



**PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA PARA A PATOLOGIA DO
SONO**

Implicações na sinistralidade e acidentes de trabalho

SANDRA FLORA DA SILVA BRÁS MAIA

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

Sandra Flora Silva Brás Maia

PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA PARA A PATOLOGIA DO SONO
Implicações na sinistralidade e acidentes de trabalho

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Medicina Legal submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto

Orientador – Prof. Doutora Berta Silva

Categoria – Professor Associado

Afiliação – Unidade Multidisciplinar de
Investigação Biomédica - Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar

Co-orientador Prof. Doutor Paulo Pinho e Costa

Categoria – Professor Auxiliar Convidado

Afiliação – Unidade Multidisciplinar de
Investigação Biomédica - Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar, Instituto Nacional
Saúde Dr. Ricardo Jorge

RESUMO

O sono é um processo passivo e a sua principal função é promover o repouso de todos os sistemas. Existem várias doenças relacionadas com o sono, que devem ser correctamente diagnosticadas e tratadas para a melhoria da qualidade de vida do doente.

Os principais sintomas relacionados com as doenças do sono são a sonolência diurna, fadiga excessiva, falta de concentração e de memória, ronco nocturno e insónia. As alterações no padrão de sono e descanso modificam o balanço homeostático, com repercussões na função psicológica, sistema imune, resposta comportamental e humor. As patologias do sono mais comuns são a narcolepsia, a hipersónia idiopática e o síndrome obstrutivo da apneia do sono. A narcolepsia é uma alteração do sono caracterizada por sonolência diurna, cataplexia, paralisia do sono, alucinações hipnagógicas e anormalidades no sono REM (*Rapid Eye Movement*). A hipersónia idiopática difere da narcolepsia por uma maior duração do sono e uma sonolência mais ou menos permanente durante o dia. O síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é definida como uma paragem da respiração ou interrupção das vias aéreas durante no mínimo 10 segundos, ocorre quando o esforço respiratório é iniciado mas o ar não chega a atingir os pulmões. Este processo pode repetir-se várias vezes durante a noite, tornando o sono superficial e fragmentado.

O conhecimento e estudo destas patologias do sono, poderá constituir um importante recurso no âmbito da Medicina Legal, na medida em que se tem verificado uma associação crescente entre distúrbios do sono e acidentes de viação, visto que existem indivíduos que são portadores de patologias do sono e que desconhecem tal facto provocando vários acidentes, muitos deles mortais. De referir que os indivíduos que têm conhecimento da sua doença provocam menos acidentes do que indivíduos saudáveis.

As patologias do sono, especialmente a narcolepsia, parecem resultar de uma combinação de factores genéticos e ambientais (alimentação, stress, drogas, entre outros). Um dos factores genéticos frequentemente associado à narcolepsia são os antigénios HLA-Classe II, sendo o alelo HLA-DRB1*1501, o mais associado. A serotonina é um neurotransmissor, isto é, uma molécula que intervém na comunicação entre as células do cérebro (neurónios). Este neurotransmissor desempenha um papel essencial na regulação de várias funções cerebrais incluindo aspectos distintos do sono, da cognição e dos afectos. A Serotonina é a mediadora responsável pelas fases III e IV do sono. Com este trabalho, pretendeu-se avaliar a contribuição do sistema HLA-DRB1 e do polimorfismo 102 T>C no gene HTR 2A na susceptibilidade à narcolepsia, hipersónia idiopática e síndrome de apneia obstrutiva do sono numa população do Norte de Portugal.

Foram estudados 95 indivíduos com patologias do sono (PS) previamente recrutados na consulta do sono do Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto. O grupo controlo era constituído por 282 indivíduos saudáveis (PC). A análise genética envolveu a

genotipagem do sistema HLA-DRB1 por PCR-SSP e a detecção do polimorfismo 102 T>C do gene HTR2A por PCR-RFLP.

Concluiu-se que o alelo HLA-DRB1*03 parece ser um factor de susceptibilidade geral às patologias do sono, uma vez que a sua frequência estava aumentada na população PS. O alelo HLA-DRB1*15 poderá ser um factor de susceptibilidade ao desenvolvimento de narcolepsia pois a sua frequência está aumentada neste grupo de doentes. Relativamente ao polimorfismo 102 T>C do gene HTR2A verificou-se que o genótipo 102CC poderá ser um factor de risco geral ao desenvolvimento de patologias do sono pois a sua frequência estava aumentada na população PS enquanto que o genótipo 102TT parece conferir protecção para o desenvolvimento destas patologias uma vez que a sua frequência estava diminuída na população PS. Os resultados encontrados neste estudo precisam de ser confirmados numa maior amostra e em outras populações.

ABSTRACT

Sleep is a passive process and its main function is to promote the repose of all systems. There are several diseases related to sleep, which must be properly diagnosed and treated to improve the quality of life of patients. The main symptoms related to sleep disorders are daytime sleepiness, excessive fatigue, decline of concentration and memory, insomnia and snoring at night. Changes in sleep patterns and rest modify the homeostatic balance that is reflected in psychological function, immune system, behavioural response and humour. The sleep pathologies more common are: narcolepsy, idiopathic hypersomnia and sleep apnoea.

The syndrome of obstructive sleep apnoea (OSA) is defined as a stopping of breathing or airway interruption for at least 10 seconds, occurs when the respiratory effort is initiated but the air does not reach the lungs. This process can be repeated several times during the night, making sleep superficial and fragmented.

The knowledge and study of these sleep pathologies, may be an important resource in the Forensic Medicine context, it has been described association between sleep disorders and road accidents, since there are individuals who have sleep pathologies and do not have knowledge of that fact, causing several accidents, many of them fatal. It should be noted that individuals who have knowledge of their disease cause less accidents than healthy individuals.

The sleep pathologies, specially narcolepsy, appear to result from a combination of genetic and environmental factors. Some genetic factors often associated with narcolepsy are HLA-Class II, being the HLA-DRB1*1501 allele the most associated. Serotonin is a neurotransmitter, that is, a molecule that is involved in communication between brain cells (neurons).

This neurotransmitter plays a key role in the regulation of various brain functions including different aspects of sleep, cognition and affection. Serotonin is the mediator responsible for phases III and IV of the sleep.

This study aimed to assess the contribution of HLA-DRB1 system and polymorphism 102 T>C in HTR 2A gene in the development of narcolepsy, idiopathic hypersomnia and sleep obstructive apnoea syndrome in a population of northern Portugal.

It was studied 89 patients with sleep disorders (PS) recruited from sleep outpatient clinic from Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto. These patients were compared with a cohort of 282 healthy individuals (PC) from north of Portugal. HLA-DRB1 genotyping was performed by PCR-SSP and the HTR2A 102 T>C polymorphism was assayed by PCR-RFLP.

The frequency of HLA-DRB1*03 allele was significantly increased in PS population compared to controls. The HLA-DRB1*15 allele was overrepresented in narcolepsy patients. The frequency of 102CC genotype was higher in PS population and the the

102TT genotype was underrepresented in the same population when compared to controls. These results should be replicated in a larger cohort and other populations.

AGRADECIMENTOS

Professora Doutora Berta Martins da Silva por me permitir realizar este trabalho, pela orientação, ensinamentos, encorajamento e confiança em mim depositada;

Professor Doutor Paulo Pinho e Costa pela disponibilidade e esclarecimentos fornecidos e ajuda preciosa na orientação prática;

Dr Cláudia Carvalho, Dr Bárbara Leal e Engenheira Andreia Bettencourt pela orientação prática, disponibilidade, carinho e amizade. Agradeço especialmente a imensa paciência, pela disponibilidade e companheirismo que tiveram;

Engenheira Dina Lopes, pelo apoio no laboratório, carinho e disponibilidade sempre demonstradas;

Dr Cristina Pereira, Dr Raquel Santos, Dra Ana Rita, Dr Cármen Queirós e Dr Helena Fonseca pelo incentivo e força, pelo carinho e forte disponibilidade e pelos momentos divertidos;

Doutor António Martins da Silva pela revisão teórica e esclarecimento das questões clínicas;

Doutor Luís Martins pelo apoio a nível laboratorial e disponibilidade demonstrada;

.

