, M. *et al.* (2012). Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann. Neurol*. 72, pp. 455- 63.

Giasson, I.; Lee, V.; Trojanowski, J. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 32, pp. 1264-75.

Gilks, P.; Abou-Sleiman, M.; Gandhi, S. *et al.* (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*. 365, pp. 415-16.

Gilman, A.; Hardman, J.; Limbird, L. (2003). As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10^a Edição. *Mc Graw Hill*. pp.411-19.

Gitler, D.; Bevis, J.; Shorter, J. *et al.* (2008). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 105, pp. 145-50.

Gorostidi, A.; Ruiz-Martinez, J.; Lopez de Munain, A.; Alzualde, A.; Martí Massó, F. (2009). LRRK2 G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics*. 10, pp. 157-9.

Greene, C.; Whitworth, J.; Kuo, I.; Andrews, A.; Feany, B.; Pallanck, J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 4078-83.

Grunewald, A.; Arns, B.; Seibler, P.; Rakovic, A. *et al.* (2012). ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with KuforRakeb syndrome. *Neurobiol. Aging*. 33, pp. 1843e1-7.

Gusdon, M.; Zhu, J.; Van Houten, B.; Chu, T. (2012). ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiol. Dis.* 45, pp. 962–72.

Haaxma, C.; Bloem, B.; Borm, G. (2007). Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurologic Neurosurgery Psychiatry*.78:819824.

Hald, A.; Lotharius, J. (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.* 193, pp. 279-90.

Hastings, T.G. (2009). The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: Implications for Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr*, 41, 469-472.

Hatano, T.; Funayama, M.; Kubo, S. *et al.* (2014). Identification of a Japanese family with LRRK2 p.R1441G-related Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35, pp.2656.

Healy, G.; Falchi, M.; O'Sullivan, S. *et al.* (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 7, pp. 583–90.

Henchcliffe, C.; Beal, F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* 4(11), pp. 600-09.

Hernandez, D.; Reed, X.; Singleton, B. (2016). Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem.* 10.

Hicks, A.; Petursson, H.; Jonsson, T. *et al.* (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 52, pp. 549–55.

Ibanez, P.; Lesage, S.; Lohmann, E. *et al.* (2006). Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain.* 129, pp. 686–94.

Inamdar N.; Arulmozhi, K.; Tandon, A. *et al.* (2007). Parkinson's Disease: Genetics and Beyond. *Current Neuropharmacol.* 5, pp. 99-113.

Inazu, M.; Takeda, H.; Ikoshi, H.; Uchida, Y.; Kubota, N.; Kiuchi, Y.; Oguchi, K.; Matsumiya, T. (1999). Regulation of dopamine uptake by basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*, 34, pp. 235-44.

Jankovic, J. (2007). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007; 79, pp. 368-76.

Jenner, P.; Langston, J.W. (2011). Explaining adagio: A critical review of the biological basis for the clinical effects of rasagiline. *Mov Disord*, 26, pp. 2316-23.

Kachergus, J.; Mata, F.; Hulihan, M. *et al.* (2005). Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet*. 76, pp. 672–80.

Kalinderi, K.; Fidani, L.; Katsarou, Z.; Bostantjopoulou, S.; (2011). Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. *Int J Clin Pract*.65, pp. 1289–94.

Kalinderi, K.; Bostantjopoulou, S.; Katsarou, Z.; Dimikiotou, M.; Fidani, L. (2015). D620N mutation in the VPS35 gene and R1205H mutation in the EIF4G1 gene are uncommon in the Greek population. *Neurosci Lett*. 606, pp. 113–16.

Kane, A.; Lazarou, M.; Fogel, I.; Li, Y. *et al.* (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J. Cell Biol*. 205, pp. 143–153.

Khatri, A.; Chaudhry, S. (2009). Parkinson's Disease-A Review. *J Neurol Sci*. 4, pp. 33-43.

Kiely, P.; Asi, T.; Kara, E. *et al.* (2013). Alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy?. *Acta Neuropathol*. 125, pp.753–69.

