



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade das Ciências da Saúde

Estudo dos polimorfismos genéticos de enzimas antioxidantes nas Doenças de Alzheimer e Parkinson

Nânci Daniela Monteiro Abreu

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro
Co-orientador: Maria da Assunção Morais e Cunha Vaz Patto

Covilhã, Junho de 2015

Agradecimentos

É com grande emoção que agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e apoiaram direta ou indiretamente ao longo do meu Mestrado em Ciências Biomédicas. A todos que me ajudaram a cumprir os objetivos e a chegar a este patamar, quero deixar aqui algumas palavras, de agradecimento.

À minha orientadora, Dr^a Luíza Granadeiro, agradeço a oportunidade que me deu ao integrar-me no grupo de investigação, foi uma prova de confiança. Não posso deixar de frisar o sentido de responsabilidade que me incutiu, os conselhos e a “força”, assim como os rebufados no momento de maior cansaço. Obrigada pela amizade sincera, pela amabilidade, boa disposição e acima de tudo pela disponibilidade total para comigo. Quero salientar a honra e o privilégio que foi ser orientada e apoiada de forma incondicional e profissional. A sua sabedoria foi crucial e determinante na elaboração da minha tese. Muito obrigada!

À Dr^a Maria Assunção Vaz Patto, o meu sincero agradecimento pela co-orientação, a amabilidade e o apoio ao coletar amostras de pacientes, demonstram bem o seu interesse pela investigação no laboratório, a colaboração e disponibilidade para comigo foram atributos que me impulsionaram a chegar aqui.

Agradeço a todos os meus professores da UBI, que com esforço, compreensão, dedicação e amizade também colaboraram ao longo destes anos para eu chegar a este patamar.

Aos alunos de intercâmbio de medicina, Tannya González, Mateus Reinato, Alessandra Garbin, obrigada pela experiência única a tentar falar mexicano e chileno com sotaque brasileiro, pela alegria e boa disposição, pelo convívio, pela gastronomia e por todos os momentos agradáveis e únicos. Agradeço-vos a partilha de bons momentos.

Aos alunos de laboratório, Susana, Maria, Nuno e Carolina, quero agradecer a vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização do meu trabalho. Sem as vossas “dicas” com certeza a minha motivação não teria sido a mesma.

Aos investigadores, Inês, Catarina e Eduarda, obrigada pelo carinho e amizade e pela forma especial de ajuda e apoio.

Aos tutores, João Godinho e Luís Crisóstomo, um muito obrigada pela amizade, companheirismo e ajuda. A vossa alegria, sinceridade e espontaneidade foram fatores que me fizeram prosseguir com garra o meu trajeto. Quero agradecer ao João as boleias e o empenho para que todas as minhas experiências dessem resultados favoráveis. Ao Crisóstomo peço

desculpa por não ter conseguido tirar tempo para o acompanhar no atletismo, mas agradeço-lhe o facto de ter intercedido por mim. Aos dois mais uma vez, o meu sincero muito obrigada.

É com muita ternura que agradeço aos pacientes, a contribuição que prestaram na investigação, apesar de permanecerem no anonimato.

Agradeço à minha amiga Márcia por me ter “aturado” na Inglaterra, pelos enormes desabafos ao telemóvel, pela amizade, pela alegria e pelas gargalhadas, por todo o empenho a motivar-me e a incentivar-me, um enorme obrigado.

Ao Alexandre, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces, pela força e transmissão de confiança, em todos os momentos. Muito obrigado.

Agradeço em geral todas as pessoas que não mencionei e que de certa forma apoiam e torcem por mim.

À minha família, em particular à minha tia Maria João por me ajudar no inglês, ao meu irmão pelo apoio, pelos desabafos, pelo carinho. Em especial aos meus pais, por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida.

Pai, tu és uma lição de vida
És o meu guia, o meu amigo
Nunca me senti sozinha
Sempre pude contar contigo

Mãe, eu te admiro
És do meu céu a estrela que mais brilha
E o maior orgulho que tenho
É o orgulho de ser tua filha!

Avó, a Deus sempre peço em oração
Que esteja ao teu lado a todo o momento
Te guiando pela mão
Sendo em tudo o teu sustento

Avô, foste e és o meu herói
Um mestre...um lutador
Quero ser como tu
Pois na vida foste um vencedor!

Espero que com a conclusão desta etapa, possa retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação com que sempre me congratularam.

A todos dedico este trabalho.

Resumo

Doenças neurodegenerativas é um termo genérico utilizado para um espectro de condições que afetam principalmente as células neuronais. De entre as células neuronais os neurónios têm sido os mais estudados em relação a este tipo de patologia. Os neurónios são células que constituem o sistema nervoso, e são células pós-mitóticas pelo que quando são danificadas ou morrem não há hipótese de substituição (Emerit et al. 2004). As doenças neurodegenerativas são doenças incuráveis e debilitantes que resultam na progressiva degeneração e/ou morte das células nervosas. Este facto leva a que o doente apresente alterações nos movimentos (ataxia) ou que desenvolva demência (Guyton & Hall 2006). No presente trabalho as doenças neurodegenerativas abordadas são a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Estas patologias têm em comum o facto de serem frequentemente associadas ao processo de stress oxidativo, razão pela qual é importante avaliar a capacidade de defesa antioxidante nestas patologias, como por exemplo os parâmetros genéticos das enzimas antioxidantes como a GST. Sendo assim este trabalho tem como objetivo estudar a relação dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 com as Doenças de Alzheimer e Parkinson.

A população em estudo é constituída por 58 indivíduos de nacionalidade Portuguesa, das quais 35 foram diagnosticados com Doença de Alzheimer e 23 com Doença de Parkinson, e a população controlo é constituída por 154 pessoas. As amostras de sangue foram colhidas em papel de filtro, de onde se extraiu o DNA através do método de Chelex® 100, posteriormente se realizou a amplificação por PCR dos genes de interesse e identificou-se o genótipo através da eletroforese em gel de agarose.

Os resultados mostraram que as GSTs têm influência em ambas as patologias. Na Doença de Alzheimer é de salientar que principalmente o genótipo GSTM1 “ausente” é um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Na Doença do Parkinson os genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausentes” parecem ser um fator de risco para os indivíduos do sexo masculino, já nos indivíduos do sexo feminino o que se verifica é a prevalência do genótipo GSTT1 “presente”.

Palavras-chave

Glutathione S-Transferase, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Stress oxidativo.

Abstract

Neurodegenerative diseases, it is a generic term for a spectrum of conditions that primarily affect neuronal cells. Among the neuronal cells, neurons have been most studied and associated with this type of pathology. Neurons are cells that constitute the nervous system, as they are post-mitotic cells, when they are damaged or die, they can't be replaced (Emerit et al. 2004). Neurodegenerative diseases are incurable and debilitating diseases that result in the progressive degeneration and/or death of the neuronal cells. This leads to the patient presenting changes in the movements (ataxia) or to develop dementia (Guyton and Hall 2006). In the present work, the neurodegenerative diseases studied are Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. These disorders have in common the fact that they are often associated with oxidative stress, which is why it is important to evaluate the ability of antioxidant defense in these pathologies, such as genetic parameters of antioxidant enzymes such as GST. This work aims to study the relationship between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease.

The study population consists of 58 individuals of Portuguese nationality, of which 35 were diagnosed with Alzheimer's disease and 23 with Parkinson's disease, and the control population is formed by 154 people. Blood samples were collected on filter paper, from which DNA was extracted using the Chelex® 100 method, then the amplification of the genes of interest was carried out by PCR and the genotype was identified by agarose gel electrophoresis.

The results showed that GSTs play an important role in both diseases. In Alzheimer's disease, it is particularly noteworthy that GSTM1 null genotype" is a risk factor for the disease development. In Parkinson's disease the GSTM1 and GSTT1 null genotypes appear to be a risk factor for men, while in the women it is noticed the prevalence of GSTT1 present genotype.

Keywords

Glutathione S-transferase, Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, Oxidative Stress.

Índice

INTRODUÇÃO	1
DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	1
A Neurodegeneração e o Stress Oxidativo	1
<i>Doença de Alzheimer</i>	2
Classificação	3
Etiopatogenia	3
Stress oxidativo e a neuro-inflamação	4
Stress oxidativo e a mitocondria	5
Stress oxidativo e a Apoptose	5
<i>Doença de Parkinson</i>	6
Classificação	6
Etiopatogenia	6
Stress oxidativo e a neuro-inflamação	8
Stress oxidativo e a mitocondria	8
GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)	9
<i>Classificação</i>	9
<i>Estrutura e Dimerização</i>	10
<i>Função</i>	10
<i>Mecanismos de Ação</i>	11
Destoxificação via conjugação da GSH para GST	11
Síntese de hormonas esteroides	11
Atividade de sulfatase	11
Atividade de maleilacetoacetato isomerase	12
Atividade de desidroascorbato redutase	12
Atividade da Prostaglandina D sintase	12
Atividade de ligação ao ligando não-substrato (<i>non-substrate-ligand-binding</i>)	12
<i>Polimorfismos em estudo – GSTM1 e GSTT1</i>	12
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
POPULAÇÃO EM ESTUDO	15
RECOLHA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	15
EXTRAÇÃO DE DNA	16
AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR	16
ELETROFORESE	18
ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
RESULTADOS	19
POLIMORFISMO GSTM1	19
POLIMORFISMO GSTT1	21
POLIMORFISMOS GSTM1 E GSTT1	22
POLIMORFISMOS GSTM1 E GSTT1 EM FUNÇÃO DA IDADE	24
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXOS	40
CONSENTIMENTO INFORMADO	40

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes mecanismos patogénicos que podem levar à neurodegeneração (retirado de Federico et al. 2012)	2
Figura 2 - Mecanismos que foram propostos para a degeneração neuronal na Doença de Alzheimer, tendo como base o stress oxidativo (retirado de Cai et al. 2011).	3
Figura 3 - Representação do potencial ciclo vicioso entre a neuro-inflamação e o stress oxidativo (retirado de Cai et al., 2011).....	4
Figura 4 - Mecanismos que contribuem para a neurodegeneração nos neurónios dopaminérgicos da substância nigra na Doença de Parkinson. As setas duplas a azul indicam mecanismos que são tóxicos por si só, mas que também influenciam outros mecanismos aumentando a toxicidade. As estruturas de dupla hélice representam as mutações génicas mais comuns na Doença de Parkinson, e indicam onde a proteína pode interferir com as funções celulares (retirado de Dexter & Jenner 2013).....	7
Figura 5 - Produtos de genes associados à Doença de Parkinson que afetam a função mitocondrial e o stress oxidativo (retirado de Henchcliffe & Beal 2008).....	8
Figura 6 - Monómero da enzima <i>Wild-type</i> GST. Nesta figura encontra-se representada a subunidade 1 (a branco) e a subunidade 2 (a azul). O ponto de ligação H (a verde) e o ponto G (a vermelho) da subunidade 1. Resíduos da subunidade 2 ligado ao ponto G da subunidade 1 (a laranja) (retirado de Dourado et al. 2008).	10
Figura 7 - Imagens do gel de agarose quando se incide a luz UV para análise do genótipo. À esquerda, temos o marcador de DNA (M), um exemplo do genótipo GSTM1 presente (P) e do genótipo GSTM1 ausente (A). À direita, temos o marcador de DNA (M) e um exemplo de GSTT1 presente (P). A banda presente em ambas as imagens é referente ao <i>housekeeping gene</i> (β -actina), nos 631pb.	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Mutações genéticas mais comuns na Doença de Parkinson familiar (retirado de Dexter and Jenner 2013).	6
Tabela 2 - Distribuição da Glutathione S-Transferase nos tecidos humanos (retirado de (Sherratt & Hayes 2002)	13
Tabela 3 - Reagentes por tubo de reação de PCR, para cada um dos genes (GSTM1 e GSTT1).17	

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.1800$)	20
Gráfico 3 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.7584$).....	21
Gráfico 4 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0592$)	21
Gráfico 2 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p = 0.0522$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.1376$).....	21
Gráfico 6 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 1.0000$).....	22
Gráfico 5- Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p = 0.1641$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0365$).....	22
Gráfico 7 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0041$)	23
Gráfico 8 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino	23
Gráfico 9 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo masculino	24
Gráfico 10- Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson	25
Gráfico 11 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson	25
Gráfico 12- Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson	26

Gráfico 13 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer	26
Gráfico 14 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson.....	27
Gráfico 15 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer	28
Gráfico 16 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson.....	28
Gráfico 17 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer	29
Gráfico 18 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson	29

Lista de Acrónimos

AA	Ácido Ascórbico
ABAD	Proteína de Ligação do Álcool Desidrogenase
AMPA	Ácido Alfa-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol-Propiónico
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Percursora Amiloide
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
C32	Cisteína
COX	Citocromo C Oxidase
DHA	Desidroascorbato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DRP-1	<i>Dynamin-Like Protein</i>
FAA	Fumarilacetoacetato
Fas	Recetores de Morte Transmembranares
Fis1	<i>Mitochondrial Fission 1 Protein</i>
GS ⁻	Tiolato de GSH
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-Transferase
GSTA	Glutationa S-Transferase Alpha
GSTK	Glutationa S-Transferase Kappa
GSTM	Glutationa S-Transferase Mu
GSTO	Glutationa S-Transferase Omega
GSTP	Glutationa S-Transferase Pi
GSTS	Glutationa S-Transferase Sigma
GSTT	Glutationa S-Transferase Theta
GSTZ	Glutationa S-Transferase Zeta
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
IL-1	Interleucina 1
MAA	Maleilacetoacetato
MAPEG	<i>Membrane-Associated Proteins of Eicosanoids and Glutathione Metabolism</i>
Mnf-1	Mitofusina 1
Mnf-2	Mitofusina 2
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO ⁻	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻	Anião Superóxido

•OH	Radical Hidróxido
OPA1	Proteína de Atrofia Ótica
PGD ₂	Prostaglandina D2
PGH ₂	Prostaglandina H2
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 1
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

Introdução

Doenças Neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas é um termo genérico utilizado para um espectro de condições que afetam principalmente as células neuronais. De entre as células neuronais os neurónios têm sido os mais estudados em relação a este tipo de patologia. Os neurónios são células que constituem o sistema nervoso, e são células pós-mitóticas pelo que quando são danificadas ou morrem não há hipótese de substituição (Emerit et al. 2004).

As doenças neurodegenerativas são doenças incuráveis e debilitantes que resultam na progressiva degeneração e/ou morte das células nervosas. Este facto leva a que o doente apresente alterações nos movimentos (ataxia) ou que desenvolva demência (Guyton & Hall 2006).

No presente trabalho as doenças neurodegenerativas abordadas são a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Estas patologias têm em comum o facto de serem frequentemente associadas ao processo de stress oxidativo, razão pela qual é importante avaliar a capacidade de defesa antioxidante nestas patologias, como por exemplo os parâmetros genéticos das enzimas antioxidantes como a GST.