O meu marido, João Paulo e às minhas filhas Margarida e Carolina pelo apoio, força, compreensão e pela infinita paciência, que assim, tornaram este trabalho possível.

A minha família em especial aos meus pais , ao meu irmão e cunhada por acreditarem em mim, pelo incentivo e força transmitidos;

Espero corresponder sempre às vossas expectativas!

A todos os referidos anteriormente gostaria de deixar o meu mais profundo e sincero;

OBRIGADA.

INDICE

I-INTRODUÇÃO.....	12
1. O sono.....	13
1.1. Patologias do Sono.....	13
1.2. Diagnóstico e formas de tratamento.....	15
2. Serotonina.....	16
2.1. A Serotonina e o sono.....	18
3. O sistema imune.....	18
3.1. O MHC.....	20
3.1.1. HLA-Classe I.....	21
3.1.2. HLA-Classe II.....	22
3.1.3. HLA-Classe III	23
4. Patologias do sono e associação ao HLA.....	24
5. Patologias do sono e implicação Médico-legal.....	25
II-OBJECTIVO.....	28
III- MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1. População estudada.....	31
2. Material Biológico e tratamento das amostras.....	31
2.1. Colheita de amostras.....	31
2.2. Extracção do DNA genómico a partir de sangue periférico total.....	32
2.3. Quantificação das amostras.....	32
2.4. Qualidade das amostras.....	32
3. Tipagem HLA- Classe II.....	33
4. Análise dos polimorfismos- HRM.....	34
5. Análise dos polimorfismos- RFLP.....	36
6. Análise Estatística.....	38
IV- RESULTADOS.....	39
V-DISCUSSÃO.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	46

I – INTRODUÇÃO

1. O Sono

O sono é um processo natural, caracterizado por inactividade relativa, consciência reduzida e escassa reacção aos estímulos externos. Não só o número de horas que se dorme é importante, mas também a sua eficácia é fundamental para o bem-estar físico e psíquico do indivíduo. Existem várias patologias associadas ao sono, que influenciam o comportamento dos indivíduos no desempenho das actividades diárias, comportamento esse que em alguns casos se pode tornar fatal. Várias são as causas apontadas como factores perturbadores do sono como por exemplo factores ambientais, patologias sistémicas e psiquiátricas.

A estrutura normal do sono é constituída por 5 fases: I, II, III, IV do sono lento ou NREM (*Non Rapid Eyes Movement*), sem movimentos oculares rápidos, e sono paradoxal ou REM (*Rapid Eyes Movement*), movimentos oculares rápidos. [1] Estas fases são cíclicas e apresentam alterações fisiológicas e comportamentais específicas nos quais o sono e a vigília se alternam no tempo durante a noite. As perturbações do sono assumem várias formas, a insónia, a hipersónia, a redução da necessidade do sono e pesadelos [2]. Actualmente existe uma classificação de doenças de sono onde se podem distinguir cerca de 80 entidades.

As modificações no padrão de sono e repouso alteram o balanço homeostático do organismo, com repercussões sobre a função psicológica, sistema imune, resposta comportamental e humor.

1.1 Patologias de sono

Os sintomas mais frequentes das patologias do sono estão associados a um excesso de sono (hipersónia) ou redução de sono (insónia). As doenças do sono são classificadas em insónia, hipersónia, doenças da respiração relacionadas com o sono, doenças do movimento relacionadas com o sono, parassónias, doenças do ritmo cardíaco.

A apneia do sono é a principal doença causadora de hipersónica. O síndrome da apneia obstrutiva do sono caracteriza-se por colapsos repetidos das vias aéreas superiores durante o sono, resultando numa obstrução/redução parcial da ventilação (hipoapneia) ou ausência de ventilação (apneia). Quando o indivíduo desperta, a obstrução termina com conseqüente reabertura das vias aéreas, ocorrendo a hiperventilação e restabelecimento do movimento respiratório. Quando o indivíduo retoma o sono outra obstrução começa e a repetição destes episódios origina a fragmentação do sono e como conseqüência a

sonolência diurna, fadiga com conseqüente desenvolvimento de variadas patologias tais como, doenças cardiovasculares [4].

De entre as entidades causadoras de hipersónia encontramos, além da apneia, outras que têm características específicas é o que acontece com a hipersónia súbita por acessos que ocorre com ou sem quebra do tonus, e a narcolepsia quando em simultâneo também ocorre quebra do tónus e diz-se que há cataplexia. A cataplexia manifesta-se pela ocorrência de atonia muscular nomeadamente durante as emoções e o indivíduo apresenta quebra do tonus, por exemplo fraqueza nos joelhos com queda da mandíbula ou da cabeça e paralisia corporal, quando sorri ou fica zangado [3].

A narcolepsia é uma doença neurológica que se caracteriza por excessiva sonolência diurna, podendo ocorrer com ou sem cataplexia. A narcolepsia é uma condição incapacitante do sono e a investigação tem revelado a complexidade subjacente às influências genéticas e ambientais no desenvolvimento deste transtorno[3]. Está descrita associada a alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB específicos e têm implicações no sistema da hipocretina.[5]

Além da hipersonia súbita causada pela narcolepsia também pode haver uma causa idiopatia. A hipersonia é uma doença do sono que tem origem numa disfunção do Sistema Nervoso Central (SNC) e é caracterizada por sonolência excessiva. A sonolência excessiva é caracterizada como uma forte compulsão para dormir, mesmo após um sono de 8 horas ou mais, uma dificuldade em permanecer acordado, principalmente, em ocasiões com pouca movimentação física (ex.: ler, ver televisão, assistir a aulas); e não causada por insónia ou poucas horas de sono.

Embora seja menos frequente que a insónia, a hipersónia é um sintoma que muitas vezes indica a possibilidade de uma doença grave. Indivíduos saudáveis podem ter hipersónia temporária durante algumas noites ou dias como conseqüência de um período de privação de sono continuado ou devido a um esforço físico pouco habitual. Se a hipersónia se prolongar para além de alguns dias poderá ser um caso de perturbação psicológica. A hipersónia crónica que se apresenta numa idade jovem, pode ser sintoma de narcolepsia. As hipersónias podem ser sintomas de patologias do SNC, nomeadamente nos casos em que as estruturas interferem no ciclo vigília /sono, podendo ser, no entanto, frequentemente de origem infecciosa. Estão neste grupo as hipersónias causadas por encefalites. Podem ainda ser causadas por alterações de causa não identificada nas quais as estruturas do eixo hipotalâmico–diencefálico estão envolvidas. Estão neste caso entidades tais como o Síndrome Kleine-Levin. Há ainda a possibilidade do quadro ter origem em alterações metabólicas ou vasculares como por exemplo: encefalopatias que atingem difusamente ou mais selectivamente regiões cerebrais interferindo com o ciclo sono/vigília.

1.2. Diagnóstico e formas de tratamento

Devido aos vários factores que podem provocar distúrbios do sono, nem sempre o diagnóstico é fácil. O registo do sono, que inclui variáveis de actividade cerebral, respiratória, movimentos oculares, cardíacos é essencial para um diagnóstico. Nas situações em que persistem dúvidas sobre a perturbação é necessária uma abordagem mais precisa, procedendo-se á monitorização dos parâmetros indicados em situações específicas. Assim, o despiste da narcolepsia faz-se demonstrando a hipersónia com 4 - 5 registos de actividade cerebral e muscular efectuados durante o dia. Com estes registos é possível qualificar e quantificar as latências do sono, o tipo de sono que ocorre e o número de vezes que a entrada em sono é suficientemente breve para ser considerada patologia. Os testes que permitem este despiste estão definidos como Teste de Latência Múltipla do Sono (MSLT).

No entanto nem sempre sintomas semelhantes indicam uma perturbação narcoléptica. Os fenómenos de cataplexia, paralisia do sono e alucinações podem ocorrer em crianças e por vezes em adultos saudáveis que não manifestam outras perturbações do sono.