Kim, M.; Lee, Y.; Kim, J.; Kim, S. *et al.* (2010). The LRRK2 G2385R variant is a risk factor for sporadic Parkinson's disease in the Korean population. *Parkinsonism Relat. Disord*. 16, pp. 85–88.

Kimelberg, H.K.; Katz, D.M. (1986). Regional differences in 5-hydroxytryptamine and catecholamine uptake in primary astrocyte cultures. *J Neurochem*, 47, pp. 1647-52.

Kinghorn, J.; Castillo-Quan, I.; Bartolome, F. *et al.* (2015). Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Brain*. 138(Pt 7), pp. 1801–16.

Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392, pp. 605–08.

Kitada, T.; Pisani, A.; Porter, R.; Yamaguchi, H.; Tscherter, A.; Martella, G.; Bonsi, P.; Zhang, C.; Pothos, N; Shen, J. (2007). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, pp. 11441-46.

Klein, C.; Schlossmacher, G. (2006). The genetics of Parkinson disease: implications for neurological care. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, pp. 136–46.

Kong, M.; Chan, K.; Park, S. *et al.* (2014). Parkinson's disease linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes alpha-Synuclein externalization via exosomes. *Hum. Mol. Genet.* 23, pp. 2816–33.

Koyano, F.; Okatsu, K.; Kosak, H. *et al.* (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature.* 510, pp. 162–6.

Kruger, R.; Kuhn, W.; Muller, T. *et al.* (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 18, pp. 106–8.

Kumar, M.J.; Andersen, J.K. (2004) Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease - where do we go from here? *Mol Neurobiol*, 30, pp. 77-89.

Kumar R.; Djarmati-Westenberger, A.; Grunewald, A. (2011) Genetics of Parkinson's disease. *Semin. Neurol.* 31, pp. 433–40.

Kumar, R.; Weissbach, A.; Heldmann, M. *et al.* (2012). Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 69, pp. 1360–4.

Lang, A.E.; Lozano, A.M. (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *Eng J Med*; 339, pp. 1044–53.

Lemke, M.; Raethjen, J. (2007). Depression and Parkinson's Disease - pathophysiology, diagnosis, treatment. *Uni-Med.* pp. 18-51.

Leroy, E.; Boyer, R.; Auburger, G. *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395, pp. 451–52.

Lesage, S.; Anheim, M.; Letournel, F. *et al.* (2013). G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonianpyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 73, pp. 459–71.

Lesage, S.; Durr, A.; Tazir, M. *et al.* (2006). LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med.* 354, pp. 422–23.

Lesage, S.; Leutenegger, L.; Ibanez, P. *et al.* (2005). LRRK2 haplotype analyses in European and North African families with Parkinson disease: a common founder for the G mutation dating from the 13th century. *Am J Hum Genet.* 77, pp. 330–32.

Levy, A.; Ferreira, J. (2003). *Doença de Parkinson – Manual Prático*. Lidel. pp. 3-77; 189-223; 237-246; 287-291.

Lewitt, A. *et al.* (2008). Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces “off” time Parkinson disease a double-blind, randomized, multicenter clinical trial. *Ann Neurol.* 63, pp.295-302.

Li, C.; Ting, Z.; Qin, X.; Ying, W. *et al.* (2007). The prevalence of LRRK2 Gly2385Arg variant in Chinese Han population with Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 22, pp. 2439–43.

Lin, W.; Kang, J. (2008). Characterization of PINK1 processing, stability and subcellular localization. *Journal of Neurochemistry.* 106, pp. 464-74.

Linazasoro, G. *et al.* (2008). Pharmacological treatment of Parkinson’s disease: life beyond dopamine D2/D3 receptors? *J Neural Transm.*, 115, pp. 431-41.

Lorenzo-Betancor, O.; Samaranch, L.; Ezquerro, M. *et al.* (2012). LRRK2haplotype-sharinganalysisinParkinson’sdiseasereveals a novel p. S1761R mutation. *Mov. Disord.* 27, pp. 146–51.