A Neurodegeneração e o Stress Oxidativo

Os neurónios são considerados umas das células mais ativas metabolicamente no organismo, pelo que há necessidade de manter o equilíbrio entre o oxigénio e a glucose para um correto e saudável funcionamento. Quando este equilíbrio é quebrado e a célula não tem capacidade para eliminar o excesso de radicais livres, passa a estar em stress oxidativo. O aumento de stress oxidativo contribui para a progressão do número de doenças neurodegenerativas (Smeyne & Smeyne 2013).

As células da glia (oligodendrócitos, microglia e astrócitos) são consideradas as células que dão suporte estrutural para ajudar no metabolismo e proteção dos neurónios, em particular a microglia assemelha-se aos monócitos/macrófagos. A barreira hemato-encefálica apenas permite a passagem de pequenas moléculas como a glucose e a maioria dos lípidos solúveis, no entanto moléculas de maior porte como os fagócitos não conseguem atravessa-la. Estas características e o facto de o cérebro utilizar grandes quantidades de oxigénio por volume de tecido quando comparado com outros órgãos, tornam o sistema nervoso central sensível ao stress oxidativo (Smeyne & Smeyne 2013; Emerit et al. 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são a causa do stress oxidativo no sistema nervoso. Estas espécies são produzidas em grande quantidade em condições patológicas, especialmente o óxido nítrico (NO[•]) proveniente da microglia ativa e de células endoteliais, já a principal fonte de ROS deriva da mitocôndria, no entanto existem outros fatores que também contribuem para o aumento das ROS (Figura 1). Tanto as ROS como as RNS estão envolvidas na apoptose (Emerit et al. 2004).

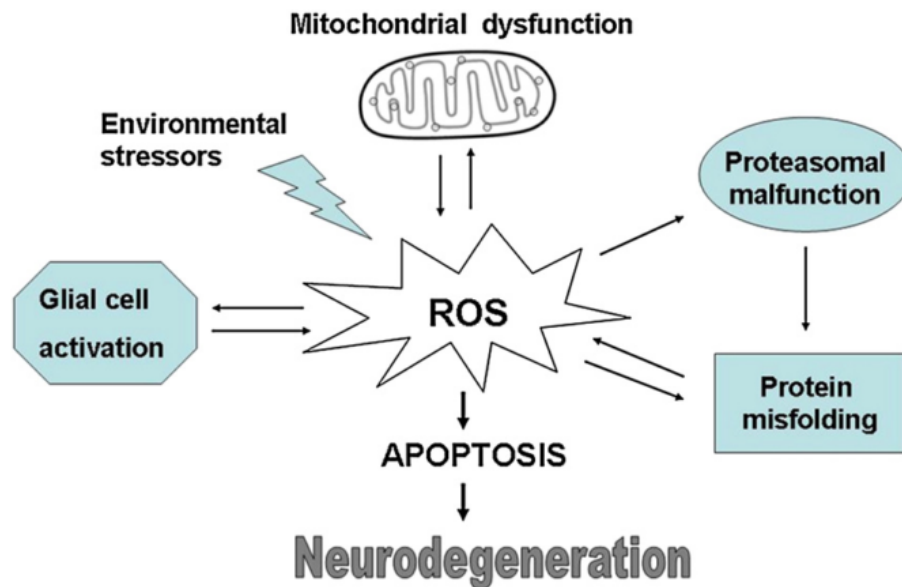


Figura 1 - Diferentes mecanismos patogênicos que podem levar à neurodegeneração (retirado de Federico et al. 2012)

Doença de Alzheimer

Ao nível mundial calcula-se que cerca de 36 milhões de pessoas são diagnosticadas com demência e todos os anos surgem 7,7 milhões de novos casos (Lundkvist et al. 2014). A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência entre as pessoas idosas, trata-se de uma doença neurodegenerativa e é caracterizada pelo declínio cognitivo progressivo que normalmente começa com a incapacidade de formar memórias recentes, afetando as funções intelectuais, o que resulta na diminuição da capacidade de uma pessoa cumprir as atividades da vida quotidiana e na morte prematura (Mayeux & Stern 2012; Guyton & Hall 2006)

Os tratamentos atuais não conseguem curar a doença, no entanto podem temporariamente abrandar o surgimento dos sintomas de demência e melhorar a qualidade de vida tanto dos doentes como dos familiares/pessoas que cuidam deles. Pelo que existe um esforço a nível mundial para descobrir novas e melhores maneiras para tratar a Doença de Alzheimer, atrasar o início dos sintomas e prevenir o seu desenvolvimento.

Classificação

A Doença de Alzheimer pode ser classificada quanto à idade de início da doença e quando ao historial familiar. Quanto à idade de início da doença existem dois grandes grupos, o de aparecimento precoce (com idades inferiores a 60/65 anos) e tardia (com idades superiores a 60/65 anos), sendo que a maior incidência de doentes é no surgimento tardio. Em relação ao historial familiar a Doença de Alzheimer pode ser classificada como autossômica dominante, familiar ou esporádica, esta última apresentando o maior número de casos.

Para ser considerada como autossômica dominante, pelo menos três indivíduos em duas ou mais gerações têm de apresentar a doença, sendo que dois dos indivíduos têm de ser parentes de primeiro grau. Para ser classificada como familiar, significa que a doença afeta mais que um indivíduo e pelo menos dois dos indivíduos afetados têm que ser parentes até ao terceiro grau. Para ser considerada esporádica são casos isolados ou os indivíduos são parentes acima do terceiro grau (Goldman et al. 2012).

Etiopatogenia

A Doença de Alzheimer é caracterizada por uma atrofia no hipocampo e córtex cerebral, esta atrofia está associada à dilatação simétrica dos ventrículos laterais, e pela presença de placas β -amilóides extracelulares e de emaranhados neurofibrilares intracelulares, que resultam da hiperfosforilação anormal da proteína tau (Alves et al. 2012).

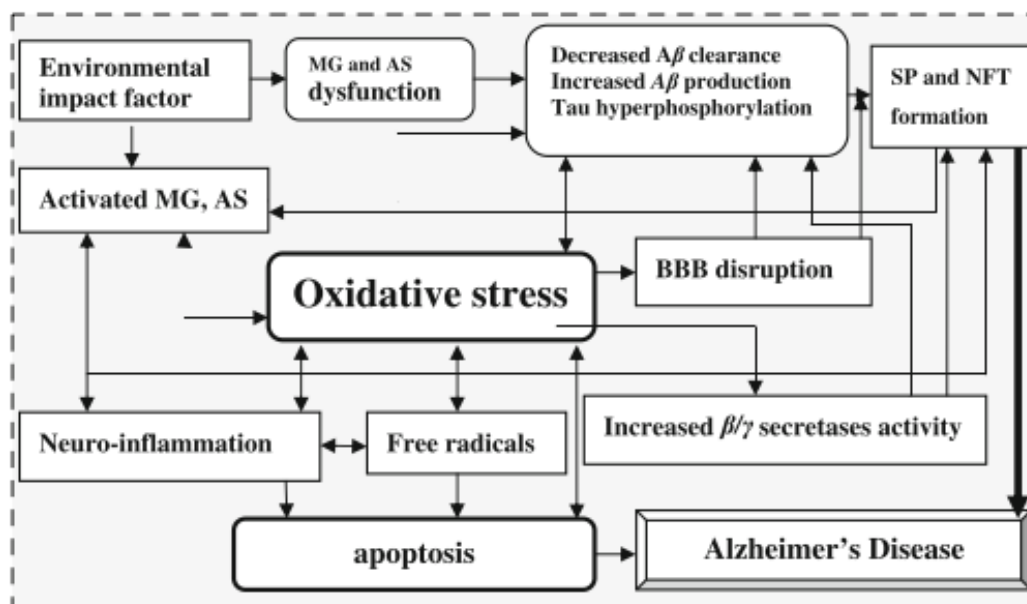


Figura 2 - Mecanismos que foram propostos para a degeneração neuronal na Doença de Alzheimer, tendo como base o stress oxidativo (retirado de Cai et al. 2011).

Estudos de genética molecular permitiram identificar quatro genes consistentemente associados com o maior risco de desenvolvimento da doença: proteína precursora amiloide (APP), apolipoproteína E (apoE), presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2). No entanto,

inúmeros estudos apontam para um papel importante de outros genes, fortalecendo a hipótese de uma doença poligénica e multifatorial (Mayeux & Stern 2012; Ramanan & Saykin 2013).

A deposição da proteína β -amilóide, devido a uma mutação APP, é a causa principal da Doença de Alzheimer, mas outros mecanismos foram propostos para a degeneração neuronal, como: disfunção mitocondrial, processos inflamativos (ativação da microglia e astrócitos), formação de radicais livres, stress oxidativo, fatores genéticos, fatores ambientais e apoptose. Estes fatores podem interagir e amplificar uns com os outros levando à disrupção sináptica, declínio cognitivo e finalmente a morte (Figura 2) (Alves et al. 2012; Cai et al. 2011).

Stress oxidativo e a neuro-inflamação

A neuro-inflamação parece ter um papel importante na progressão da Doença de Alzheimer e pode ser responsável pela degeneração das zonas vulneráveis do cérebro, tal como o hipocampo, uma vez que o stress oxidativo leva à formação de proteína β -amilóide e consequentemente a ciclo crónico de neuro-inflamação (Figura 3).

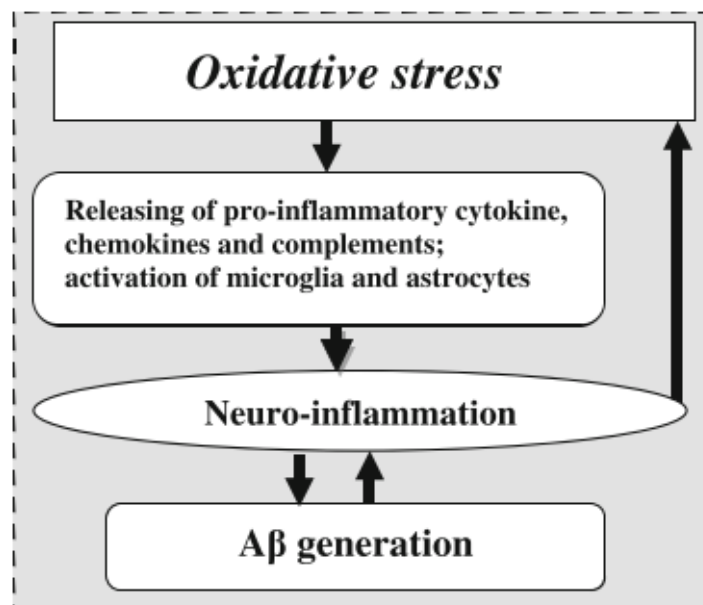


Figura 3 - Representação do potencial ciclo vicioso entre a neuro-inflamação e o stress oxidativo (retirado de Cai et al., 2011).

A neuro-inflamação pode ser considerada uma causa ou uma consequência do stress oxidativo crónico. As espécies reativas de oxigénio e azoto podem estimular a transcrição do gene pro-inflamatório na microglia e nos astrócitos, o que desencadeia uma série de reações inflamatórias. O aumento da resposta inflamatória por seu turno pode gerar mais ROS e RNS. (Cai et al. 2011)

O stress oxidativo leva à ativação da microglia e dos astrócitos, o que induz a expressão da interleucina 1 (IL-1), esta origina mais APP que promove os níveis e deposição da proteína b-amiloide, por sua vez a formação das placas vai aumentar a resposta inflamatória dando origem a um ciclo vicioso. (Cai et al. 2011; Butterfield et al. 2002)

Stress oxidativo e a mitocôndria

Existem vários aspetos que sugerem que o stress oxidativo e o funcionamento alterado da mitocôndria têm um papel na patogénese da Doença de Alzheimer. Experiências efetuadas em ratos transgênicos que expressam em excesso a APP mostram que esta proteína bloqueia a entrada de outras proteínas na mitocôndria, o que causa uma disfunção mitocondrial e prejudica o metabolismo energético (Anandatheerthavarada et al. 2003).

Em cérebros de doentes com Alzheimer e de ratinhos transgênicos, a proteína b-amiloide interage com a proteína de ligação da álcool desidrogenase (ABAD) (é uma proteína da matriz-mitocondrial), o que leva ao stress oxidativo mitocondrial e à atividade diminuída dos complexos respiratórios. Esta proteína também inibe o complexo cetoglutarato desidrogenase e reduz a atividade do citocromo c oxidase (COX). A reduzida energia da célula devido à inibição do complexo I e da COX promove a fosforilação da proteína TAU, o que originou a formulação da hipótese de que a disfunção mitocondrial e o stress oxidativo podem ter um papel importante na formação de emaranhados neurofibrilares e na neurodegeneração (Melov et al. 2007; Casley et al. 2002; Manczak et al. 2006).

Outra hipótese que surgiu foi o da proteína b-amiloide ter um papel importante na modulação das proteínas que processam a fissão/fusão mitocondrial. Em doentes com Alzheimer os tecidos do hipocampo apresentavam níveis baixos de *dynamamin-like protein* (Drp-1), proteína de atrofio óptico (OPA1), mitofusina 1 (Mfn1), mitofusina 2 (Mfn2) e níveis altos de Fis1, o que sugere que há um favorecimento da fissão mitocondrial (Wang et al. 2009).

Stress oxidativo e a Apoptose

O stress oxidativo contribui para o processo de apoptose através de ambas as vias (intrínseca e extrínseca). Na via extrínseca os agentes oxidantes ligam-se aos recetores de morte transmembranares (como o recetor Fas) da célula alvo e é induzida a apoptose. Na via intrínseca a apoptose é iniciada quando são libertados fatores/sinais da mitocôndria. (Cai et al. 2011)

A proteína b-amiloide para além de estar relacionada com o aumento do stress oxidativo, também está relacionada com a apoptose neuronal, uma vez que esta liga-se aos recetores membranares NMDA e AMPA, perturbando os níveis de cálcio no citosol e na mitocôndria. Os níveis excessivos de cálcio na mitocôndria provocam a desregulação desta levando à apoptose, quer por vias dependentes das caspases quer por vias independentes (Alberdi et al. 2010).

Doença de Parkinson

A seguir ao Alzheimer a Doença de Parkinson é a doença neurodegenerativa mais comum (Dexter & Jenner 2013). Tremores involuntários mesmo quando a pessoa se encontra em repouso e dificuldade em iniciar movimentos, são os sintomas clássicos da Doença de Parkinson. As principais características são bradiquisénia, rigidez, tremor, dificuldade em manter a postura, em falar e em engolir, e microfagia (Guyton & Hall 2006). No entanto a doença também apresenta sintomas não-motores como, depressão, distúrbios do sono e declínio cognitivo (Dexter & Jenner 2013).

Classificação

A Doença de Parkinson pode ser classificada quanto à idade de início dos sintomas da doença e quanto ao historial familiar. Quanto à idade de início da doença existem dois grandes grupos, o de aparecimento precoce (com idades compreendidas entre os 20 e 50/55) e tardia (com idades superiores a 55/60 anos), sendo que a maior incidência de doentes é no surgimento tardio. Em relação ao historial familiar a Doença de Parkinson pode ser classificada como esporádica ou familiar, esta última podendo ainda ser dividida em autossómica dominante e autossómica recessiva consoante a mutação genética (Tabela 1) (Dexter & Jenner 2013).