Para tratamento da narcolepsia podem ser úteis medicamentos estimulantes como efedrina, anfetaminas, entre outros, sendo sempre necessário um ajuste da dose para prevenir eventuais efeitos secundários. O tratamento deve ser feito por um especialista em doenças do sono.

Relativamente á hipersónia, o diagnóstico e tratamento torna-se mais difícil. O clínico deverá informar-se sobre o estado de ânimo do indivíduo, acontecimentos actuais e de qualquer medicamento que possa estar a tomar. Como foi referido, a hipersónia poderá ser provocada por uma perturbação psiquiátrica (como a depressão) ou por um problema neurológico (como encefalite, uma meningite ou em extremo uma neoplasia cerebral). No caso de sintomas relacionados com algum problema neurológico, o diagnóstico tem que ser baseado em exames imagiológicos como Tomografia Axial Computadorizada (TAC) ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e o doente é encaminhado para um neurologista. Na narcolepsia estes exames são realizados para que essas patologias sejam excluídas.

O SAOS é um dos distúrbios mais comuns e normalmente o diagnóstico é baseado em informações dadas pela pessoa que dorme com o doente, descrevendo ressonar forte ou ruídos ofegantes progressivamente mais fortes e irregulares a que se segue um respirar muito forte seguido por pausa mais ou menos prolongada. Se superior a 10 segundos gera uma apneia, se ocorre mais de 10 a 12 vezes por minuto é um quadro de apneia periódica de sono, além disso o indivíduo pode apresentar fadiga ao longo do dia. A confirmação do diagnóstico e a avaliação da sua gravidade são confirmadas por exames

laboratoriais de estudos do sono. Estes exames poderão auxiliar o clínico na diferenciação de apneia do sono obstrutiva e a apneia do sono central.

A apneia obstrutiva é mais frequente em obesos nos quais existem alterações nos canais aéreos devido à infiltração / desenvolvimento de tecido gordo no pescoço. As medidas a serem tomadas para o tratamento deste distúrbio são, além da perda de peso, deixar de fumar e evitar o uso excessivo de bebidas alcoólicas. O doente com ronco excessivo ou paragens repentinas de respiração devem tomar tranquilizantes para dormir. Os indivíduos com apneia do sono central não devem usar um respirador artificial, o qual é utilizado durante as horas de sono é o nCPAC (*nasal Continuous Positive Airway Pressure*).

Indivíduos com sintomas de apneia do sono são aconselhados a dormir de lado ou em decúbito ventral, com a face voltada para baixo. Se estes procedimentos não forem eficazes poderá ser utilizado um aparelho de pressão positiva contínua das vias aéreas superiores, permitindo uma pressão que força a passagem do ar. Em casos raros um indivíduo com apneia do sono necessita de uma traqueostomia (procedimento cirúrgico que cria abertura na traqueia), para alargamento das vias aéreas superiores.

2- Serotonina

A serotonina é um neurotransmissor, isto é, uma molécula que está envolvida na comunicação entre as células do cérebro (neurónios) e é quimicamente representada pela **5-hidroxitriptamina (5-HT)**, também designada por este nome. Este neurotransmissor desempenha um papel essencial na regulação de várias funções cerebrais incluindo aspectos distintos do sono, da cognição e dos afectos. Os distúrbios do sono como as insónias, aguda e crónica, são muito prevalentes em todas as sociedades do mundo. Os sintomas da insónia incluem dificuldades em iniciar ou manter o sono, sono não compensado e de baixa qualidade e ainda comprometimento das funções diárias a nível emocional e cognitivo. O sistema serotoninérgico e em particular os subtipos do receptor-2 da serotonina (5-HT₂) surgiram recentemente como sendo um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos eficazes e com elevada tolerância no tratamento primário e secundário das doenças do sono. Estão descritos vários subtipos de receptores da 5-HT que regulam o largo espectro de efeitos fisiológicos da 5-HT. A presença de mais de um local de ligação 5-HT foi sugerida pela primeira vez no íleo isolado do porquinho-da-índia. Mais tarde, Peroutka e Snyder, em 1979, descreveram que no córtex frontal de ratinhos, a ligação aos receptores da 5-HT, depende do ligando e é efectuada com diferente potência pela 5-HT, LSD e

espiperona. Estes autores concluíram, também que existem subtipos distintos de receptores no cérebro e propuseram que as H-5-HT e H-espiperona identificaram diferentes populações de receptores, designados como os receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ respectivamente. Entretanto, sete famílias de receptores (5-HT₋₁₋₇) que incluem 14 subtipos de receptores distintos foram identificadas em mamíferos. Assim, todos os subtipos de receptores da 5-HT actualmente conhecidos são codificados por genes diferentes e têm padrões de distribuição distintos no SNC. Estes receptores estão localizados em membranas pós-sinápticas e controlam o fluxo de electrões regulando uma resposta neuronal de excitação e despolarização (receptores: 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇) ou inibição e de hiperpolarização (receptores: 5-HT₁ e possivelmente 5-HT₅). O receptor 5HT_{2C} está entre os primeiros receptores que foram clonados. Dadas as semelhanças de características com o receptor 5-HT_{2A} quanto à farmacologia e tradução de sinal, a sequência do DNA do 5-HT_{2A} foi estabelecida por clonagem, com base na homologia. No entanto, a activação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} pode induzir efeitos comportamentais diferentes, por exemplo na prematuridade das respostas impulsivas. O gene que codifica o receptor 5-HT_{2A} humano (HTR2A) está localizado no cromosoma 13q14-q21. É constituído por três exões separados por dois intrões e dista de >63kb. Actualmente estão identificados 299 polimorfismos (SNP) no 5-HTR2A e têm sido investigados como genes candidatos funcionais na associação a várias doenças neuropsiquiátricas. Os SNPs mais estudados no 5-HTR_{2A} são os: 102 T > C (rs6313), 1438 A > G (rs6311) e His452Tyr (1354 C > T, rs6314). Os dois primeiros polimorfismos têm sido considerados em conjunto devido ao desequilíbrio completo de ligação que parece existir entre eles. O polimorfismo 102 T/C não resulta em nenhuma modificação na sequência dos aminoácidos do receptor 5-HT_{2A}, esse polimorfismo, no entanto, pode alterar a estrutura secundária do transcrito e, portanto, a sua estabilidade e actividade. A variação 1438 A/G está localizada próxima da região promotora e pode influenciar a expressão génica, o que também acontece com o polimorfismo His452Tyr, localizado na região C-terminal, outra região supostamente funcional do HTR2A. [6,7]

A acção conjunta destes polimorfismos parecem actuar reduzindo a densidade e disponibilidade funcional do receptor 5-HT_{2A} no cérebro. Para além de reduzir a neurotransmissão serotoninérgica, existem evidências que sugerem que as alterações do receptor 5-HT_{2A} podem levar a uma interacção desfavorável com os mecanismos dopaminérgicos ou a uma redução dos mesmos, especialmente no córtex pré-frontal. [6,7]

Os resultados mais consistentes no que diz respeito aos polimorfismos do receptor 5-HT_{2A} estabelecem uma relação com as doenças psicóticas e tentativas de suicídio.