Lucking, B.; Durr, A.; Bonifati, V. *et al.* (2000). Association between early-onset Parkinson’s disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* 342, pp. 1560–67.

Malik, I.; Turk, J.; Mancuso, J.; Montier, L.; Wohltmann, M. *et al.* (2008). Disrupted membrane homeostasis and accumulation of ubiquitinated proteins in a mouse model of infantile neuroaxonal dystrophy caused by PLA2G6 mutations. *Am. J. Pathol.* 172, pp. 406–16.

Mallajosyula, J.K.; Kaur, D.; Chinta, S.J.; Rajagopalan, S.; Rane, A.; Nicholls, D.G.; Di Monte, D.A.; Macarthur, H.; Andersen, J.K. (2008). MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson’s pathology. *PLoS One*, 3, pp. e1616.

Mandel, S.; Youdim, B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 37, pp. 304-17.

Maraganore, M.; de Andrade, M.; Elbaz, A. *et al.* (2006). Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA.* 296, pp. 661–70.

Marongiu, R.; Brancati, F.; Antonini, A. *et al.* (2007). Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 28, pp. 98.

Massano, J. (2011). Doença de Parkinson: Atualização Clínica. *Acta Med Port.* 24, pp. 827-34.

Mata, F.; Kachergus, M.; Taylor, P. *et al.* (2005a). Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenet.* 6, pp. 171–77.

Mata, F.; Taylor, P.; Kachergus, J. *et al.* (2005b). LRRK2 R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 382, pp. 309–11.

Mazzulli, R.; Xu, H.; Sun, Y.; Knight, L. *et al.* (2011). Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell.* 146, pp. 37– 52.

McGeer, L.; Itagaki, S.; Boyes, E.; McGeer, G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 38, pp. 1285-91.

McNamara, P. (2011). The Cognitive Neuropsychiatry of Parkinson's Disease, *Massachusetts Institute of Technology.*

Mizuno, Y.; Sone, N.; Saitoh, T. (1986). Dopaminergic neurotoxins, MPTP and MPP +, inhibit activity of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Proc Jpn Acad Ser B* 62, pp. 261-263.

Mizuno, Y.; Sone, N.; Saitoh, T. (1987a). Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase activity by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 143, pp. 294-99.

Mizuno, Y.; Sone, N.; Saitoh, T. (1987b). Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 143, pp. 971-976.

Mizuno, Y.; Sone, N.; Saitoh, T. (1987c). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48, pp.1787-1793.

Mizuno, Y.; Suzuki, K.; Sone, N.; Saitoh, T. (1987d). Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP +) in isolated mitochondria from mouse brain. *Neurosci Lett.* 81, pp. 204-208.

Mizuno, Y.; Suzuki, K.; Sone, N.; Saitoh, T. (1988a). Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP +) against mitochondria of mouse brain. *J Neurol Sci.* 86, pp. 97-110.

- Mizuno, Y.; Suzuki, K.; Sone, N.; Saitoh, T. (1988b). Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett.* 91, pp. 349-353.
- Morgan, V.; Westaway, K.; Morton, E. *et al.* (2006). PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat. Genet.* 38, pp. 752–54.
- Mori, H.; Hattori, N.; Mizuno, Y. (2003). Genotype-phenotype correlation: familial Parkinson disease. *Neuropathology.* 23, pp. 90–94.
- Mubaidin, A.; Roberts, E.; Hampshire, D.; Dehyyat, M. *et al.* (2003). Karak syndrome: a novel degenerative disorder of the basal ganglia and cerebellum. *J. Med. Genet.* 40, pp. 543–46.
- Munoz, P.; Huenchuguala, S.; Paris, I.; Segura-Aguilar, J. (2012). Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons*, ID 920953.
- Nagatsu, T.; Sawada, M. (2006). Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase inhibitors to Parkinson's disease: Possible implications of glial cells. *J Neural Transm*, 71, pp. 53-65.
- Nakabayashi, K.; Chagas, M.; Correa, A.; Tumas, V.; Loureiro, S.; Crippa, J. (2008). Prevalência de depressão na doença de Parkinson. *Revista Psiquiatria Clínica*, 35, pp. 219-27.
- Nalls, A.; Duran, R.; Lopez, G. *et al.* (2013). A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol.* 70, pp. 727–35.
- Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, F.; Youle, J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183, pp. 795-803.
- Narendra, P.; Jin, M.; Tanaka, A.; Suen, F. *et al.* (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298.
- Nemani, V.M.; Lu, W.; Berge, V.; Nakamura, K.; Onoa, B.; Lee, M.K.; Chaudhry, F.A.; Nicoll, R.A.; Edwards, R.H. (2010). Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 65, pp. 66–79.
- Nichols, C.; Pankratz, N.; Hernandez, D. *et al.* (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet.* 365, pp. 410–12.