Tabela 1 - Mutações genéticas mais comuns na Doença de Parkinson familiar (adaptado de Dexter and Jenner, 2013).

Gene	Locus/doença	Tipo de herança	Idade de início dos sintomas (em anos)
SNCA	PARK1/4	Autossómica Dominante	20-85
LRRK2	PARK8	Autossómica Dominante	32-79
GRN	FTDP-17	Autossómica Dominante	45-83
MAPT	FTDP-17	Autossómica Dominante	25-76
DCTN1	Síndrome de Perry	Autossómica Dominante	35-61
PRKN	PARK2	Autossómica Recessiva	16-72
PINK1	PARK6	Autossómica Recessiva	20-40
DJ1	PARK7	Autossómica Recessiva	20-40
FBXO2	PARK15/PPS	Autossómica Recessiva	10-19
NR4A2/NURR1	-	Desconhecida	45-67
POLG	-	Desconhecida	20-26

Etiopatogenia

A Doença de Parkinson é caracterizada por uma grave degeneração dos neurónios dopaminérgicos presentes na substância *nigra* do mesencéfalo e pela presença de Corpos de Lewis (estes são acumulações citoplasmáticas de proteínas agregadas) (Cornetta et al. 2013).

O papel dos Corpos de Lewis na Doença de Parkinson ainda não é conhecida, no entanto a sua formação deve-se a uma mutação no gene da α -sinucleína, que provoca um “enrolamento incorreto” da proteína α -sinucleína e a sua conseqüente acumulação, acabando por originar os Corpos de Lewis (Baba et al. 1998).

À semelhança da Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson apresenta fatores de riscos genéticos e fatores de risco não genéticos, como por exemplo, a exposição a certos metais pesados ou toxinas orgânicas leva a um maior risco de surgimento da Doença de Parkinson ou a um início precoce da mesma. Indivíduos com traumatismos crânio-encefálicos significativos e que estejam expostos a pesticidas e manganês também apresentam um risco elevado (Figura 4) (Schapira 2006).

Pensa-se que polimorfismos em enzimas que envolvem o metabolismo oxidativo e a detoxificação estão envolvidos na predisposição genética para doença, uma vez que estudos feitos em cérebros de doentes com Parkinson demonstraram um aumento do índice de stress oxidativo, um aumento dos níveis de ferro e da peroxidação lipídica, uma diminuição da atividade do complexo I da mitocôndria e dos níveis de glutatona na substância *nigra* (Cornetta et al. 2013; Kelada et al. 2003).

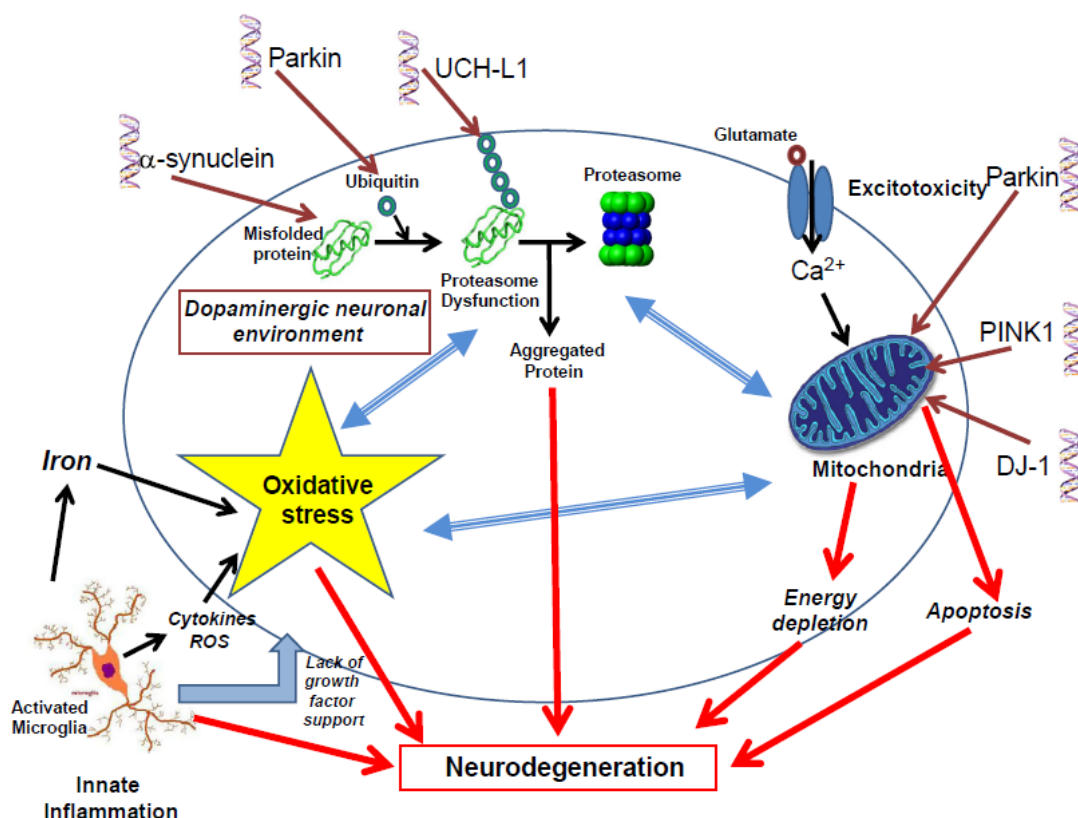


Figura 4 - Mecanismos que contribuem para a neurodegeneração nos neurónios dopaminérgicos da substância *nigra* na Doença de Parkinson. As setas duplas a azul indicam mecanismos que são tóxicos por si só, mas que também influenciam outros mecanismos aumentando a toxicidade. As estruturas de dupla hélice representam as mutações genéticas mais comuns na Doença de Parkinson, e indicam onde a proteína pode interferir com as funções celulares (retirado de Dexter & Jenner 2013).

Stress oxidativo e a neuro-inflamação

Em estudos *post-mortem* de doentes com Parkinson são encontrados astrócitos, microglia e até mesmo alguns linfócitos na substância *nigra*, o que de certa maneira justifica os níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias encontradas nessa zona (Hirsch & Hunot 2009). No entanto estes estudos *post-mortem* não permitem afirmar se a neuro-inflamação é uma causa de degeneração neuronal ou uma consequência da mesma.

Estudos *in vitro* sugerem que a deposição da proteína α -sinucleína e a resposta inflamatória potenciam a atividade patogénica um do outro levando à neurodegeneração. A microglia ativa promove a produção de radicais livres, estes por sua vez vão potenciar a existência de disfunções proteicas, que fazem com que a célula entre em stress oxidativo e ative a microglia, estabelecendo-se assim um ciclo vicioso de neurodegeneração (Gao et al. 2011)

Stress oxidativo e a mitocondria

Cada vez mais se estabelece o resultado dos polimorfismos genéticos à Doença de Parkinson e o efeito que os mesmos têm na morfologia e função da mitocondria e no stress oxidativo (Figura 5).

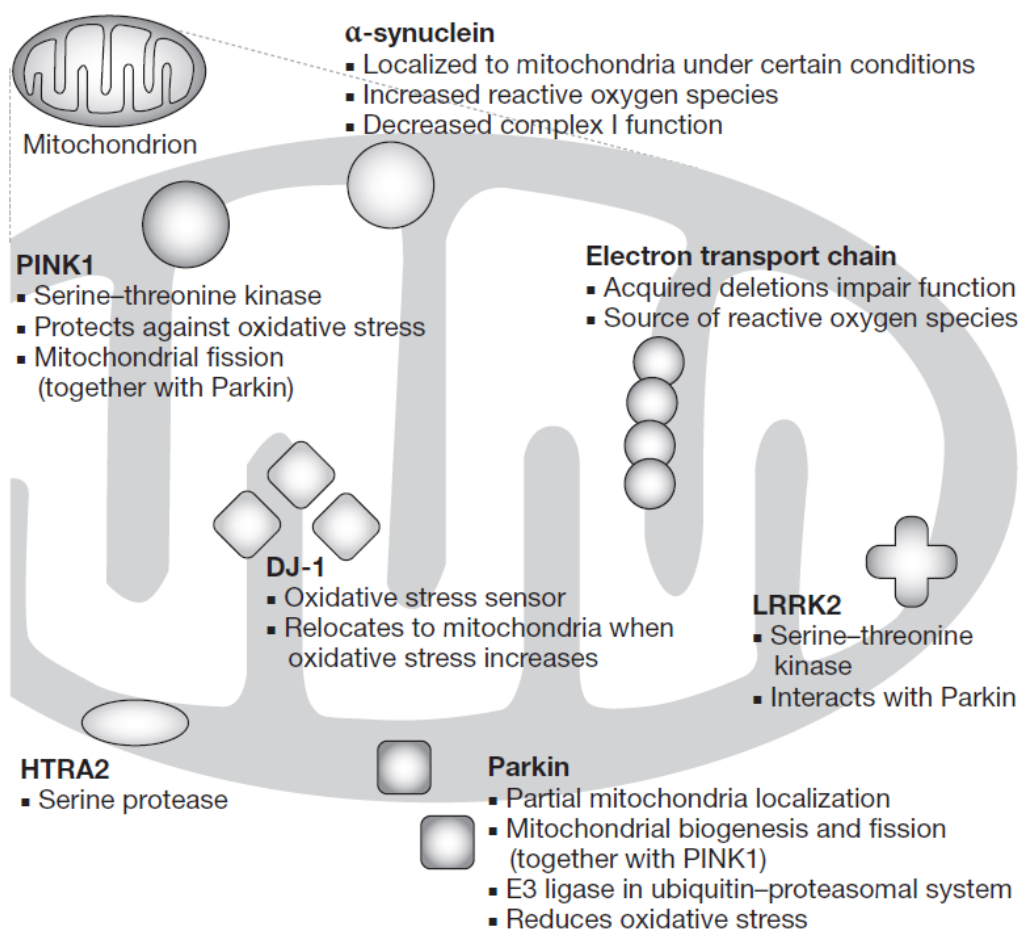


Figura 5 - Proteínas e genes associados à Doença de Parkinson que afetam a função mitocondrial e o stress oxidativo (retirado de Henchcliffe & Beal 2008).

Glutathione S-Transferase (GST)

A Glutathione S-Transferase (GST) é uma superfamília de enzimas multifuncionais que participam na destoxificação celular e na proteção das macromoléculas do ataque dos eletrólitos reativos. As GSTs catalisam a conjugação da glutathione (GSH, forma reduzida da GST), a centros eletrofílicos de uma variedade de substratos, de modo a torna-los mais solúveis em água, facilitando a excreção (Strange et al. 2001; Strange et al. 2000).

Os processos de respiração aeróbica podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (como por exemplo o anião superóxido O_2^- , o peróxido de hidrogênio H_2O_2 e o radical hidroxilo $\bullet OH$), os ataques destes radicais livres às membranas lipídicas produtos de peroxidação lipídica, o que pode levar à destruição da membrana. As GSTs têm a capacidade de reduzir esses compostos (Sherratt & Hayes 2002; Hayes et al. 2005).

Classificação

As GSTs podem ser classificadas, quanto à atividade, em dois grupos distintos: as solúveis, que podem ser proteínas citosólicas e/ou mitocondriais, e as não solúveis, que se encontram expressas na membrana celular, denominadas de MAPEG (*Membrane-Associated Proteins of Eicosanoids and Glutathione metabolism*) (Strange et al. 2001).

As transferases solúveis são todas proteínas diméricas e as subunidades que estão mais relacionadas podem formar heterodímeros, ou seja, subunidades dentro da mesma classe (como por exemplo GSTM1-M1 ou GSTM1-M2). Por seu turno as enzimas MAPEG são triméricas e não há evidências que estas possam formar heterodímeros (Sherratt & Hayes 2002).

O grupo maior é o das proteínas solúveis e estão principalmente envolvidas na biotransformação de xenobióticos e endobióticos tóxicos. As proteínas não solúveis (MAPEG) estão mais envolvidas no metabolismo dos ácidos araquínoídeos (Strange et al. 2000).

As GSTs humanas solúveis contêm pelo menos 16 genes subdivididos em 8 classes designadas por: Alpha (GSTA), Mu (GSTM), Theta (GSTT), Pi (GSTP), Zeta (GSTZ), Sigma (GSTS), Omega (GSTO) e Kappa (GSTK). Pertencendo esta última às proteínas solúveis mitocondriais (Wang and Wang 2014)(Strange et al. 2001). As GSTs não solúveis, MAPEG, foram identificadas 6 humanas e subdividem-se em 3 classes: gp I, gp II e gp IV (Hayes et al. 2005).

As classes Alpha, Mu e Theta contêm múltiplas isoenzimas que parecem resultar de eventos de duplicação dos genes, recombinação génica e acumulação de mutações, o que sugere que as GSTs surgiram de um ancestral comum. Em contraste, a falta de homologia entre as proteínas MAPEG sugere que estas não têm um ancestral comum (Sherratt & Hayes 2002).

Estrutura e Dimerização

As GSTs são proteínas que formam homodímeros ou heterodímeros (ambas as subunidades têm de derivar da mesma classe de isoenzimas) e cada monómero tem um sítio de ligação específica para cada substrato (ponto G para a glutathione (GSH) e ponto H para o eletrofílico hidrofóbico). O ponto G só está completo depois da dimerização, porque está localizado numa fenda entre o domínio N-terminal de uma subunidade e o domínio C-terminal de outra (Figura 6). Esta característica está presente em todas as classes da GST e mostra uma alta especificidade para a GSH. Já o ponto H encontra-se no domínio C-terminal e a sua estrutura varia entre as GSTs, o que permite a ligação de um vasto espectro de compostos eletrofílicos tóxicos (Dourado et al. 2008).

O domínio N-terminal, um domínio semelhante a tioredoxina, contém uma cadeia de quatro folhas β , com as 3 cadeias em antiparalelo umas com as outras. O domínio C-terminal consiste de cinco ou seis hélices principais (α 4-8 ou α 4-9). As Classes Alpha, Theta, e Omega possuem uma hélice adicional (α 9) quando comparadas com as outras classes de GST. (Wu & Dong 2012).

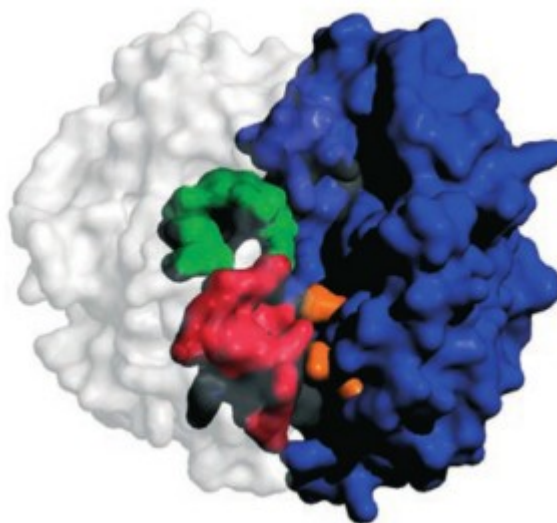


Figura 6 - Monómero da enzima *Wild-type* GST. Nesta figura encontra-se representada a subunidade 1 (a branco) e a subunidade 2 (a azul). O ponto de ligação H (a verde) e o ponto G (a vermelho) da subunidade 1. Resíduos da subunidade 2 ligado ao ponto G da subunidade 1 (a laranja) (retirado de Dourado et al. 2008).