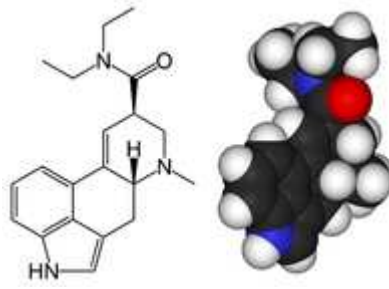


Figura 1 -hidroxitriptamina (5-HT) - representação química da serotonina

2.1 A Serotonina e o Sono

A serotonina é reguladora do SOL (sono de ondas lentas ou sono lento) e os núcleos que a contém são os núcleos do rafe, a sua lesão induz a insónia. A serotonina é a mediadora responsável pelas fases III e IV do sono. A diminuição da latência da fase REM (*Rapid Eyes Movement*) do sono, que ocorre na depressão unipolar e no transtorno obsessivo-compulsivo, deve-se ao desequilíbrio entre a serotonina e um outro neurotransmissor, a acetilcolina. Baixos níveis de serotonina estão relacionados com alterações do sono, tão comuns em doentes ansiosos e deprimido. A serotonina facilita a síntese e a libertação de factores indutores do sono, e a participação desse neurotransmissor na regulação do sistema sensorial e motor. A 5HT diminui a reacção aos estímulos externos permitindo que o cérebro seja mais facilmente modulado por factores indutores do sono. Existe também, uma diminuição na actividade de células serotoninérgicas no sono REM onde não há actividade motora. [6,7]

3 – O Sistema Imune

O sistema imune é definido como um conjunto de células, tecidos e moléculas implicados no controlo de agressões internas e externas e evoluiu como uma forma de defesa da integridade dos seres vivos, tendo a capacidade de responder, manter e controlar a homeostasia do próprio. Sendo assim, a imunidade pode definir-se como o somatório de

todos os mecanismos de resistência que o nosso organismo dispõe para se proteger das agressões.

Os mecanismos traduzidos num processo de reacção do sistema imune são constituídos por dois tipos de respostas inter-relacionadas e funcionalmente definidas: a **resposta imune inata** com especificidade de largo espectro e a **resposta imune adaptativa** com especificidade restrita. Consequentemente, tanto a imunidade inata como a adaptativa são a expressão de um sistema imune uno e integrado, composto por células e moléculas solúveis, interagindo e funcionando sinergicamente para eliminar ou neutralizar o estímulo agressor [9].

A imunidade inata é a resposta primária de defesa do sistema imune e exerce-se através de factores mecânicos, químicos e fisiológicos, células fagocíticas (monócitos e macrófagos), factores humorais e outras células, entre as quais as células NK (*Natural Killer*). Este tipo de resposta, implica um conjunto de processos através dos quais o organismo impede a entrada de agentes estranhos e quando esta entrada ocorre neutraliza-os. A resposta processa-se sempre da mesma forma, independentemente do agente invasor e do número de vezes que este contacta com o organismo. [8,9]

A imunidade adaptativa é mediada por células denominadas linfócitos e implica um conjunto de processos através dos quais o organismo reconhece os agentes invasores e os destrói de uma forma específica. Ao contrário do que acontece na imunidade inata, a resposta do organismo ao agente invasor torna-se mais eficaz após um contacto prévio o que se pode justificar pelo aparecimento da chamada memória imunológica durante o primeiro contacto.

A resposta imune específica é classificada em dois tipos: imunidade humoral e celular. Na **imunidade humoral**, os linfócitos B, assim designados pelo facto da sua maturação ocorrer na medula óssea (*Bone Marrow*), reconhecem determinantes antigénicos não proteicos de agentes infecciosos através de um receptor de membrana, **BcR** (*B cell Receptor*). Este receptor é uma proteína que pertence à superfamília das Imunoglobulinas (Igs). No seu estado maturo, as células B (plasmócitos) secretam formas solúveis desta proteína denominadas anticorpos. Estes anticorpos ligam-se especificamente aos antígenos desencadeando mecanismos que os neutralizam ou eliminam.

A **imunidade celular** é mediada por linfócitos T, assim designados pelo facto da sua maturação ocorrer no timo. À semelhança dos linfócitos B, todos os linfócitos T têm à sua superfície receptores específicos de antígenos, **TcR** (*T cell Receptor*). Ao contrário do **BcR**, que reconhece antígenos nativos solúveis, o TCR apenas reconhece antígenos quando estes são processados e apresentados por um tipo especial de células, as células apresentadoras de antígeno **APCs** (*Antigen Presenting Cells*). Na superfície das APCs os antígenos encontram-se ligados a glicoproteínas sendo o complexo antígeno –

glicoproteína reconhecido pelo **TcR**. Estas glicoproteínas são codificadas por uma região muito polimórfica do genoma denominada de MHC (*Major Histocompatibility Complex*)[9]. O conceito de resposta imune humoral e resposta imune celular não significa que apenas os Linfócitos B na primeira e os Linfócitos T na segunda sejam os intervenientes. Ambos contribuem para os dois tipos de resposta.

3.1 – O MHC

O MHC é a região cromossômica mais polimórfica do genoma humano e é fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. Foi descoberto como resultado de estudos efectuados em ratinhos, conduzidos inicialmente por Peter Gorer, em 1932 e mais tarde por George Snell, em 1940. Estes investigadores concluíram que esta região cromossômica contém genes que influenciam a compatibilidade dos transplantes efectuados. Foi, então, possível observar através de cruzamentos entre ratinhos de estirpes diferentes a existência de um *locus major* que controla a rejeição de enxerto. O envolvimento destes *loci* no controlo da compatibilidade de tecidos levou a que este grupo de genes fosse designado como *locus* de histocompatibilidade (H). O *locus* dominante foi designado **Complexo Major de Histocompatibilidade** ou MHC, que no ratinho se denominou H-2. Na década de 50, Jean Dausset observou a existência de aloantígenos em indivíduos politransfundidos. Foram realizados estudos genéticos, serológicos e moleculares a esses aloantígenos. Estes estudos permitiram a identificação e caracterização dos produtos génicos do MHC, localizados na superfície de leucócitos, razão pela qual as moléculas MHC humanas são designadas de HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Estes estudos levaram, nos anos 80, a que George Snell e Jean Dausset, juntamente com Baruj Benacerraf, recebessem o prémio Nobel em Fisiologia e Medicina.

No Homem, o Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) está localizado no braço curto do cromossoma 6 na região 6p21.3, enquanto nos ratinhos se localiza no cromossoma 17. No Homem, o complexo abrange 4,6Mb contém mais de 1000 genes, pseudogenes e fragmentos génicos.[10] Esta região do genoma humano foi subdividida em três regiões, classe I, II e III, de acordo com a estrutura e função dos produtos génicos (Fig 2). O Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) existe em todos vertebrados com uma organização cromossômica semelhante apesar de localizado em cromossomas diferentes.

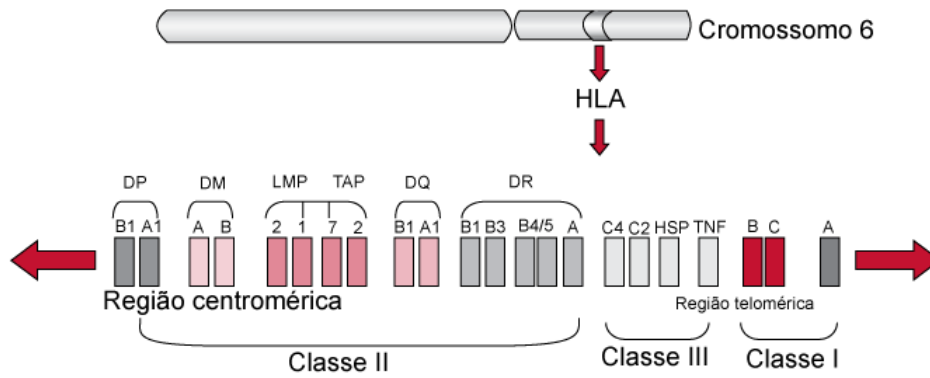


Figura 2 - Cromossoma 6 e região do MHC

3.1.1 – HLA- Classe I

Na parte telomérica do cromossoma 6 encontram-se os genes HLA da Classe I. Estes genes são agrupados em genes clássicos e não clássicos. Os antígenos HLA-A, -B e -C são codificados por genes clássicos, enquanto os antígenos HLA-E, -F e -G são codificados por genes não clássicos. Os genes da Classe I codificam antígenos de superfície ubiquitários, ou seja, que são expressos na maioria das células nucleadas, enquanto que

os genes da região Classe II codificam antígenos de superfície expressos sobretudo em linfócitos B, macrófagos e linfócitos T ativados (Crompton, 1987). Além dos genes Classe I e Classe II clássicos estas regiões contêm ainda outros genes com os quais podem não estar estruturalmente relacionados – genes não clássicos (Marsh, 2000).