- Norris, E.H.; Giasson, B.I.; Hodara, R.; Xu, S.; Trojanowski, J.Q.; Ischiropoulos, H.; Lee, V.M. (2005). Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochromemediated conformational alterations. *J Biol Chem*, 280, pp. 21212-19.
- Nuytemans, K.; Bademci, G.; Inchausti, V. *et al.* (2013). Whole exome sequencing of rare variants in EIF4G1 and VPS35 in Parkinson disease. *Neurology*. 80, pp. 982–89.
- Orth, M.; Schapira, H. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 40, pp. 533-41.
- Ozelius, J.; Senthil, G.; Saunders-Pullman, R. *et al.* (2006). LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 354, pp. 424–425.
- Paisan-Ruiz, C.; Bhatia, P.; Li, A.; Hernandez, D. *et al.* (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann. Neurol.* 65, pp. 19–23.
- Paisan-Ruiz, C.; Jain, S.; Evans, W. *et al.* (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8linked Parkinson's disease. *Neuron*. 44, pp. 595–600.
- Palacino, J.; Sagi, D.; Goldberg, S. *et al.* (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin deficient mice. *J Biol Chem*. 279, 18614–22.
- Pankratz, N.; Nichols, C.; Uniacke, K. *et al.* (2003a). Parkinson Study Group. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet.* 12, pp. 2599–608.
- Pankratz, N.; Nichols, C.; Uniacke, K. *et al.* (2003b). The Parkinson Study Group. Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* 72, pp. 1053–57.
- Panov, A.; Dikalov, S.; Taylor, G.; Sherer, T.; Greenamyre, J. (2005). Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *Journal of Biological Chemistry*. 280, pp. 42026-35.
- Papadimitriou, A.; Veletza, V.; Hadjigeorgiou M.; Patrikiou, A.; Hirano, M.; Anastasopoulos, I. (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology*. 52, pp. 651–54.
- Park, H.; Wacholder, S.; Gail, H.; Peters, U. *et al.* (2010). Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. *Nat. Genet.* 42, pp. 570–75.

Park, J.; Lee, B.; Lee, S. *et al.* (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 441, pp. 1157–61.

Parker, W.; Swerdlow, R. (1998). Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. *Am Journal Hum Genet*. 62, pp.758-62.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *J Neuropsych Clin Neurosci*, 14, pp. 223-36.

Pesah, Y.; Pham, T.; Burgess, H.; Middlebrooks, B.; Verstreken, P.; Zhou, Y.; Harding, M.; Bellen, H.; Mardon, G. (2004). *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development*. 131, pp. 2183-94.

Peter, R.; Poulter, R.; Warner, J.; Beckett, N.; Burch, L.; Bulpitt, C. (2008). Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC Geriatric*. 8, pp. 36.

Petit, A.; Kawarai, T.; Paitel, E.; Sanjo, N. *et al.* (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-relates mutations. *J Biologic Chem*. 280, pp. 34025-32.

Polymeropoulos, H.; Higgins, J.; Golbe, I. *et al.* (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21–q23. *Science*. 274, pp. 1197.