Função

A principal função das GSTs é a de metabolizar e detoxificar químicos eletrofílicos, como fármacos, carcinogénicos ambientais e produtos de stress oxidativo (Wu & Dong 2012), que são responsáveis por lesões na membrana lipídica e no DNA. Para além do papel de agente antioxidante, as GSTs também tem um papel importante na síntese de esteroides, prostaglandinas e eicosanoides (Hayes et al. 2005).

Mecanismos de Ação

Destoxificação via conjugação da GSH para GST

As GSTs catalisam a conjugação do tripéptido glutationa (GSH; composto por aminoácidos de glutamato, cisteína e glicina), com uma ampla variedade de moléculas endógenas e exógenas que apresentam na sua estrutura grupos eletrolíticos funcionais. A biossíntese da GSH ocorre intracelularmente (exceto nas células epiteliais) pela ação consecutiva de duas enzimas: da γ -glutamilcisteína sintetase, responsável por originar L- γ -glutamilcisteína-L-cisteína através da junção da cisteína e do glutamato, e da GSH sintetase, que converte a L- γ -glutamilcisteína-L-cisteína em GSH (Pavarino et al. 2013).

O grupo eletrofilico do xenobiotico reage com a GSH, através da GST, para originar um composto mais solúvel. Para que a reação ocorra a GSH é ativada para a sua forma tiolato aniônico, de forma a tornar-se um nucleófilo forte e reagir com o substrato eletrofilico. Quando a GSH se liga ao ponto G, o valor de pKa do grupo tiol desce de 9,2 para cerca de 6,2-6,6 unidades de pH, o que promove a desprotonação da GSH (Dourado et al. 2008).

O local de ligação ao substrato da GSTA é mais eficiente no processamento de pequenas moléculas hidrofóbicas. Devido à ausência da hélice $\alpha 9$, as GSTMs têm um local ativo maior do que, por exemplo, as GSTAs. Isto é consistente com o fato de que os substratos da GSTM incluem agentes eletrofilicos volumosos, tais como epóxidos B1 de aflatoxina e dióis de benzopireno. Entre as GSTMs humanas, a GSTM1 é a catalisadora mais eficiente de vários substratos, como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (Wu & Dong 2012; Hayes et al. 2005)

Síntese de hormonas esteroides

As GSTs humanas têm um papel na biossíntese de hormonas esteroides (testosterona e progesterona) devido à sua atividade de isomerase de ligação dupla, que transforma D5-androsteno-3-17-diona em D4-androsteno-3-17-diona. O mecanismo para esta reação envolve o tiolato de GSH (GS^-) como um catalisador ácido-base que promove a libertação de um protão do C4 e inserção de um protão no C6 do núcleo esteroide. Dentro da família das GSTs, a GSTA3 é a que apresenta uma maior eficiência na atividade de isomerase de esteroides (Wu & Dong 2012; Hayes et al. 2005)

Atividade de sulfatase

A enzima GSTT2 apresenta uma elevada especificidade para a atividade de sulfatase, esta catalisa a libertação de iões sulfato de vários ésteres de sulfato de araquilo, tais como sulfato de 1-menaftil e sulfato de benzilo. A enzima GSTT2 tem a forma de um “bolso” que permite a ligação do grupo sulfato, essa característica deve-se à longa extensão do C-terminal (Wu & Dong 2012).

Atividade de maleilacetoacetato isomerase

A GSTZ1 (também conhecido como isomerase maleilacetoacetato) catalisa a isomerização cis-trans de maleilacetoacetato (MAA) para fumarilacetoacetato (FAA), que é o penúltimo passo no catabolismo da fenilalanina e da tirosina. Deficiências em enzimas ao longo desta via de degradação, leva ao aparecimento de doenças graves, como a fenilcetonúria. Embora o mecanismo exato da reação de isomerização seja desconhecido, esta é iniciada pelo ataque da GSH ao carbono α de MAA (Wu & Dong 2012; Sherratt & Hayes 2002).

Atividade de desidroascorbato redutase

As GSTOs apresentam atividade de desidroascorbato (DHA) redutase e desempenham um papel crucial na manutenção de ácido ascórbico (AA) no cérebro. O mecanismo pela qual o processo acontece não é totalmente conhecido, o estudo de (Zhou et al. 2012) sugere que o DHA vai ligar-se ao local de ligação específico para a GSH ponto G da GSTO1, e que a forma aniônica da cisteína (C32) vai doar um eletrão ao DHA, o que vai atrair o hidrogénio da GSH originando o AA. Os radicais resultantes de GS^- e $C32-S^-$, irão formar o sulfureto misto de GSH.

Atividade da Prostaglandina D sintase

A GSTS1 (também conhecida como prostaglandina D sintase) catalisa a isomerização da prostaglandina H_2 (PGH_2) a prostaglandina D_2 (PGD_2), um mediador das respostas de inflamação e de alergia. O local de ligação do substrato da GSTS1 tem a forma de três “bolsos”. Estes “bolsos” são usados para a ligação da cabeça de ciclopentano do PGH_2 . A reação de isomerização é iniciada por ataque nucleófilco do grupo tiol da GSH ao oxigénio do C11 da PGH_2 . As GS^- em solução vão provocar a clivagem da ligação O-S do C11 da PGH_2 , formando um grupo carboxilo, posteriormente o hidrogénio é transferido para o C9 originando a PGD_2 (Wu & Dong 2012; Hayes et al. 2005)

Atividade de ligação ao ligando não-substrato (*non-substrate-ligand-binding*)

As GSTs podem ligar-se a ligandos que não são os seus substratos específicos, estes substratos designam-se por ligando não-substrato incluindo bilirrubina, esteroides, e xenobióticos (a chamada função ligandina). A ligação de um ligando não-substrato para GSTs frequentemente, mas nem sempre, ocorre na interface do dímero. A ocupação do sitio de ligação do não-substrato por um ligando leva à inibição ou inativação da enzima (Wu & Dong 2012; Sherratt & Hayes 2002).

Polimorfismos em estudo - GSTM1 e GSTT1

Todas as espécies eucarióticas, possuem múltiplas isoenzimas de GSTs, contudo existem diferenças relativamente aos níveis de expressão e na sua distribuição nos tecidos, como se pode verificar na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição da Glutathione S-Transferase nos tecidos humanos (adaptado de Sherratt & Hayes, 2002)

Família	Classe	Proteína	Órgão
Solúvel	Alfa	GSTA1	Testículos ≈ fígado > rins > pâncreas
		GSTA2	Fígado ≈ testículos ≈ pâncreas > rins > cérebro
		GSTA3	Placenta
		GSTA4	Intestino grosso ≈ baço > fígado ≈ rins > cérebro
Solúvel	Mu	GSTM1	Fígado > testículos > cérebro > rins > pulmões
		GSTM2	Cérebro ≈ músculo esquelético ≈ testículos > coração > rins
		GSTM3	Testículos > cérebro ≈ intestino grosso > músculo esquelético
		GSTM4	Testículos
		GSTM5	Cérebro, coração, pulmões, testículos
Solúvel	Pi	GSTP1	Cérebro > coração ≈ pulmões ≈ testículos > rins ≈ pâncreas
Solúvel	Sigma	GSTS1	Fígado, medula óssea
Solúvel	Theta	GSTT1	Rins ≈ fígado > intestino grosso > cérebro ≈ próstata
		GSTT2	Fígado
Solúvel	Zeta	GSTZ1	Fígado, músculo esquelético
Solúvel	Omega	GSTO1	Fígado ≈ coração ≈ músculo esquelético > pâncreas > rins
Solúvel	Kappa	GSTK1	Fígado (mitocondria)
Insolúvel (MAPEG)	(microsomal)	MGST-I	Fígado ≈ pâncreas > próstata > colon ≈ rins > cérebro
		MGST-I-like-I	Testículos > próstata > intestino grosso ≈ colon
		MGST-II	Fígado ≈ músculo esquelético ≈ intestino grosso > testículos
		MGST-III	Coração > músculo esquelético ≈ glândula adrenal, tiroide
		LTC ₄ S	Pulmões > fígado
		FLAP	Pulmões ≈ baço ≈ timo > intestino grosso

O estudo de Rowe et al. (1997) e de Tasa et al. (1996), mostram que tanto a enzima GSTM1 como a GSTT1 se encontram expressas no cérebro, pelo que se torna importante o estudo das mesmas nas doenças neurodegenerativas.

Objetivos gerais e específicos

O objetivo principal deste trabalho é estudar a associação dos polimorfismos genéticos das GSTM1 e GSTT1 com as doenças de Alzheimer e Parkinson.

Para alcançar este objetivo principal é necessário:

- Determinar as diferenças na distribuição por genótipos dos polimorfismos “presente” ou “ausente” da GSTM1 e GSTT1 do grupo de pessoas com a Doença de Alzheimer e do grupo de pessoas com a Doença de Parkinson, e comparar com um grupo representativo da população em geral, denominado de grupo controlo;
- Analisar as diferenças existentes dentro do grupo de estudo (patologia, sexo, idade) com os polimorfismos GSTM1 e GSTT1.

Materiais e Métodos

População em estudo

A população em estudo é constituída por 58 indivíduos de nacionalidade Portuguesa, com idades compreendidas entre 61 e 93 anos, das quais 35 foram diagnosticados com Doença de Alzheimer e 23 com Doença de Parkinson. Das 35 pessoas diagnosticadas com Alzheimer 22 são do sexo feminino e 13 do sexo masculino, nos doentes Parkinsónicos, 11 são do sexo feminino e 12 do sexo masculino. Este grupo de doentes é acompanhado na consulta de Neurologia da Unidade Local de Saúde da Guarda pela Professora Doutora Maria Assunção Vaz Patto, que facultou as amostras necessárias ao estudo.

Para a análise dos resultados os doentes foram subdivididos em: doentes portadores de Alzheimer e doentes portadores de Parkinson, e em subgrupos de género (indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino).

A população controlo estudada neste trabalho é constituída por 154 pessoas, representativas da população geral, das quais 116 são mulheres e 38 são homens. O estudo da população controlo foi efetuado por outros investigadores do nosso grupo de trabalho, nomeadamente o Mestre Luís Crisóstomo (Crisóstomo 2013) e a Doutora Cristina Ramalhinho (Ramalhinho et al. 2011).

Antes da recolha das amostras, todos os indivíduos em estudo foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecedor, contendo todas as informações sobre o estudo, como o seu significado e o possível uso dos resultados. Aos mesmos coube autorizar ou não o armazenamento dos dados e materiais coletados. Estes foram mantidos sob a guarda dos orientadores e investigador, no laboratório do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Recolha e armazenamento das amostras

As amostras foram obtidas a partir de uma gota de sangue, obtido por uma picada no dedo da mão. A gota de sangue foi recolhida em de papel de filtro, que foram mantidos dentro de um envelope à temperatura ambiente. O papel de filtro foi utilizado devido à sua capacidade de absorção rápida da gota de sangue. Para além disso um estudo recente mostra que as amostras recolhidas em papel de filtro mantém a integridade e facilita o armazenamento (Choi et al. 2014).

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do método de Chelex® 100 (Bio-Rad®, Munich, Alemanha).

O Chelex® 100 trata-se de uma resina utilizada para purificar outros compostos através de troca iônica. É constituído por co-polímeros de estireno e divinilbenzeno com iões iminodiacetato emparelhados, que atuam como grupos quelantes de iões metálicos polivalentes de ligação. Apesar do Chelex® 100 ser classificado como uma resina de troca catiónica fraca, apresenta uma grande seletividade e afinidade para iões metálicos. Graças a esta afinidade as moléculas de DNA ficam protegidas da degradação por DNases, uma vez que a resina liga-se aos catiões de magnésio, que são um co-fator essencial para o funcionamento das DNases, e consequentemente leva à inativação destas (Hercules 2000).

Cortou-se uma pequena porção do papel contendo a mancha de sangue (aproximadamente 3mm²) e adicionou-se 50µL de TE, deixando a repousar *overnight* à temperatura ambiente.

Posteriormente foi adicionado 200µL de Chelex a 10% em TE a cada amostra, de seguida foram aquecidos na manta a 56°C durante 30 minutos e centrifugados a 13000 rpm durante 3 minutos. O DNA encontra-se no sobrenadante.

Sempre que no sobrenadante era visível uma contaminação por hemoglobina, extraia-se o sobrenadante e fazia-se a purificação, repetindo o processo de extração a partir do ponto onde se adiciona o 200µL de Chelex.

Amplificação do DNA por PCR

O PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método *in vitro* para amplificar sequências de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) específicos. O PCR foi utilizado neste trabalho para determinar se os genes em estudo (GSTM1 e GSTT1) estavam presentes ou ausentes, uma vez que amplificava as sequências pretendidas e depois eram analisadas por eletroforese.

O PCR mimetiza a replicação natural do DNA. Para efetuar o PCR utilizámos: Taq polimerase, dNTPs, *primers* dos genes de interesse e a amostra de DNA. Este método consiste em ciclos repetitivos (normalmente entre 30 a 40 ciclos) de três passos a diferentes temperaturas: desnaturação, hibridação ou *annealing* e extensão do DNA (Ishmael & Stellato 2008; Bej et al. 1991).

O primeiro passo do PCR consiste em separar a cadeia dupla de DNA, aquecendo a amostra a temperaturas que rondam os 90°C. No segundo passo a temperatura desce de modo a permitir a hibridação dos *primers* às cadeias complementares de DNA, a temperatura neste passo é específica para cada par de *primers* utilizado. No terceiro passo a mistura volta a ser

aquecida até aos 72°C, que é a temperatura ideal para o funcionamento da Taq polimerase, esta enzima é responsável pela síntese das novas cadeias de DNA, utiliza os *primers* como pontos de partida e os dNTPs presentes na mistura para gerar a cadeia complementar (Ishmael & Stellato 2008).

A repetição destes três passos resulta na duplicação do número de cópias em cada ciclo, seguindo assim um padrão exponencial até que atinge um patamar. Todo este processo de amplificação é possível através da utilização do termociclador, equipamento este que controla duração e a temperatura em cada passo de amplificação do DNA (Ishmael & Stellato 2008).

No presente trabalho, para além dos genes de interesse (GSTM1 e GSTT1), também se utilizou o gene da β -actina como controlo.

Tabela 3 - Reagentes por tubo de reação de PCR, para cada um dos genes (GSTM1 e GSTT1).