Os antígenos HLA Classe I, clássicos, são glicoproteínas que existem à superfície de todas as células nucleadas e a sua função é a apresentação de antígenos proteicos intracelulares a linfócitos TCD8⁺.

A estrutura das moléculas HLA classe I clássicas consistem numa cadeia polipeptídica α (cadeia pesada) transmembranar de 44-49 kDa de peso molecular com três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e de uma cadeia polipeptídica leve de 12 kDa de peso molecular designada $\beta 2$ -microglobulina (ou $\beta 2m$). A região que codifica os domínios aminoterminais $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da cadeia pesada (cada domínio com aproximadamente 90 aminoácidos) é altamente polimórfica, permitindo assim a existência de moléculas HLA Classe I com diferentes especificidades no reconhecimento de antígenos. Cada um dos domínios é formado por quatro folhas pregueadas β e uma hélice α . Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ estão dispostos de modo a formar uma cavidade onde se liga o peptídeo. A superfície

formada pelo péptido e pelas hélices α que o flanqueiam, constitui a zona reconhecida pelo TcR. Estudos cristalográficos demonstraram que o tamanho da cavidade de ligação não permite que o peptído exceda o comprimento máximo de 8-11 aminoácidos. As moléculas HLA Classe I podem encontrar-se na maioria das células nucleadas do sistema Imune, com diferentes níveis de expressão dependendo do tecido onde se expressam. [9]

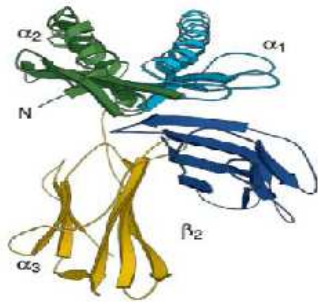


Figura – 3

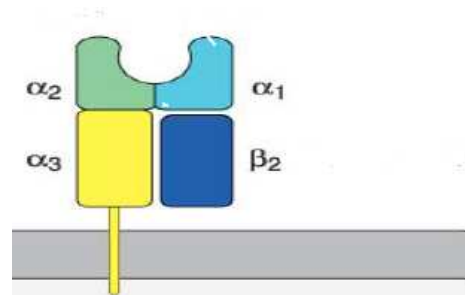


Figura – 4

 Figuras 3 e 4 – Estrutura MHC- Classe I

3.1.2 – HLA- Classe II

Estes genes localizam-se na parte centromérica do cromossoma 6 e codificam para moléculas expressas em linfócitos B, células endoteliais, células de Langerhans, macrófagos e linfócitos T activados. O *locus* onde estes genes se localizam está organizado em sub-regiões denominadas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP.

Estes antigénios são glicoproteínas compostas por duas cadeias unidas de um modo não covalente. A cadeia α tem cerca de 33-35 kDa de peso molecular com dois domínios extracelulares, α_1 e α_2 , a cadeia β tem entre 26-28 kDa de peso molecular com dois domínios extracelulares, β_1 e β_2 . Os segmentos aminoterminais α_1 e β_1 das cadeias de MHC classe II formam a cavidade de ligação do péptido, que é estruturalmente semelhante à cavidade das moléculas HLA Classe I. Quatro das folhas pregueadas β e uma hélice α formam o domínio α_1 , e as restantes folhas β e hélice α formam o domínio α_2 . Nestas moléculas, as extremidades da cavidade de ligação do péptido estão abertas, de modo que podem alojar péptidos até 30 aminoácidos, contribuindo assim para um aumento da flexibilidade da ligação do péptido. [9]

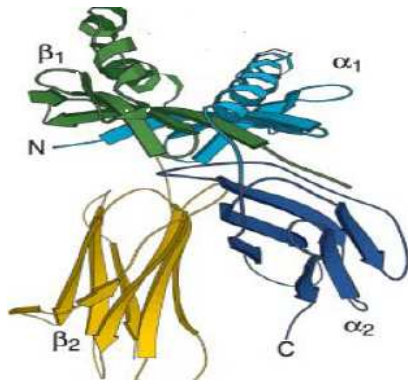


Figura - 5

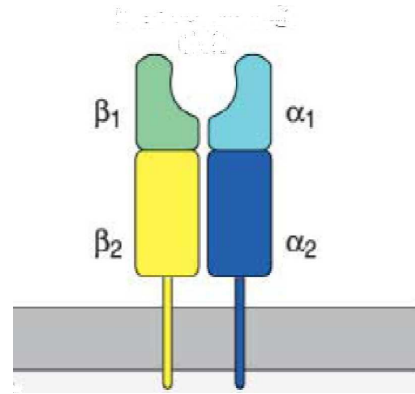


Figura - 6

Figuras 5 e 6– Estrutura MHC- Classe II

3.1.3 – Moléculas HLA Classe III

Os genes responsáveis pela codificação destas moléculas situam-se entre as regiões Classe I e Classe II, ocupam uma extensão de 0.7 Mb e contém cerca de 62 genes, alguns dos quais envolvidos na resposta inflamatória, incluindo genes que codificam para as proteínas do complemento, para proteínas HSP (*Heat Shock Protein*) e para certas citocinas. As citocinas são um grupo heterogéneo de polipéptidos conhecidos pelo seu envolvimento nas respostas imunes e inflamatórias. Adicionalmente às suas funções no sistema imune estas proteínas participam na regulação do desenvolvimento do sistema nervoso actuando em processos de diferenciação e sobrevivência neuronal e crescimento das extremidades neuronais. Experiências efectuadas em ratos demonstram que também estão relacionadas com a regulação de funções fisiológicas como a aprendizagem e a memória.

O TNF- α (*Tumor Necrosis Factor - alpha*) é uma citocina pleiotrópica, citopática, próinflamatória sintetizada por monócitos / macrófagos, linfócitos B e T, astrócitos e células da microglia. Esta proteína participa na regulação do sono e dos ritmos circadianos. Existem estudos que demonstram que o TNF- α regula a expressão à superfície dos neurónios, de receptores de neurotransmissores mediando a comunicação entre as células nervosas. Esta proteína está também envolvida em processos de neurodegeneração e de neuroprotecção. Os genes que participam nestes dois processos são activados pelo factor de transcrição NF κ B que por sua vez é activado pelo TNF- α .

O sistema do complemento é o principal efector da resposta imune humoral participando na opsonização, eliminação de complexos imunes e lise celular. Pode ser activado por duas vias: a **clássica** e a **alternativa**. Os genes das proteínas C2 e C4, da via clássica, e do factor B (Bf), da via alternativa encontram-se nesta região.

4. Patologias do sono e associação ao HLA

A susceptibilidade ou a resistência a grande número de doenças tem sido associada a polimorfismos do sistema HLA [11,12]. Estas patologias, são na generalidade do foro auto-imune ou infecciosas e a existência de factores de susceptibilidade, associados à narcolepsia e à hipersónia tem sido descrita em todos os grupos étnicos. [23-28].

Os factores genéticos e os factores ambientais (como por exemplo a alimentação) poderão estar envolvidos na etiopatogénese destas doenças. De facto, a importância dos factores genéticos é documentada por estudos realizados em gémeos monozigóticos, onde apenas 25-31% são concordantes para a narcolepsia. Deste modo, factores ambientais poderão também estar implicados na susceptibilidade para a narcolepsia e para a hipersónia. [11,12]. Apesar de todos estes estudos o mecanismo patofisiológico da doença é ainda desconhecido. [18]

A transmissão familiar da narcolepsia e da hipersónia é rara, sendo na maioria dos casos de origem materna. Apenas 8-10% dos pacientes narcolépticos têm outro membro da família com narcolepsia-cataplexia [11]. Nestes casos o risco para desenvolver em familiares do I^o grau de parentesco é 10-40 vezes mais elevado do que na população em geral, levantando a hipótese da existência de factores de predisposição genética [32].

Uma forte associação com os antigénios HLA-DR2 e DQ1, em serologia, foi inicialmente descrita por Honda e Juji em 1983.