Polymeropoulos, H.; Lavedan, C.; Leroy E. *et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276, pp. 2045–47.

Poole, C.; Thomas, E.; Andrews, A.; Mc Bride, M.; Whitwoeth, J; Pallanck, J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, pp. 1638-43.

Proukakis, C.; Dudzik, G.; Brier, T. *et al.* (2013). A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*. 80, pp. 1062–64.

Pulkes, T.; Papsing, C.; Mahasirimongkol, S.; Busabaratana, M. *et al.* (2011). Frequencies of LRRK2 variants in Thai patients with Parkinson's disease: evidence for an R1628P founder. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 82, pp. 1179–80.

Qian, L.; Flood, M.; Hong, S. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm*. 117, pp. 971-79.

Ramirez, A.; Heimbach, A.; Grundemann, J. *et al.* (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5P-type ATPase. *Nat. Genet.* 38, pp. 1184–91.

Reichmann, H. (2016). Modern treatment in Parkinson's disease, a personal approach. *J Neural Transm.* 123, pp. 73–80.

Requejo-Aguilar, R.; Lopez-Fabuel, I.; Jimenez-Blasco, D. *et al.* (2015). DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. *Biochem J.* 467, pp. 303–10.

Riederer, P.; Konradi, C.; Schay, V.; Kienzl, E. (1987). Localization of MAO-A and MAO-B in human brain: A step in understanding the therapeutic action of L-deprenyl. *Adv Neurol.* 45, pp. 111-18.

Ross, A.; Soto-Ortolaza, I.; Heckman, G. *et al.* (2011). Association of LRRK2 exon in variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 10, pp. 898–908.

Rubio, P.; Topp, S.; Warren, L. *et al.* (2012). Deep sequencing of the LRRK2 gene in 14,002 individuals reveals evidence of purifying selection and independent origin of the p.Arg1628Pro mutation in Europe. *Hum. Mutat.* 33, pp. 1087–98.

Ruiperez, V.; Darios, F.; Davletov, B. (2010). Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *J Lipid Research.* 49, pp. 4208.

Samaranch, L.; Lorenzo-Betancor, O.; Arbelo, M. *et al.* (2010). PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain.* 133, pp. 1128–42.

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

Saura, J.; Andrés, N.; Andrade, C.; Ojuel, J.; Eriksson, K.; Mahy, N. (1997). Biphasic and region-specific MAO-B response to aging in normal human brain. *Neurobiol Aging*, 18, pp. 497-507.

Sauvé, V.; Lilov, A.; Seirafi, M. *et al.* (2015). A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *EMBO J.* 34, pp. 2492–505.

Schapira, A. (2011). Parkinson's Disease. *Oxford University Press.*

Schrag, A.; Ben-Shlomo, Y., Quinn, N. (2002). How valid is the clinical diagnosis of Parkinson's disease in the community? *Journal Neurologic Neurosurg Psych.* 73, pp. 529–534.

Schulte, C.; Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet.* 4, pp. 67–80.

Scuderi, S.; La Cognata, V.; Drago, F.; Cavallaro, S.; D'Agata, V. (2014) Alternative splicing generates different parkin protein isoforms: evidences in human, rat, and mouse brain. *Biomed. Res. Int.* ID 690796.

Semenoff, D.; Kimelberg, H. (1985). Autoradiography of high affinity uptake of catecholamines by primary astrocyte cultures. *Brain Res*, 385, pp. 125-136.

Shannon, M. (2004). Movement Disorders. *Neurology in clinical practice*. Vol. II., Boston: Butterworth Heinemann, pp. 2131-39.

Shapira, A. *et al.*, (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 5, pp. 845-54.

Shavali, S.; Brown-Borg, M.; Ebadi, M.; Porter, J. (2008). Mitochondrial localization of alpha-synuclein protein in alpha-synuclein overexpressing cells. *Neuroscience Letter.* 439, pp. 125-28.