GSTM1	GSTT1	Fabricante
7.8 μ L Água Mili Q	7.8 μ L Água Mili Q	
0.5 μ L primer GSTM1 forward (10 pmol)	0.5 μ L primer GSTT1 forward (10 pmol)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA
0.5 μ L primer GSTM1 reverse (10 pmol)	0.5 μ L primer GSTT1 reverse (10 pmol)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA
0.5 μ L primer β -actina forward (10 pmol)	0.5 μ L primer β -actina forward (10 pmol)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA
0.5 μ L primer β -actina reverse (10 pmol)	0.5 μ L primer β -actina reverse (10 pmol)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA
1 μ L dNTP (100 nM)	1 μ L dNTP (100 nM)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA
2.5 μ L Taq polimerase Buffer	2.5 μ L Taq polimerase Buffer	NZYTech®, Lisboa, Portugal
1.5 μ L MgCl ₂ (1.5 nM)	1.5 μ L MgCl ₂ (1.5 nM)	NZYTech®, Lisboa, Portugal
10 μ L DNA	10 μ L DNA	(previamente extraído com Chelex® 100)
0.2 μ L Taq polimerase (1 U)	0.2 μ L Taq polimerase (1 U)	NZYTech®, Lisboa, Portugal

A sequência dos *primers* e os dados para a programação do termociclador TProfessional Basic (Biometria®, Göttingen, Alemanha), foram obtidos a partir de estudos feitos anteriormente com os mesmos *primers* para o GSTM1 e GSTT1 (Crisóstomo 2013). E antes de se dar início ao

estudo com as amostras de doentes com Parkinson e Alzheimer, todo o processo (extração e amplificação de DNA) foi otimizado com outras amostras de sangue em papel filtro, de modo a não se desperdiçar material necessário para o estudo.

Eletroforese

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas num determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Existem vários tipos de eletroforese, para o presente trabalho utilizou-se a eletroforese em gel de agarose. Durante a preparação do gel, os polímeros de agarose vão-se associar de forma não covalente formando uma malha/rede, cujos tamanhos dos poros irão dificultar ou facilitar a passagem das moléculas. Um dos principais componentes da molécula de DNA e RNA é o fosfato, este é carregado negativamente, pelo que quando se aplica um campo elétrico os fragmentos de DNA migram para o ânodo positivo. Como o DNA tem uma relação massa/carga uniforme, as moléculas de DNA são separadas por tamanho no gel de agarose, sendo que a distância percorrida é inversamente proporcional ao logaritmo do seu peso molecular (Lee et al. 2012).

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose Seakem® LE (Lonza Walkersville, EUA) a 2%, preparados em 50mL de tampão TAE e na presença de 15 µL de corante fluorescente Green-Safe (NZYTech®, Lisboa, Portugal). O processo de eletroforese decorreu durante 45 minutos, com uma diferença de potencial de 80V obtida através da fonte de alimentação PowerPac™ Universal Power Supply (Bio-Rad®, Múnich, Alemanha). As imagens do gel de eletroforese foram adquiridas posteriormente através do transluminador de UV FireReader (UviTech®, Cambridge, Reino Unido).

Os resultados foram analisados conforme presença ou ausência dos dois polimorfismos em estudo.

Análise Estatística

Os resultados foram agrupados e analisados estatisticamente, tendo sido considerado significativo um valor de $p \leq 0.05$.

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism® versão 5.00 para o Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, e foi utilizado o Teste Exato de Fisher para calcular o valor de p.

Resultados

A determinação do genótipo dos indivíduos em estudo foi obtida através da análise do gel de agarose a 2% e detetados por UV. A presença de GSTM1 é identificada através de uma banda presente no gel de eletroforese a rondar os 200pb, uma vez que o fragmento amplificado deste gene tem de comprimento 215pb, por sua vez a presença de GSTT1 é identificada através de uma banda presente no gel de eletroforese entre os 400 e os 500pb, para o fragmento correspondente a este gene tem um comprimento de 473pb. Quando não existem bandas nestes comprimentos os genes estão ausentes, como se pode observar na Figura 7.

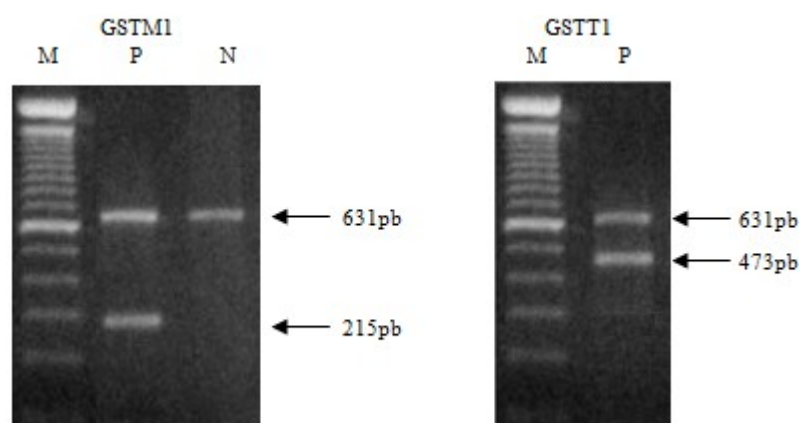


Figura 7 - Imagens do gel de agarose quando se incide a luz UV para análise do genótipo. À esquerda, temos o marcador de DNA (M), um exemplo do genótipo GSTM1 presente (P) e do genótipo GSTM1 ausente (A). À direita, temos o marcador de DNA (M) e um exemplo de GSTT1 presente (P). A banda presente em ambas as imagens é referente ao *housekeeping gene* (β -actina), nos 631pb.

Na determinação dos genótipos GSTM1 e GSTT1 não é possível identificar se os indivíduos neste estudo são homocigóticos ou heterocigóticos, uma vez que é apenas preciso um alelo para que o gene seja expresso. Porém permite-nos classificar como presente, indivíduos com uma ou duas cópias do gene e classificar como ausente indivíduos com deleções homocigóticas.

Polimorfismo GSTM1

Os resultados obtidos para a distribuição por frequências do genótipo GSTM1 “presente” ou “ausente” para os doentes de Alzheimer, doentes de Parkinson e grupo controlo estão representados nos gráficos 1, 2 e 3.

No geral temos uma diferença estatisticamente significativa entre a população controlo e a população com Alzheimer ($p < 0.0001$), essa diferença tal como se pode observar no gráfico 1

deve-se ao aumento do número de indivíduos a quem foi diagnosticado Alzheimer com o genótipo GSTM1 “ausente” e à diminuição de indivíduos com o genótipo GSTM1 “presente”. No grupo de Parkinson apesar de também haver maior número de indivíduos portadores do genótipo ausente a distribuição por frequência não é estatisticamente diferente do grupo controlo ($p=0.1800$).

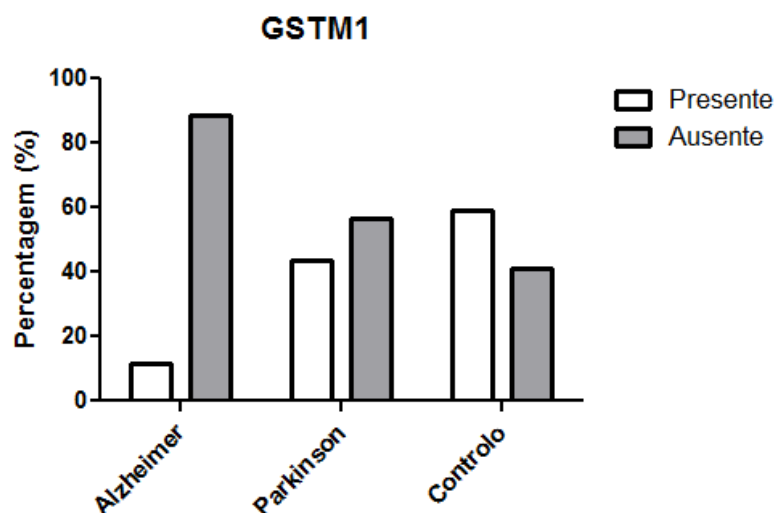


Gráfico 1 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente (Alzheimer vs Controlo: $p<0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p=0.1800$)

Os resultados obtidos no estudo da distribuição por frequências dos genótipos de polimorfismo ausente/presente da GSTM1 entre a população feminina e masculina estão representados no gráfico 2 e 3.

Nos indivíduos do sexo feminino verifica-se que tal como na população geral, existe uma diferença estatisticamente significativa entre a população controlo e a população com Alzheimer ($p<0.0001$), tal como se pode observar pelo gráfico 2 essa diferença deve-se ao aumento do número de indivíduos a quem foi diagnosticado Alzheimer, com o genótipo GSTM1 “ausente”. Ao analisar os resultados obtidos para a população feminina do grupo controlo e do grupo de doentes Parkinsónicos verificamos não existir diferença estatisticamente significativa ($p=0.7584$).

Nos indivíduos do sexo masculino apesar de se observar diferenças entre o grupo de doentes (Alzheimer e Parkinson) e o grupo controlo, estas não são estatisticamente significativas (Alzheimer vs Controlo: $p=0.0522$; Parkinson vs Controlo: $p=0.1376$). Contudo o número de indivíduos doentes com o genótipo “presente” é menor.

Estes resultados parecem indicar que a ausência de GSTM1 pode ser um possível fator de risco em relação ao aparecimento de Alzheimer, principalmente nas mulheres.

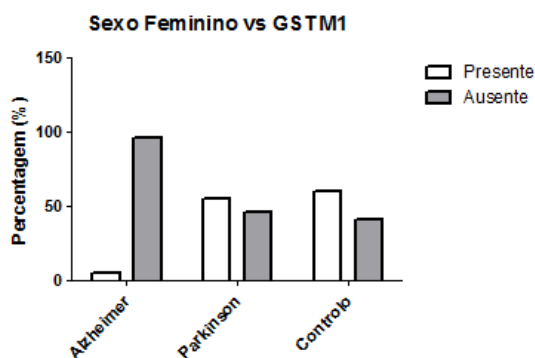


Gráfico 3 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.7584$)

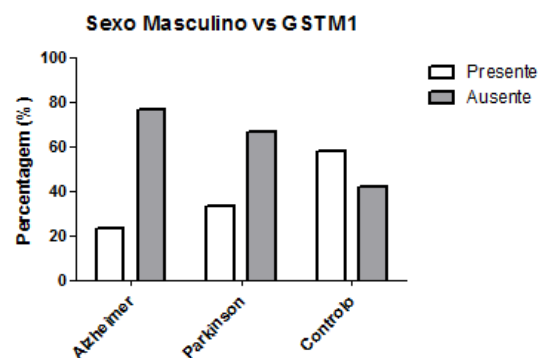


Gráfico 2 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente dos indivíduos do sexo masculino (Alzheimer vs Controlo: $p = 0.0522$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.1376$)

Polimorfismo GSTT1

Para analisar os resultados obtidos relativamente à associação do polimorfismo GSTT1 “presente” ou “ausente” na população em estudo, estudámos primeiro a população sem diferenciar por sexos. Tal como se pode observar no gráfico 4 uma diferença estatisticamente significativa entre a população controlo e a população com Alzheimer ($p < 0.0001$) essa diferença deve-se fundamentalmente ao aumento do número de indivíduos a quem foi diagnosticado Alzheimer com genótipo GSTT1 “ausente”, esta diferença não é observada no grupo de doentes com Parkinson ($p = 0.0592$).

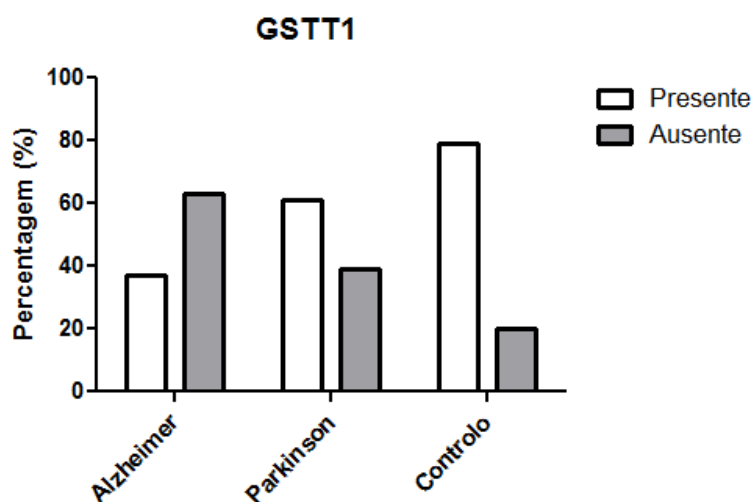


Gráfico 4 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0592$)

Os resultados obtidos no estudo da distribuição por frequências dos genótipos de polimorfismo ausente/presente da GSTT1 entre a população feminina e masculina estão representados no gráfico 5 e 6.

Nos indivíduos do sexo feminino a significância estatística mantém-se ($p < 0.0001$) pelo mesmo motivo apresentado no caso geral e no grupo de doentes com Parkinson não se encontra uma diferença estatisticamente significativa ($p = 1.0000$), como se observa no gráfico 5.

Nos indivíduos do sexo masculino apesar da percentagem de indivíduos a quem foi diagnosticado Alzheimer com o genótipo GSTT1 “ausente” ser relativamente maior que no grupo controlo (gráfico 6), esta diferença não é estatisticamente significativa ($p = 0.1641$). Porém, no caso dos doentes Parkinsónicos existe uma diferença estatisticamente significativa entre esta população e a população controlo ($p = 0.0365$).

Nos homens Parkinsónicos há influência quanto à “presença” ou “ausência” do genótipo GSTT1. O mesmo se verifica nas mulheres com Alzheimer.

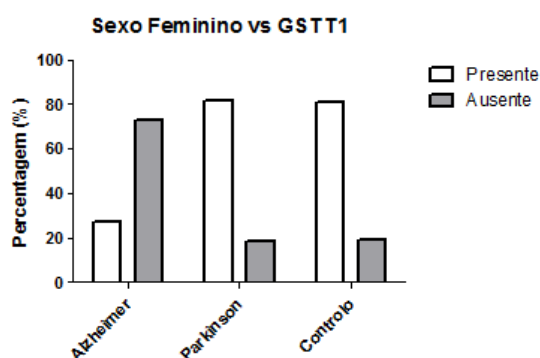


Gráfico 6 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 1.0000$)

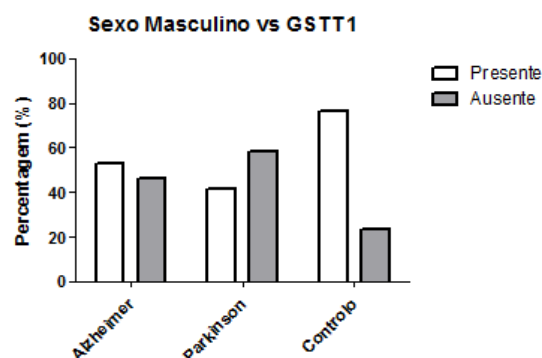


Gráfico 5- Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino (Alzheimer vs Controlo: $p = 0.1641$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0365$)

Polimorfismos GSTM1 e GSTT1

Para a análise da influência dos dois polimorfismos simultaneamente na população em estudo, estudámos primeiro a população sem diferenciar o sexo. Verificamos existir uma diferença significativa entre a população controlo e as populações com Alzheimer ou Parkinson (Alzheimer vs Controlo: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controlo: $p = 0.0041$) essa diferença tal como se pode observar pelo gráfico 7, deve-se fundamentalmente ao facto de existir um maior número de indivíduos a quem foi diagnosticado Alzheimer e Parkinson com ambos os genótipos (GSTM1 e GSTT1) “ausentes” e no caso dos doentes com Alzheimer também contribui o facto de existir um menor numero de doentes com ambos os genótipos (GSTM1 e

GSTT1) “presentes”. O genótipo GSTM1 “presente” e genótipo GSTT1 “ausente” não têm representação nas populações de Alzheimer e Parkinson.