Mais tarde, com a ajuda de técnicas de biologia molecular verificou-se que a associação é com os haplótipos HLA-DRB1*1501 (HLA-DR2) e HLA-DQB1*0602 (HLA-DQ1). [12,13,14,15] Posteriormente, utilizando marcadores genéticos adicionais na região HLA-DQ, foi estabelecido que HLA-DQB1 *0602 e HLA-DQA1*0102 são actualmente os genes de susceptibilidade para a narcolepsia [11,16,17]. Esta associação está descrita em várias populações [25-31].

Estudos preliminares, efectuados em doentes com hipersónia idiopática permitiram observar que os alelos HLA-DQB 1*0301 e HLA-DRB1*03, eram mais frequentes nestes doentes do que nos narcolepticos-catapléticos e população controlo. [13,29] A ausência

do antigénio HLA-DQB1*0301 na narcolepsia-cataplexia, verificou-se nos estudos portugueses e espanhóis.

Os resultados anteriores salientam a importância da caracterização imunogenética para a distinção entre pacientes com narcolepsia e doentes com hipersónia.

Embora o haplótipo HLA-DQB1 *0602 e DQA1*0102 esteja representado em 95% dos doentes caucasianos, não é necessário nem suficiente para o desenvolvimento da narcolepsia. Assim, um indivíduo que não possua o alelo HLA-DQB1*0602 pode manifestar a doença, e do mesmo modo, indivíduos com o alelo HLA-DQB 1*0602 podem não ser doentes. [13,29]

5. Patologias do sono e implicação Médico-legal

A Medicina legal é uma ciência que inclui um vasto leque de serviços localizados na interface entre a prática científica e o direito, situando-se no âmbito da medicina social.

Ao longo da história, foi sempre atribuído aos médicos o papel de prestar cuidados de saúde às pessoas doentes ou traumatizadas sem que se valorizassem certos aspectos fundamentais de natureza legal,

A Medicina Legal e as Ciências Forenses representam uma área técnica e científica em constante desenvolvimento, com ampla repercussão social e múltiplas aplicações nos mais diversos domínios profissionais.

A Clínica Médico-Legal é uma área da medicina legal dirigida para a actividade médica pericial na pessoa viva, sempre que está em causa encontrar uma prova científica para esclarecimento da justiça. Assim, esta move-se entre diferentes áreas do direito e dirige-se a diferentes tipos de ocorrência. Frequentemente, os exames efectuados em sede de direito penal são relativos a crimes contra a integridade física (agressões e acidentes de viação), crimes sexuais e de maus tratos (na relação conjugal ou em crianças e jovens). Os exames efectuados em sede do direito civil são, na sua grande maioria, relativos à avaliação do dano corporal pós-traumático em casos de acidentes de viação e, por vezes, em casos de agressão, podendo muitas vezes ser necessário recorrer a outro tipo de exames, como por exemplo, a avaliação do estado de saúde (casos de acção de despejo, de questões de seguros ou outras), determinação da idade e do sexo ou exames efectuados em sede do direito do trabalho que se relacionam com acidentes no local de trabalho ou doenças profissionais.

No caso da Clínica Médico-Legal a prova pericial é essencialmente médica exigindo-se, contudo, cada vez mais, uma abertura à interdisciplinaridade e transversalidade de

saberes, de forma particular à antropologia social e psicologia, uma vez que é a pessoa que constitui, em geral, o objecto da perícia.

As patologias do sono constituem um problema para toda a vida, apesar de não ser uma doença mortal, os graus de invalidez e as suas consequências na vida pessoal, social e profissional são variáveis. Contudo, esta situação pode levar à morte quer pelos acidentes de viação ou mesmo pelos acidentes de trabalho. As repercussões a nível social dependem não só da gravidade da doença, mas também das características pessoais de cada indivíduo. [20-22]

As repercussões profissionais são quase constantes. Os doentes apresentam diminuição das suas capacidades o que por vezes pode dar origem a acidentes graves, muitos deles mortais, ou serem vítimas de despedimentos. São poucos os indivíduos (14%) que recebem pensões por incapacidade de trabalho. [20-22] Na maioria das situações, as incapacidades profissionais são consideráveis e relacionadas directamente com ataques de sono. [20-22] As consequências a nível pessoal e familiar devem-se à desintegração familiar o que em muitos casos se traduz no divórcio, quando a doença não é bem compreendida pelo casal, já que certas patologias do sono podem levar a uma diminuição do desejo sexual [20-22]. As alterações socioprofissionais e familiares da doença agravam as alterações de personalidade, podendo surgir problemas psiquiátricos graves como neuroses e depressões [20-22] As depressões são também uma forte consequência destas patologias, devido à privação de certas tarefas ou mesma incapacidade de as efectuar. Nas crianças e adolescentes, esta doença é responsável por atrasos na aprendizagem. [20-22]

A implicação das doenças do sono na condução de veículos é um assunto delicado de abordar [20-22]

Em França, investigadores referiram que de 110 condutores implicados em acidentes de viação, 10% sofriam de narcolepsia. Num estudo feito nos E.U.A, em 1997, verificou-se que os acidentes de viação ocorrem duas vezes mais em pessoas com sonolência diurna excessiva do que nos que não a apresentam.

Estudos recentes, em 25 países da Europa, revelaram a regulamentação da licença de condução a partir de 1997. A sonolência diurna excessiva é mencionado em nove desses países, enquanto a síndrome de apneia do sono é mencionada em 10 países. Um paciente com apneia do sono não tratado é sempre considerado inapto para a condução. Para recuperar a capacidade de condução, sete destes países europeus contam com atestado médico com base no controlo dos sintomas e de conformidade com a terapia, enquanto em dois países, cabe ao paciente decidir (sobre o conselho de seu médico) se volta ou não a conduzir. França, requer apenas um exame (eletroencefalograma), baseado na manutenção da Vigília para motoristas profissionais. Condições raras, como por exemplo a narcolepsia, são consideradas um risco para a segurança de condução

com mais frequência na síndrome de apneia do sono. [20-22] Contudo, na maioria dos países na Europa, a síndrome da apneia do sono e a sonolência diurna excessiva não se encontram, entre as condições específicas para ser considerado apto ou inapto para a condução. [20-22] Os acidentes de trabalho são, embora com menor expressão, uma das consequências das patologias do sono.

No âmbito dos acidentes de trabalho, acidentes domésticos ou de viação em que ocorreu morte, a medicina legal tem um papel fundamental nas informações que pode dar relativamente à causa real da morte, dado que indivíduos portadores destas patologias desvalorizam a situação ou podem mesmo desconhecer tal facto. Nos casos de acidentes de trabalho é muito importante estabelecer a causa de morte, para eliminar a possibilidade da envolvimento de agentes externos, devido aos aspectos jurídicos que envolvem as seguradoras.

The National Highway Traffic Safety Administration estima que condutores com sonolência diurna excessiva provoquem cerca de 100000 acidentes por ano cuja consequência é cerca de 1550 mortes (www.nhtsa.org). Estudos realizados em 2005 pela The National Sleep Foundation revelam que 60% dos entrevistados afirmam ter conduzido com excesso de sono (www.sleepfoundation.org). Em Portugal a sonolência é uma das principais causas de acidentes de viação, tendo como consequência um número significativo de mortes. Podemos dizer que a sonolência diurna excessiva pode desencadear a diminuição da atenção aumentando assim o risco de acidentes quer de viação ou de trabalho. [20-22]

De referir que, quando a patologia de sono não é diagnosticada, o número de acidentes de viação causados por estes doentes é mais elevado do que na população em geral. Pelo contrário, em indivíduos que têm conhecimento da sua doença, o índice de acidentes mortais é inferior ao dos indivíduos não doentes. Neste contexto, os doentes com patologias do sono ao volante são menos perigosos do que muitos outros condutores.

Contribuir para o diagnóstico precoce de patologias do sono para é um dos principais desafios dos médicos mas também dos investigadores. As implicações daí decorrentes terão um grande impacto no bem-estar físico, social, familiar e profissional dos indivíduos portadores destas patologias.