Shimura, H.; Hattori, N.; Kubo, S. *et al.* (2000). Familial parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitinprotein ligase. *Nat Genet.* 25, pp. 302–5.

Shojaee, S.; Sina, F.; Banihosseini, S.; Kazemi, H. *et al.* (2008). Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am. J. Hum. Genet.* 82, pp. 1375–84.

Sidransky, E.; Samaddar, T.; Tayebi, N. (2009). Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology.* 73, pp. 1424–25.

Sina, F.; Shojaee, S.; Elahi, E.; Paisan-Ruiz, C. (2009). R632W mutation in PLA2G6 segregates with dystonia-parkinsonism in a consanguineous Iranian family. *Eur. J. Neurol.* 16, pp. 101-104.

Soto-Ortolaza, A.; Ross, O. (2015). Genetic susceptibility variants in parkinsonism. *Parkinson & Related Disorders*, 22, pp. S7-S11.

Spillantini, M.; Goedert, M. (2016). Synucleinopathies: past, present and future. *Neurop. Appli. Neurob.* 42, pp. 3-5.

Spillantini, G.; Schmidt, L.; Lee, M.; Trojanowski, Q.; Jakes, R.; Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388, pp. 839–40.

Strauss, M.; Martins, M.; Plun-Favreau, H. *et al.* (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 14, pp.2099–111.

Sziráki I.; Mohanakumar, P.; Rauhala, P.; Kim, G.; Yeh, J.; Chiueh, C. (1998). Manganese: A transition metal protects nigro statal neurons from oxidative stress in the iron induced animal model of parkinsonism. *Neuroscience.* 85, pp. 1101-11.

Tayebi, N.; Walker, J.; Stubblefield, B.; Orvisky, E. *et al.* (2003). Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol. Genet. Metab.* 79, pp. 104–09.

Thayanidhi, N.; Helm, J.R.; Nycz, D.C.; Bentley, M.; Liang, Y.; Hay, J.C. (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol. Biol. Cell,* 21, pp. 1850–63.

Toft, M.; Haugarvoll, K.; Ross, A.; Farrer, J.; Aasly, O. (2007). LRRK2 and Parkinson's disease in Norway. *Acta Neurol Scand Suppl.* 187, pp. 72–5.

Tokutake, T.; Ishikawa, A.; Yoshimura, N. *et al.* (2014). Clinical and neuroimaging features of patient with early-onset Parkinson's disease with dementia carrying SNCA p. G51D mutation. *Parkinsonism Relat Disord.* 20, pp. 262–64.

Tom, T.; Cummings, J. (1998). Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. *Drugs Aging.* 12, pp. 55-74.

Toulouse, A.; Sullivan, M. (2008). Progress in Parkinson's disease-Where do we stand?. *Progress in Neurobiol.* 85, pp. 376-92.

Troiano, R.; Cazeneuve, C.; Le Ber, I.; Bonnet, M.; Lesage, S.; Brice, A. (2008). alpha-synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 71, pp. 1295.

Tsuji, S.; Choudary, V.; Martin, M.; Stubblefield, K. *et al.* (1987). A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 316, pp. 570–75.

Twelves, D.; Perkins, K.; Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Movement Disorder.* 18, pp. 19-31.

Uchiyama, T.; Ikeuchi, T.; Ouchi, Y. *et al.* (2008). Prominent psychiatric symptoms and glucose hypometabolism in a family with a SNCA duplication. *Neurology.* 71, pp. 1289–91.

Uhl, R.; Li, S.; Takahashi, N.; Itokawa, K.; Lin, Z. *et al.* (2000). The VMAT2 gene in mice and humans: Amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J.* 14, pp. 2459-65.

Usenovic, M.; Tresse, E.; Mazzulli, R.; Taylor P.; Krainc, D. (2012). Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J. Neurosci.* 32, pp. 4240–46.

Valente, M.; Abou-Sleiman, M.; Caputo, V. *et al.* (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304, pp. 1158–60.

van Warrenburg, P.; Lammens, M.; Lucking, B. *et al.* (2001). Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology.* 56, pp. 555–57.