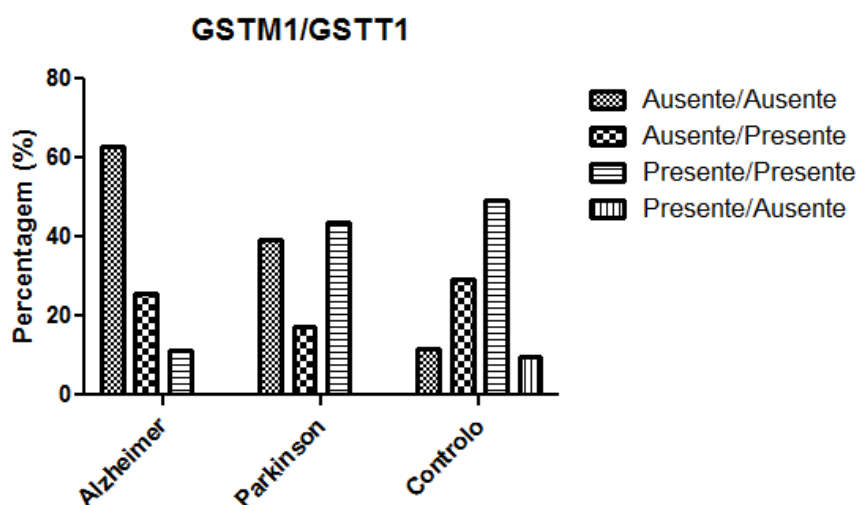


Gráfico 7 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente (Alzheimer vs Controle: $p < 0.0001$; Parkinson vs Controle: $p = 0.0041$)

Os resultados obtidos no estudo da distribuição por frequências dos genótipos de polimorfismos “ausente” ou “presente” da GSTM1 e da GSTT1 em simultâneo entre a população feminina e masculina estão representados no gráfico 8 e 9.

Nos indivíduos do sexo feminino, apesar do tamanho pequeno das amostras, podemos observar no gráfico 8 que a principal diferença entre a população controle e as populações de Alzheimer e Parkinson é o aumento do número de pessoas com ambos os genótipos (GSTM1 e GSTT1) “ausentes”, no Alzheimer ainda se verifica um menor número de pessoas com ambos os genótipos (GSTM1 e GSTT1) “presentes”.

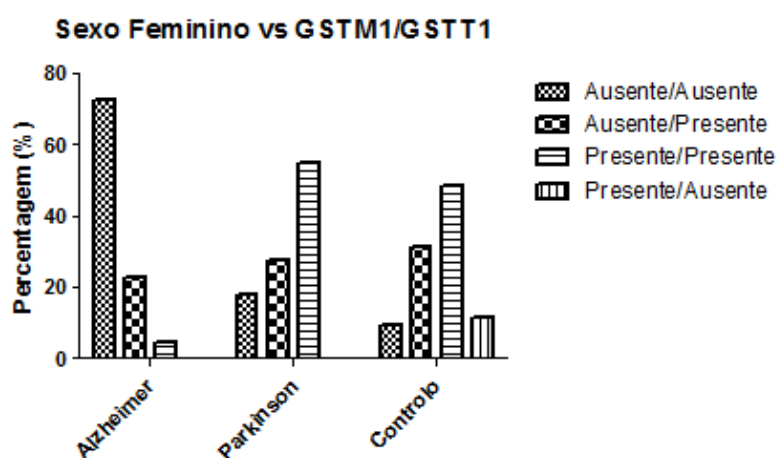


Gráfico 8 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo feminino

Nos indivíduos do sexo masculino e apesar do tamanho reduzido das amostras, podemos observar no gráfico 9 que a principal diferença entre o grupo controlo e os grupos de doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson é o número de pessoas com ambos os genótipos (GSTM1 e GSTT1) “ausentes”, no Parkinson ainda se verifica um menor número de pessoas com o genótipo GSTM1 “ausente” e o genótipo GSTT1 “presente”.

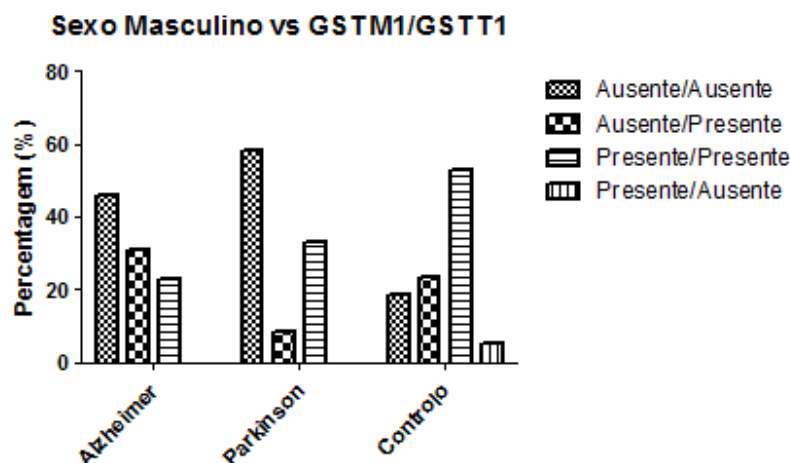


Gráfico 9 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente dos indivíduos do sexo masculino

Polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em função da idade

Para estudar a influência do polimorfismo GSTM1 (“presente” ou “ausente”), do polimorfismo GSTT1 (“presente” ou “ausente”) e dos dois polimorfismos simultaneamente na população em estudo, observámos primeiro a população sem diferenciar por sexo.

Apesar da amostra reduzida, a ausência de expressão do gene GSTM1 parece ser um fator de risco (gráfico 10), e quando observamos os indivíduos mais novos quer no Alzheimer quer no Parkinson apenas se encontra o genótipo “ausente”. Nos doentes com Alzheimer o número de indivíduos com o genótipo “ausente” é elevado em todas as idades no intervalo dos 60 aos 90 anos. Na população de doentes com Parkinson este aspeto acima referido é mais relevante nos doentes mais novos (50 a 60 anos) e na faixa etária mais elevada.

Tal como se pode verificar no gráfico 11, indivíduos com o genótipo GSTT1 “ausente” aparecem nas diversas faixas etárias até aos 80 anos. Na faixa dos doentes mais idosos (90 anos), não identificamos nenhum caso com a ausência de expressão. Ao contrário do que se observou nos doentes Parkinsónicos desta faixa etária.

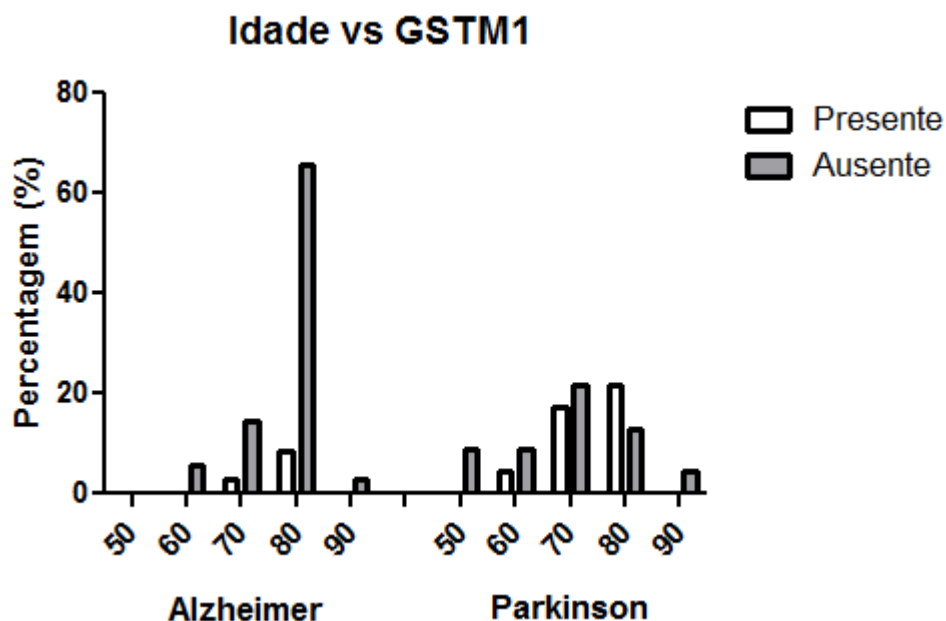


Gráfico 10- Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson

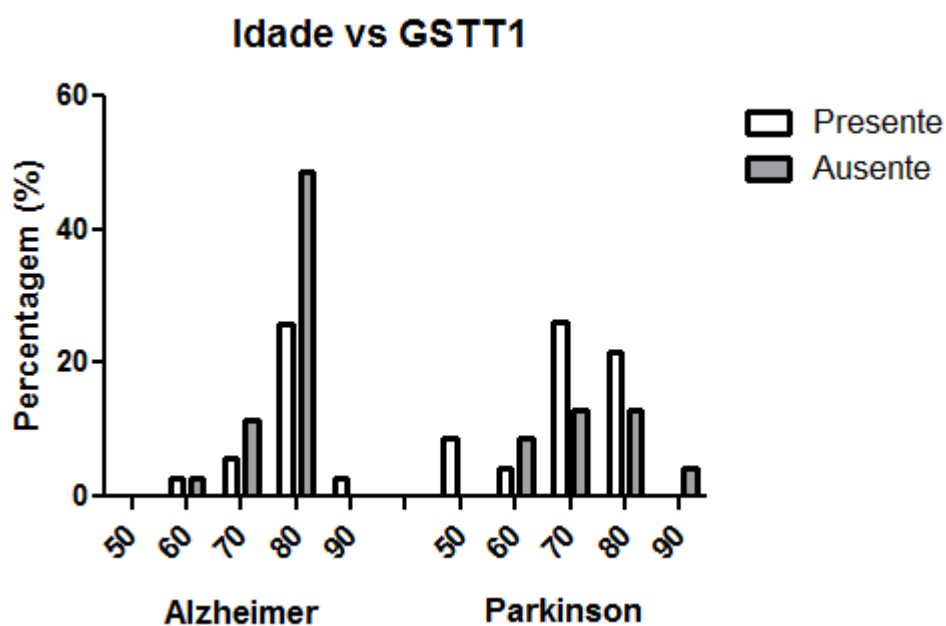


Gráfico 11 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson

No geral se compararmos os resultados dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 nas duas populações (Alzheimer e Parkinson) verificamos que a ausência de GSTM1 se torna evidente nos doentes com Alzheimer e nos doentes com Parkinson, e que a ausência de GSTT1 só por si não parece ser um fator diferenciador ao longo da idade quer nos indivíduos com Alzheimer quer nos indivíduos com Parkinson.

Quando observamos os dois polimorfismos (GSTM1 e GSTT1) em simultâneo verifica-se que a ausência de ambos os genes parece ter uma influência grande na faixa etária dos 80 anos em relação ao Alzheimer (gráfico 12).

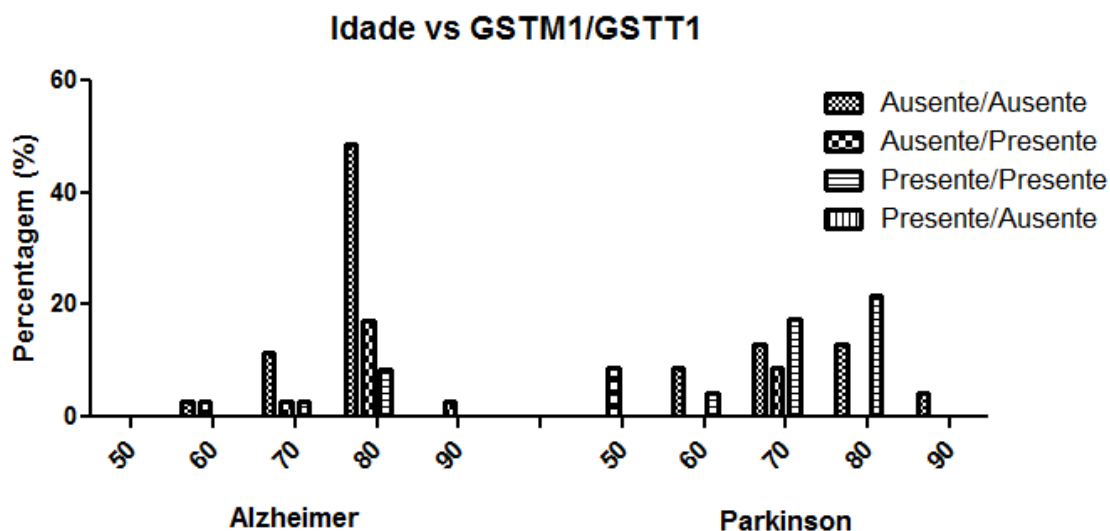


Gráfico 12- Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer e dos doentes com Parkinson

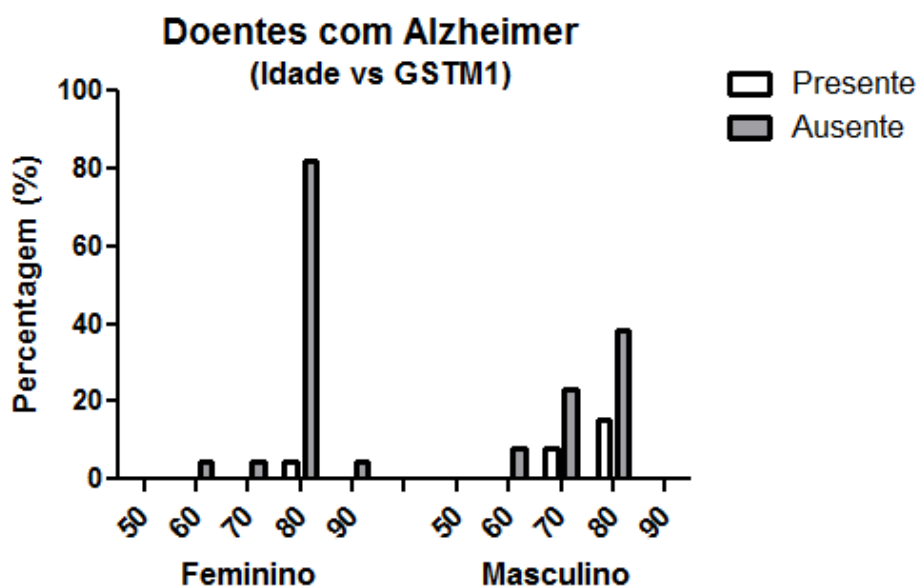


Gráfico 13 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer

Se compararmos as diferentes faixas etárias para homens e mulheres com a mesma patologia, verificamos que nos doentes com Alzheimer o genótipo GSTM1 “ausente” parece ser um fator de risco (gráfico 13), e quando observamos os indivíduos mais novos quer do sexo feminino quer do sexo masculino apenas se encontra o genótipo “ausente”. Nos doentes com Alzheimer

também se observa que o número de indivíduos com o genótipo “ausente” é elevado em todas as idades no intervalo dos 60 aos 90 anos. No grupo de doentes com Parkinson e nos indivíduos do sexo masculino verifica-se que existe um maior número de doentes com o genótipo “ausente” em todas as idades (50 a 90 anos). O mesmo não se verifica nos doentes Parkinsónicos do sexo feminino, em indivíduos mais novos (50 anos) apenas se observa o genótipo “ausente”, no entanto em indivíduos mais idosos (80 anos) nota-se um maior número de doentes com o gene GSTM1 “presente” (gráfico 14).