II - OBJETIVO

Avaliar a relação entre determinados polimorfismos genéticos e patologia de sono para isso propusemo-nos:

1. Identificar os alelos HLA-Classe II – DRB1 em doentes com Narcolepsia, Hipersónia e Apneia do sono, numa população do Norte de Portugal.
2. Analisar e correlacionar o polimorfismo no receptor 5-HT 2A (HTR2A) com o diagnóstico das patologias do sono.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1 – População estudada

A população estudada no presente trabalho é constituída por doentes seguidos na Consulta de Sono do Serviço de Neurofisiologia do Hospital Santo António – Centro Hospitalar do Porto (HSA – CHP). A tipagem do *locus* HLA classe II (DRB1), foi efectuada em 55 doentes, com narcolepsia e hipersónia idiopática e 40 doentes com apneia do sono.

Na população das patologias do sono (Narcolepsia, Hipersónia e Apneia do sono) foi também efectuada a análise do polimorfismo no receptor 5-HT 2A (HTR2A).

A população controlo, é constituída por 40 indivíduos saudáveis da mesma etnia e provenientes da mesma região geográfica e todos foram tipados para o *locus* HLA-DRB1 e 5-HT 2A (HTR2A).

2 – Material biológico e tratamento das amostras

2.1 – Colheita das amostras

De cada indivíduo foram colhidas amostras de sangue periférico, obtidas por punção venosa em dois tubos *Vacutainer* com anti-coagulante EDTA. A colheita foi efectuada no HSA - CHP e no Laboratório de Patologia e Imunologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do HSA - CHP. Todos os participantes no estudo deram o seu consentimento de forma livre e esclarecida.

2.2 – Extracção de DNA genómico a partir de sangue periférico total

As amostras de DNA foram extraídas pelo método clássico de *Salting-out* [34], com algumas alterações, a partir de sangue periférico total colhido para tubos com 5% de EDTA. Na a pH 7.3 (Sigma). Centrifugou-se o sangue total (cerca de 8 mL) a 2000 rpm (RCF (x g) \approx 760) durante 10 minutos (centrífuga Hettich Universal) para se obter a separação da fase celular. Com uma pipeta de Pasteur retirou-se o *buffy coat* (camada de leucócitos com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo Falcon de 50 mL (Sarstedt) devidamente identificado. Adicionou-se RCLB (*Red Cell Lysis Buffer* – tampão de lise de eritrócitos com 1M de Tris-HCl a pH 7.2, 5M de NaCl (Merck) e 1M de MgCl₂ (Sigma)) à temperatura ambiente até perfazer os 50 mL e homogeneizou-se por inversão durante 5-10 minutos. Seguiu-se uma nova centrifugação a 2000 rpm (RCF (x g) \approx 760) durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Heraeus – Megafuge 1.0R) a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e repetiram-se os passos anteriores com RCLB a 4°C até obter um *pellet* de leucócitos limpo. O *pellet* final armazena-se a -20°C ou inicia-se logo de seguida a

segunda fase da extração. Nesta fase, adicionou-se ao *pellet*, 3.5 mL de TE2 *Buffer* (Tampão com 1M de Tris-HCl a pH 7.2, 5M de NaCl (Merck) e 0.5M de EDTA (BD Vacutainer)) e 200 µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio, Sigma) a 10%. Agitou-se vigorosamente a mistura no vórtex e adicionou-se 10 µL de Proteinase K a 50 mg/mL (Sigma) invertendo suavemente o tubo várias vezes. A mistura é incubada, aproximadamente, durante 12 horas, em banho-maria a 42°C (temperatura ótima para a ação da proteinase K) com agitação lenta para promover a digestão das células lisadas. Após este período de tempo, transferiu-se a mistura para um tubo de Falcon de 15 mL (Sarstedt) e adicionou-se 1 mL de NaCl a 6M (Sigma). Agitou-se vigorosamente a mistura no vórtex durante alguns segundos. Colocou-se esta mistura num agitador mecânico (Stuart Scientific – Platform Shaker STR6) com agitação lenta durante alguns minutos, até apresentar um “aspecto opaco” e centrifugou-se a 3000 rpm (RCF (x g) ≈ 1700) a 23°C durante 30 minutos. O sobrenadante (que contém o DNA) foi transferido para um novo tubo Falcon de 50 mL e promoveu-se a precipitação do DNA com 20 mL de Etanol Absoluto (99.5%, Sigma) frio (-20°C), invertendo lentamente o tubo várias vezes até concentrar o DNA num novelo. Com a ponta da micropipeta prendeu-se o novelo de DNA à parede do tubo e rejeitou-se o Etanol Absoluto. Lavou-se o DNA com 5 mL de Etanol a 70% frio (-20°C) e prendeu-se novamente o novelo de DNA à parede do tubo para rejeitar o Etanol. O DNA, foi transferido para um eppendorf de 2.0 mL com tampão TE (Tampão com 10mM de Tris-HCl a pH 7.2 e 1mM de EDTA) num volume variável, consoante a quantidade de DNA extraído. O tubo com DNA foi colocado várias horas num agitador rotativo (Stuart Scientific – Blood Tube Rotator SB1) o que permite que o DNA entre em solução.

2.3 – Quantificação das amostras de DNA

O DNA obtido foi quantificado por determinação da densidade óptica utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop* (ND-1000) a um comprimento de onda de 260 nm. As soluções de trabalho, de concentração de 50 ng/µl, foram obtidas por diluição com tampão TE das soluções originais.

2.4 – Qualidade das amostras de DNA

O grau de pureza das amostras de DNA foi avaliado por determinação da densidade óptica utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop* (ND-1000) a um comprimento de onda de 280 nm que determina a concentração de proteínas. Para valores de 260nm/280nm entre 1.5 e 1.9 considerou-se que a amostra era de boa qualidade.

3 – Tipagem genética HLA-CLASSE II

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método que permite amplificar fragmentos específicos de DNA, originando no final milhares de cópias da cadeia do DNA original.

Uma reacção de PCR consiste nas seguintes fases:

1. **Desnaturação do DNA genómico** – a mistura de reacção é aquecida até atingir a temperatura de aproximadamente 94-96 °C. Esta temperatura provoca a desnaturação da cadeia dupla de DNA passando a existir em solução DNA de cadeias simples.

2. **Emparelhamento dos primers (*Annealing*)** – a temperatura diminui até 30-70°C dependendo da constituição dos *primers*. Esta temperatura é ideal para a hibridação/emparelhamento dos *primers* com uma sequência complementar do DNA genómico a amplificar.

3. **Extensão da cadeia de DNA pela enzima *Taq* polimerase** – a temperatura sobe de novo até aos 72 °C, temperatura óptima para a actuação da *Taq* polimerase. A enzima começa a extensão da cadeia complementar adicionando os respectivos desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's: adenina (Datp), timina (dTTP), guanina (dGTP) e citosina (dCTP)).

O método utilizado para a tipagem do HLA-DRB1 designa-se por PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*). A metodologia de PCR-SSP, baseia-se no princípio de que *primers* de oligonucleótidos com correspondência completa discriminam vários alelos ou grupo de alelos durante o processo de PCR e como tal os *primers* são utilizados de forma mais eficaz. Foram utilizadas misturas de *primers* (Thermo Scientific) previamente descritas no *XII workshop*. [30] Os pares de *primers* são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de *primers* com correspondência perfeita traduzem-se na amplificação de sequências alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto que pares de *primers* sem correspondência não traduzem qualquer amplificação (ou seja, um resultado negativo). Imagem 5.

As condições de PCR usadas para amplificação do *locus* HLA-DRB1 estão descritas no Quadro 1.

Mastermix	Concentração final
Tampão	1,0 x
dNTP's mix	200 μ M
Primers Controlo	0.75 μ M
PrimersEspecífico	0.5 μ M
Taq	0.2U/ μ L
MgCl ₂	2,00mM
ddH ₂ O	-
DNA	25ng/ μ l

Quadro 1- Condições de amplificação de do locus HLA-DRB1.