Vilariño-Guell, C.; Rajput, A.; Milnerwood, J. *et al.* (2012). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet.* 23, pp. 1794–801.

Vilariño-Guell, C.; Wider, C.; Ross, A. *et al.* (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 89, pp. 162–67.

Wang, C.; Cai, Y.; Zheng, Z. *et al.* (2012). Penetrance of LRRK2 G2385R and R1628P is modified by common PD-associated genetic variants. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, pp. 958–63.

West, B.; Moore, J.; Biskup, S.; Bugayenko, A.; Smith, W.; Ross, A.; Dawson, L.; Dawson, M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, pp. 16842-47.

Williams, M.; Wright, S.; Loygd, K. (1997). Improved therapies for Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptor agonists. *Trends Pharmacol Sci.* 18, pp. 307-10.

Winner, B.; Jappelli, R.; Maji, S.K. *et al.* (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci USA,* 108, pp. 4194–99.

Wirdefeldt, K.; Adam, H.; Cole, P.; Trichopoulos, D.; Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 26, pp. 1-58.

Wolters, E.; Van der Werf, Y.; Van den Heuvel, O. (2008). Parkinson's disease-related disorders in the impulsive-compulsive spectrum. *J Neurol,* 255, pp. 48-56.

Wu, S.; Frucht, S. (2005). *Treatment of Parkinson's Disease: What's on the Horizon?* CNS Drugs. Vol 19(9), pp. 723-743.

Wu, X.; Tang, F.; Li, Y. *et al.* (2012). Quantitative assessment of the effect of LRRK2 exon ic variants on the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, pp. 722–30.

Wu-Chou, H.; Chen, T.; Yeh, H. *et al.* (2013). Genetic variants of SNCA and LRRK2 genes are associated with sporadic PD susceptibility: a replication study in a Taiwanese cohort. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, pp. 251–55.

Xilouri, M.; Brekk, R.; Kirik, D.; Stefanis, L. (2013). LAMP2A as a therapeutic target in Parkinson disease. *Autophagy.* 9, pp. 2166–68.

Yamada, T.; McGeer, G.; Schelper, L.; Wszolek, K.; McGeer, L.; Pfeiffer, F.; Rodnitzky, L. (1993). Histological and biochemical pathology in a family with autosomal dominant Parkinsonism and dementia. *Neurol Psychiatry Brain Res.* 2, pp. 26-35.

Yang, Y.; Ouyang, Y.; Yang, L.; Beal, F.; McQuibban, A.; Vogel, H.; Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, pp. 7070-75.

Yoshino, H.; Tomiyama, H.; Tachibana, N.; Ogaki, K. *et al.* (2010). Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology.* 75, pp. 1356–61.

Youdim, M.B.; Edmondson, D.; Tipton, K.F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci,* 7, pp. 295-309.

Zabetian, P.; Yamamoto, M.; Lopez, N. *et al.* (2009). LRRK2 mutations and risk variants in Japanese patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 24, pp. 1034–41.

Zarranz, J.; Alegre, J.; Gomez-Esteban C. *et al.* (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 55, pp. 164–73.

Zecca, L.; Wilms, H.; Geick, S.; Claasen, J.H.; Brandenburg, L.O.; Holzknicht, C.; Panizza, M.L.; Zucca, F.A.; Deuschl, G.; Sievers, J.; Lucius, R. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol,* 116, pp. 47-55.

Zhou, C.; Huang, Y.; Przedborski, S. (2008). Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci.* 1147, pp.93-104.

Zhou, D.; Xie, P.; Sathiyamoorthy, S. *et al.* (2015). F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 24, pp. 6314–30.

Zimprich, A.; Benet-Page, A.; Struhal, W. *et al.* (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 89, pp. 168–75.

Zimprich, A.; Biskup, S.; Leitner, P. *et al.* (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 44, pp. 601–607.