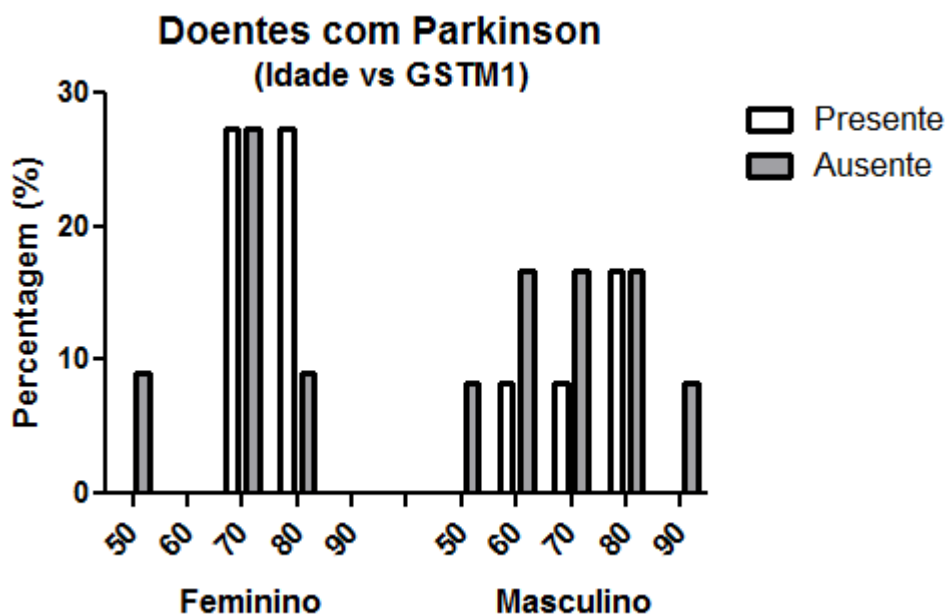


Gráfico 14 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTM1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson

Tal como se pode verificar no gráfico 15, em indivíduos mais novos do sexo feminino apenas se observa o genótipo GSTT1 “ausente” enquanto, que nos indivíduos do sexo masculino apenas se observa o genótipo “presente”. E ainda se observa que na faixa etária dos 80 anos, existe um maior número de doentes com o gene ausente em indivíduos do sexo feminino, nos indivíduos do sexo masculino verifica-se o oposto. Os doentes com Parkinson mais novos apenas apresentam o genótipo “ausente” em ambos os sexos (gráfico 16), e em indivíduos Parkinsónicos do sexo feminino verifica-se um maior número de doentes com o gene GSTT1 “presente” nas restantes faixas etárias (70 e 80 anos). Nos indivíduos do sexo masculino prevalece a ausência do gene nas faixas etárias de 60 e 70 anos, na faixa dos doentes mais idosos (90 anos), não identificamos nenhum caso com a presença de expressão.

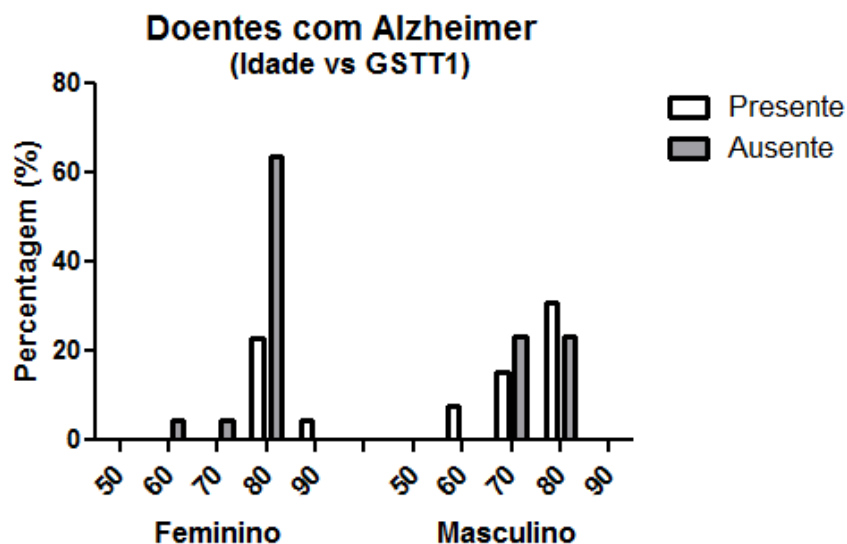


Gráfico 15 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer

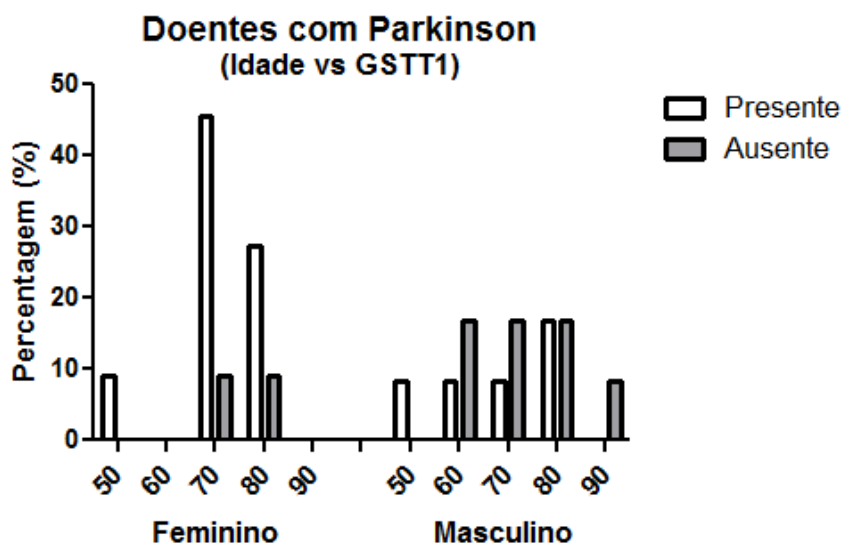


Gráfico 16 - Distribuição por frequências dos genótipos GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson

No geral se compararmos os resultados dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 nas duas populações (Alzheimer e Parkinson) e sub-populações (Sexo Feminino e Sexo Masculino), verificamos que a ausência de GSTM1 se torna evidente nos doentes com Alzheimer em ambos os sexos e nos doentes do sexo masculino com Parkinson, e que a ausência de GSTT1 afeta principalmente os indivíduos do sexo feminino com Alzheimer, enquanto a presença de GSTT1 é evidente nos doentes do sexo feminino com Parkinson.

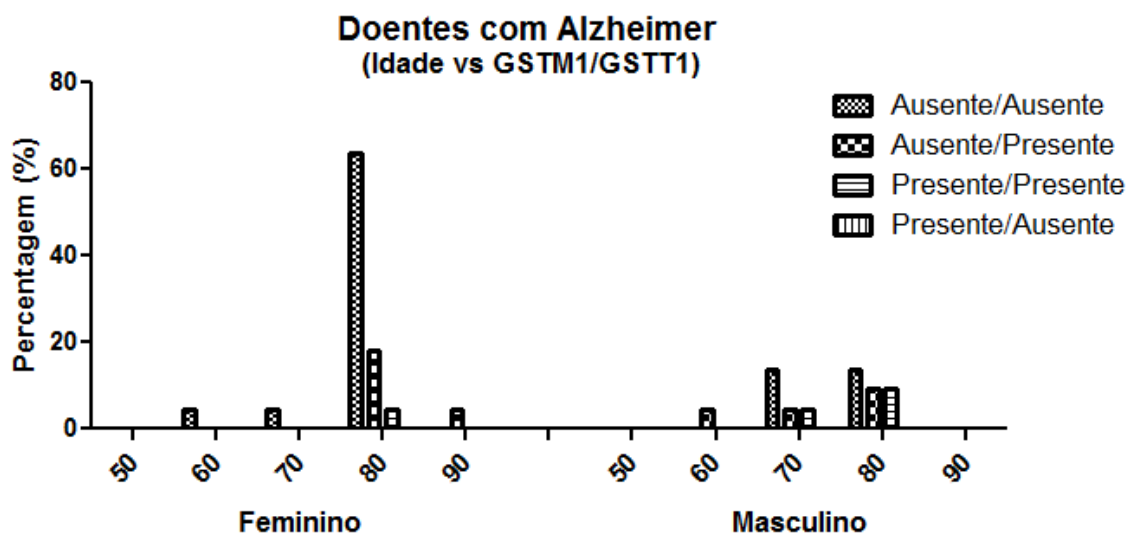


Gráfico 17 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Alzheimer

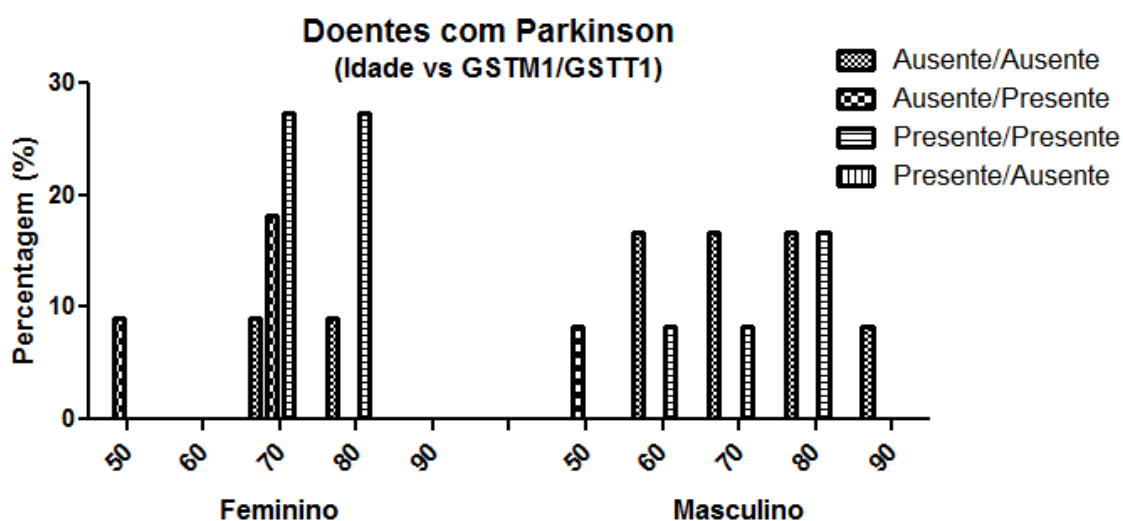


Gráfico 18 - Distribuição por frequências da combinação dos genótipos GSTM1 presente/ausente e GSTT1 presente/ausente em função da idade dos doentes com Parkinson

Quando observamos os dois polimorfismos (GSTM1 e GSTT1) em simultâneo verifica-se que a ausência de ambos os genes parece ter uma influência grande na faixa etária dos 80 anos em relação aos indivíduos do sexo feminino com Alzheimer (gráfico 17). No caso dos doentes com Parkinson a presença de ambos os genes parece ter alguma influência nas faixas etárias dos 70 e 80 anos em relação aos indivíduos do sexo feminino (gráfico 18).

Discussão

Ao analisarmos os aspetos mais evidentes que resultaram do nosso estudo, tais como:

- Os genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausente” serem mais prevalentes nas mulheres com a doença de Alzheimer.
- O genótipo GSTM1 “ausente” ser mais prevalente nas faixas etárias mais jovens.
- Os portadores do genótipo “ausente”, quer da GSTM1, quer da GSTT1 estarem em maior número na faixa etária dos 80 anos, no caso de indivíduos com a doença de Alzheimer, e na faixa etária dos 70 anos, os indivíduos com a doença de Parkinson.
- Na doença de Alzheimer prevalece o genótipo em que o GSTM1 está “ausente” independentemente da faixa etária e do sexo. Na doença de Parkinson este genótipo é mais prevalente no sexo masculino. Não de uma forma tão evidente o mesmo se passa para a GSTT1, mas no caso do Parkinson este genótipo GSTT1 “presente” é mais prevalente no sexo feminino

As patologias que estudamos têm em comum o facto de estarem associadas a processos de stress oxidativo (Yan et al. 2013; Federico et al. 2012) razão pela qual o estudo dos polimorfismos GSTT1 e GSTM1 se torna pertinente, sabendo que compostos como as catecolaminas (adrenalina, dopamina e estrogénio, por exemplo, podem promover ciclos redox com a formação de quinonas e radicais de oxigénio), e sabendo que está descrito o papel antioxidante que as GSTs representam (Hayes & McLellan 1999) parece-nos que os nossos resultados refletem este facto, no entanto os trabalhos que se encontram disponíveis nem sempre estão de acordo.

A principal causa da Doença de Alzheimer é a deposição da proteína β -amilóide, mas outros mecanismos foram propostos para a degeneração neuronal, e todos esses mecanismos têm como ponte de ligação o stress oxidativo, que acabam por funcionar como um ciclo vicioso que conduz ao aumento do stress oxidativo e à neurodegeneração (Alves et al. 2012). Torna-se importante a presença de GSTs para realizarem a detoxificação das células, uma vez que as GSTs têm como função bem promover a ligação do átomo de enxofre da glutatona a um centro elurofílico dos compostos tóxicos, aumentando assim a solubilidade e excreção dos mesmos (Mazzetti et al. 2015).

São poucos os estudos que se encontram na literatura sobre os polimorfismos do GSTM1 e do GSTT1 na Doença de Alzheimer. De et al. (2014) realizaram um estudo da distribuição dos genótipos GSTM1 E GSTT1 em 79 pessoas com a Doença de Alzheimer comparando com 100 pessoas saudáveis, nele se evidencia que o genótipo GSTM “ausente” com uma frequência significativa nos doentes com Alzheimer, o mesmo não se verifica para a GSTT1. Também

constataram que a combinação do genótipo GSTM1 “ausente” e do genótipo GSTT1 “presente” é mais frequente nos doentes com Alzheimer. O estudo de Piacentini et al. (2012) em doentes Italianos também revelou uma elevada frequência do genótipo GSTM1 “ausente” em portadores de Alzheimer. Já o estudo de Ghosh et al. (2012) numa população do norte da Índia, é evidenciado a frequência do genótipo GSTT1 “ausente” nos doentes com Alzheimer enquanto, que a ausência do GSTM1 por si só não parece ter grande influência na doença. Eles também demonstraram que indivíduos com pelo menos um genótipo (GSTM1 ou GSTT1) “ausente”, quando comparados com indivíduos com ambos os genótipos “presentes”, podem resultar em níveis baixos de GST e consequentes níveis elevados de stress oxidativo. Tal como os nossos resultados parece haver uma indicação que os genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausente” têm influência na doença de Alzheimer

A diferença encontrada entre homens e mulheres eventualmente está associada à presença de níveis aumentados de estrogénio nas mulheres, descrito como protetor (Nilsen et al. 2006). Quando a mulher entra na menopausa existe uma diminuição significativa nos níveis de estrogénio, os homens também sofrem diminuições significativas nos níveis de testosterona com a idade, mas esse declínio é mais gradual, e uma vez que a testosterona pode ser sintetizada em estrogénio, os homens não sofrem uma perda de estrogénios tão acentuada/grave como as mulheres, tendo assim mais uma proteção em relação a neurodegeneração (Mielke et al. 2014).

Estabelecendo a relação entre a idade e características socioeconómicas, um estudo recente (Pradier et al. 2014) em doentes franceses correlacionou a nota obtida no MMSE (*Mini-mental State Examination*, um teste que permite a deteção precoce de Alzheimer) com a idade e posteriormente com o grau académico, género e local de residência dos indivíduos, como potenciais fatores associados ao diagnóstico tardio da doença. O estudo demonstrou que a nota do MMSE diminuía com a idade, este efeito pode ser parcialmente explicado pelo declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento. Para além disso também mostrou uma forte correlação entre a nota do MMSE e o grau de escolaridade, e entre o grau de escolaridade e o sexo. Quanto maior é o grau de escolaridade maior é a nota do MMSE, tratando-se de pessoas que atualmente têm mais de 80 anos, no seu tempo de mocidade era normal serem os homens mais letrados que as mulheres, possível razão pela qual as mulheres são diagnosticadas em estágios mais avançados de declínio cognitivo do que os homens. Além disso, as mulheres vivem mais tempo do que os homens e apresentam uma maior resistência em ir ao médico, a profissão que desempenham e o estilo de vida também têm a sua cota parte de contribuição para o diagnóstico precoce ou tardio da doença.

Outro aspeto importante que este estudo revela, é que a nota do MMSE em doentes que vivem em instituições são mais baixas que os que vivem em casa. Isto pode ser devido ao facto de os pacientes que vivem nessas instituições serem menos independentes, pelo que o declínio cognitivo dos mesmos tem menos impacto sobre vida diária. Já a nota do MMSE de indivíduos

que moram em casa por conta própria diminui a um ritmo mais lento que os indivíduos que moram com a família, apoiando a hipótese que quem vive por conta própria mantém as capacidades cognitivas graças ao estímulo fornecido pelos requisitos necessários para uma vida independente.

Eventualmente a etiopatologia do Alzheimer parece ser diferente entre homens e mulheres, bem como parece ser diferente a etiopatologia do Alzheimer e do Parkinson nas mulheres.

Estudos feitos em cérebros de doentes com Parkinson demonstraram um aumento do índice de stress oxidativo, um aumento dos níveis de ferro e da peroxidação lipídica, uma diminuição da atividade do complexo I da mitocôndria e dos níveis de glutatona na substância nigra (Cornetta et al. 2013; Kelada et al. 2003), pelo que se pensa que polimorfismos em enzimas que envolvem o metabolismo oxidativo e a detoxificação estão envolvidos na predisposição da doença.

Os estudos que se encontram na literatura sobre os polimorfismos do GSTM1 e do GSTT1 em relação à Doença de Parkinson são, de certo modo, contraditórios. Os resultados obtidos em estudos com indivíduos caucasianos (Kelada et al. 2003) e com indivíduos indianos (Biswas et al. 2012), sugerem que os genótipos GSTM1 e GSTT1 não estão relacionados com Doença de Parkinson. Por seu turno (Stroombergen & Waring 1999) observou um aumento das frequências dos genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausentes” nos doentes parkinsonianos. Outro estudo relata um aumento significativo da frequência do genótipo GSTM1 “ausente” nos doentes com Parkinson (Perez-Pastene et al. 2007). Este estudo sugere que o genótipo GSTM1 “ausente” torna os indivíduos suscetíveis a um início precoce da doença.

Tal como no estudo de Stroombergen et al., os nossos resultados parecem indicar que os genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausente” têm uma ligeira influência na doença de Parkinson.

Existem diferenças entre ser homem e mulher na doença de Parkinson. Trata-se de uma doença que afeta maioritariamente os homens e para além disso, as mulheres tendem a ser mais velhas do que os homens aquando do início dos sintomas. Isto pode ser explicado pelo níveis iniciais de dopamina serem mais elevados nas mulheres, e à semelhança da Doença de Alzheimer, a presença de níveis aumentados de estrogénio nas mesmas (Haaxma et al. 2007).

Estabelecendo a idade com as características socioeconómicas, o facto de um indivíduo ter uma profissão que envolva solventes (clorados ou aromáticos), ou que trabalhe numa indústria com pesticidas, soldaduras, entre outros, acredita-se que poderá vir a desenvolver Parkinson (apesar do estudo recente de van der Mark et al. 2015 não ter encontrado relação aparente), e que influenciará a idade de surgimento da doença, dependendo de há quanto tempo e durante quanto tempo exerce a profissão, o que de certa forma acaba por justificar que o

Parkinson seja uma doença que afeta mais o sexo masculino, pois trata-se de profissões que comumente são exercidas por homens.

Conclusão

O stress oxidativo tem um papel importante nas patologias do Alzheimer e do Parkinson, pelo que as enzimas GSTs podem constituir um fator de risco para estas doenças. Este estudo apresenta algumas limitações, como o número reduzido da amostra em estudo e a falta de análise dos parâmetros de stress oxidativo. No entanto apesar das limitações, podemos concluir que de facto as GSTs estão envolvidas em ambas as patologias. No caso da Doença de Alzheimer é de salientar que principalmente o genótipo GSTM1 “ausente” é um fator de risco para o desenvolvimento da doença, independentemente do sexo e da idade do individuo. Na patologia do Parkinson, as conclusões não são tão incisivas, os genótipos GSTM1 e GSTT1 “ausentes” parecem ser um fator de risco para os indivíduos do sexo masculino, já nos indivíduos do sexo feminino o que se verifica é a prevalência do genótipo GSTT1 “presente”, o que nos leva a interrogar o papel das GSTs nesta doença.

Trabalhos futuros devem aumentar o número das amostras, e ter em atenção, para além da base genética envolta nas doenças, as características socioeconómicas e ambientais dos indivíduos em estudo de modo a esclarecer algumas dúvidas sobre o papel das GSTs nestas doenças.

Bibliografia

Alberdi, E. et al., 2010. Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, 47, pp.264-272.

Alves, L. et al., 2012. Alzheimer ' s disease : a clinical practice-oriented review. *Frontiers in Neurology*, 3(63), pp.1-20.

Anandatheerthavarada, H.K. et al., 2003. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of Cell Biology*, 161(1), pp.41-54.

Baba, M. et al., 1998. Short Communication Sporadic Parkinson ' s Disease and Dementia with. *American Journal of Pathology*, 152(4), pp.879-884.

Bej, a K., Mahbubani, M.H. & Atlas, R.M., 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26(3-4), pp.301-34.

Biswas, A. et al., 2012. Role of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 polymorphisms in Indian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism & related disorders*, 18(5), pp.664-5.

Butterfield, D.A. et al., 2002. Amyloid β -peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer ' s disease brain exists. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4, pp.193-201.

Cai, Z., Zhao, B. & Ratka, A., 2011. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 13(4), pp.223-50.

Casley, C.S. et al., 2002. β -Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of Neurochemistry*, 80, pp.91-100.

Choi, E.-H. et al., 2014. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong public health and research perspectives*, 5(6), pp.351-7.

Cornetta, T. et al., 2013. Epidemiological, clinical, and molecular study of a cohort of Italian Parkinson disease patients: association with glutathione-S-transferase and DNA repair gene polymorphisms. *Cellular and molecular neurobiology*, 33(5), pp.673-80.

- Crisóstomo, L., 2013. *Pilot-Model for oxidative post-competition recovery in swimmers*.
- De, P., Mendonc, E. De & Alcalá, E.S., 2014. Papel de las variantes GSTM1, GSTT1 y MnSOD en el desarrollo de enfermedad de Alzheimer de aparición tardía y su relación con el alelo 4 de APOE. *Elsevier Doyma*, (xx), pp.1-8.
- Dexter, D.T. & Jenner, P., 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, pp.132-144.
- Dourado, D.F. a R. et al., 2008. Glutathione transferase: new model for glutathione activation. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 14(31), pp.9591-8.
- Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(1), pp.39-46.
- Federico, A. et al., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences*, 322(1-2), pp.254-62.
- Gao, H.-M. et al., 2011. Neuroinflammation and α -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119(6), pp.807-14.
- Ghosh, T. et al., 2012. A preliminary study on the influence of glutathione S transferase T1 (GSTT1) as a risk factor for late onset Alzheimer's disease in North Indian population. *Asian journal of psychiatry*, 5(2), pp.160-3.
- Goldman, J.S. et al., 2012. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet Med.*, 13(6), pp.597-605.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E., 2006. *Tratado de Fisiologia Médica* 11th ed., Elsevier.
- Haaxma, C. a et al., 2007. Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(8), pp.819-24.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. & Jowsey, I.R., 2005. GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, (45), pp.51-88.
- Hayes, J.D. & Mcllellan, L.I., 1999. Glutathione and Glutathione-dependent Enzymes Represent a Co-ordinately Regulated defence Against Oxidative Stress. *Free Rad. Res.*, 31, pp.273-300.

Henchcliffe, C. & Beal, M.F., 2008. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice. Neurology*, 4(11), pp.600-9.

Hercules, A.N., 2000. Chelex 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. *Bio-Rad Laboratories*, (CA 94547).

Hirsch, E.C. & Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology*, 8(4), pp.382-97.

Ishmael, F.T. & Stellato, C., 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 101(4), pp.437-43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18939735> [Accessed January 17, 2015].

Kelada, S.N. et al., 2003. Glutathione S-transferase M1 , T1 , and P1 Polymorphisms and Parkinson ' s Disease. *Neuroscience Letters*, 337, pp.5-8.

Lee, P.Y. et al., 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (62), pp.1-5.

Lundkvist, J. et al., 2014. The battle of Alzheimer's Disease - the beginning of the future Unleashing the potential of academic discoveries. *Frontiers in pharmacology*, 5(102), pp.1-6.

Manczak, M. et al., 2006. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics*, 15(9), pp.1437-49.

Van der Mark, M. et al., 2015. Occupational Exposure to Solvents, Metals and Welding Fumes and Risk of Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 21(6), pp.635-639.

Mayeux, R. & Stern, Y., 2012. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8), pp.1-18.

Mazzetti, A.P. et al., 2015. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, 82, pp.10-8.

Melov, S. et al., 2007. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS one*, 2(6), p.e536.

Mielke, M.M., Vemuri, P. & Rocca, W.A., 2014. Clinical epidemiology of Alzheimer ' s disease : assessing sex and gender differences. *Dove Press Journal*, (Clinical Epidemiology), pp.37-48.

Nilsen, J. et al., 2006. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC neuroscience*, 7, p.74.

Pavarino, É.C. et al., 2013. Glutathione : Biosynthesis and Mechanism of Action. In N. Labrou & E. Fliemetakis, eds. *Glutathione: Biochemistry, Mecanism of Action...* Nova Science Publishers, Inc., pp. 3-33.

Perez-Pastene, C. et al., 2007. Association of GST M1 null polymorphism with Parkinson's disease in a Chilean population with a strong Amerindian genetic component. *Neuroscience letters*, 418(2), pp.181-5.

Piacentini, S. et al., 2012. GSTM1 null genotype as risk factor for late-onset Alzheimer's disease in Italian patients. *Journal of the neurological sciences*, 317(1-2), pp.137-40.

Pradier, C. et al., 2014. The mini mental state examination at the time of Alzheimer's disease and related disorders diagnosis, according to age, education, gender and place of residence: a cross-sectional study among the French National Alzheimer database. *PLoS one*, 9(8), p.e103630.

Ramalhinho, A.C., Fonseca-Moutinho, J.A. & Breitenfeld, L., 2011. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Molecular and cellular biochemistry*, 355(1-2), pp.265-71.

Ramanan, V.K. & Saykin, A.J., 2013. Pathways to neurodegeneration : mechanistic insights from GWAS in Alzheimer ' s disease , Parkinson ' s disease , and related disorders. *Am J Neurodegener Dis*, 2(3), pp.145-175.

Rowe, J.D., Nieves, E. & Listowsky, I., 1997. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases : interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *J. Biochem.*, 325, pp.481-486.

Schapiro, a. H.V., 2006. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 66(Issue 10, Supplement 4), pp.S10-S23.

Sherratt, P.J. & Hayes, J.D., 2002. 9 Glutathione S-transferases. In C. Ioannides, ed. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons Ltd, pp. 319-352.

Smeyne, M. & Smeyne, R.J., 2013. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine*, 62, pp.13-25.

Strange, R.C. et al., 2001. Glutathione- S -transferase family of enzymes. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482, pp.21-26.

Strange, R.C., Jones, P.W. & Fryer, A. a, 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112-113, pp.357-363.

Stroombergen, M.C.M.J. & Waring, R.H., 1999. Human & Experimental Toxicology Determination of glutathione S-transferase m and y polymorphisms in neurological disease. *Human & Experimental Toxicology*, 18, pp.141-145.

Tasa, G. et al., 1996. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione s-transferase T1-1. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 39(1), pp.21-29.

Wang, X. et al., 2009. The Role of Abnormal Mitochondrial Dynamics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.*, 109(Suppl 1), pp.153-159.

Wu, B. & Dong, D., 2012. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 33(12), pp.656-68.

Yan, M.H., Wang, X. & Zhu, X., 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free radical biology & medicine*, 62, pp.90-101.

Zhou, H. et al., 2012. Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. *Journal of molecular biology*, 420(3), pp.190-203.

Anexos

Consentimento Informado

Maria da Assunção Vaz Patto, neurologista na ULSG, e a realizar um projeto de investigação sobre doenças neurodegenerativas, solicita a sua permissão para a recolha de uma gota de sangue sua/ou do seu familiar para análise, de forma a recolher informação que possa esclarecer melhor a patologia da sua situação ou do seu familiar.

Informamos que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados; informamos ainda que todos os dados recolhidos serão confidenciais.

Consentimento Informado

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- Entregou esta informação
- Explicou o propósito deste trabalho
- Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do Investigador (Legível)

(Assinatura do Investigador)

(Data)

Consentimento Informado

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta informação, e teve tempo para as ponderar;
- Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas;
- O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente (Legível)

Representante Legal

(Assinatura do Doente ou Representante Legal)

(Data)