Ao produto amplificado adicionou-se 1 μ L de *Loading Buffer* (10x). Esta mistura foi sujeita a uma electroforese horizontal num gel de agarose (*Seaken LE Cambrex*) a 1,5 % (p/v). O gel foi mergulhado no tampão TAE 1X (Trizma base, EDTA.Na₂ (*Sigma*) e ácido acético glacial) numa tina de electroforese.

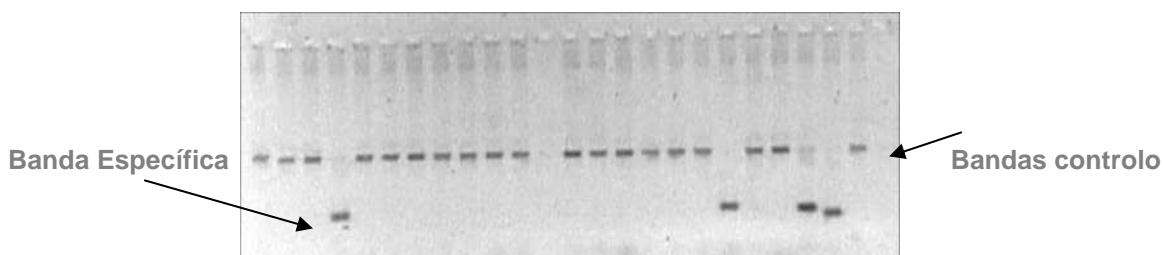


Figura 5 - imagem de um gel de agarose onde podem ser observados os produtos de amplificação do locus HLA-DRB1 de um indivíduo.

4- Análise dos Polimorfismos –HRM

Para tipagem do polimorfismo no receptor 5-HT_{2A} (HTR2A), a técnica usada foi a de *High Resolution Melting Curve Analysis* (hrMCA), técnica que utiliza um termociclador com detecção de fluorescência em tempo real. O termociclador usado foi o Rotor-GeneTM 6000 (Rcorbett), respeitando as recomendações do fabricante.

Os *primers* usados para a análise das alterações referidas encontram-se descritos no Quadro 2.

Gene	Polimorfismo	Sequência de primers	Nº pb
HTR2A	102T>C	F-5'-TGATGACACCAGGCT R-5'-CAGGAAAGGTTGGTTCGATT	108bp

Quadro 2 - Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.

A técnica hrMCA, foi descrita e desenvolvida em 2003 por *Gunddry* e colaboradores. [42] Consiste na análise das curvas obtidas através da monitorização por fluorescência num gradiente de temperatura de *melting* de produtos de PCR na presença de um corante (*SYTO 9*, utilizado no presente trabalho) que se intercala no DNA, e emite fluorescência. A temperatura de *melting* (T_m) e o perfil obtido depende do conteúdo em GC, dimensão e sequência do produto de PCR. Através da comparação das diferenças do perfil da curva de *melting* entre dois ou mais produtos, e utilizando *software* específico, é possível detectar alterações até um par de bases ao nível da sequência do DNA. Este método pode ser utilizado em diferentes aplicações tais como genotipagem e rastreio de mutações, apresentando uma elevada sensibilidade e especificidade. As concentrações dos diversos constituintes da *mastermix* para a amplificação estão descritas no Quadro 3.

Mastermix	Concentração final
Tampão NH^{4+}	1,0 x
dNTP's mix	0,2 μ M
For primer	1,00 μ M
Rev primer	1,00 μ M
Taq	1U/20 μ L
MgCl ₂	2,00mM
SYTO 9	(5 μ M)
ddH ₂ O	-
DNA	25ng/ μ l

Quadro 3 – concentrações dos constituintes da *mastermix* para a reacção de amplificação

As condições de amplificação para cada um dos polimorfismos estudados encontram-se descritas no Quadro 4.

HTR 2A				
Temperatura (°C)	95	96	56	72
Tempo	2m	30s	30s	60s
35 ciclos				

Quadro 4 - Condições de amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.

5- Análise dos Polimorfismos por PCR – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A metodologia baseia-se no estudo do tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição, que são endonucleases que desempenham um papel importante no estudo dos polimorfismos do DNA, pois reconhecem e cortam o DNA em sequências específicas. O tamanho dos fragmentos de restrição resultantes pode ser analisados por electroforese em gel de agarose - os RFLPs.

Para a análise do polimorfismo 102T/C foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. Na amplificação foi utilizada uma solução – mãe de reacção (*mastermix*) contendo (Quadro 5): 1x Tampão NH₄ (*Bioline*), 2.0 mM de MgCl₂ (*Bioline*), 0.2mM de Mix dNTPs (*Invitek*) e 0.5 μM de cada *primer* (Quadro5.) Adicionou-se 0.05U/μL de *Taq* DNA Polimerase (*Bioline*) seguida de agitação rápida. Distribuiu-se a *mastermix* pelos tubos de PCR adicionaram-se 5ng/μL de DNA.

Mastermix	Concentração final
Tampão NH ⁴⁺	1,0 x
dNTP's mix	0,2μM
For primer	1,00μM
Rev primer	1,00μM
Taq	1U/20μL
MgCl ₂	2,00mM
ddH ₂ O	-
DNA	100ng/μl

Quadro 5 – Concentrações das soluções de PCR

Gene	Polimorfismo	Sequência de primers	Nº pb
HTR 2A	102T/C	F-5` TGATGACACCAGGCTCTACAGT R-5` CAGGAAAGGTTGGTTCGATT	108bp

Quadro 6 - Sequência nucleotídica dos primers para amplificação do HTR 2A e tamanho do produto de PCR

HTR 2A					
Temperatura (°C)	95	96	56	72	72
Tempo	2m	30s	30s	60s	3m
35 ciclos					

Quadro 7 - Perfis térmicos usados na amplificação do gene do HTR2A

A cada produto amplificado adicionou-se 1µL de *Loading Buffer* (10x) e foi feita a sua visualização em gel de agarose a 1.5% (p/v) em electroforese horizontal.

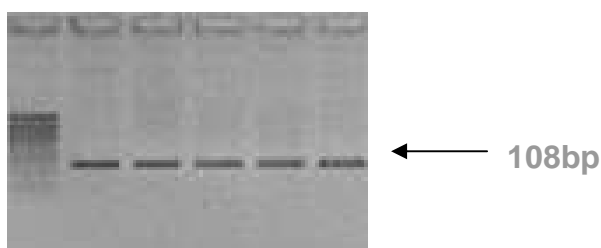


Imagem 6 – Amplificação inicial para o polimorfismo 102T>C.

Depois de comprovada a amplificação, os produtos foram submetidas a uma digestão com a enzima de restrição *MspI*. As misturas de digestão continham: 1.00U/µL de enzima de restrição (*MspI* da *New England BioLabs*) e 1x de Solução Tampão (*NEBuffer 2–New England BioLabs*) e ainda de 1x de BSA (*Bovine Seric Albumin - New England BioLabs*) para um volume final de 10µL. A solução final foi colocada em estufa a 37°C (*Memmert 854 Schwabach*) durante 3 horas.

	Enzima de restrição	Número de Bandas	Tamanho das Bandas	Genótipo
HTR2A	<i>Msp I</i>	2	70bp, 38bp	102C>C
		3	108bp, 70bp, 38bp	102T>C
		1	108bp	102T>T

Quadro 8 – representa a acção da enzima de restrição

A cada amostra adicionou-se 1µL de *Loading Buffer* (10x) e a visualização do produto digerido foi feita em gel de agarose nusieve GTG a 4.0% (p/v) em electroforese horizontal. O tamanho das bandas digeridas foi analisado pelo uso de um marcador de peso molecular de 100bp.

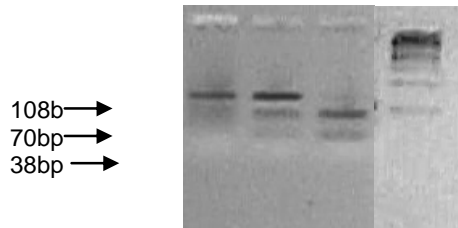


Imagem 7 -Resultado da digestão enzimática do HTR 2A em gel de agarose Nusieve a 4,0% com a enzima *Msp I*

6- Análise dos Estatística

Para a comparação das frequências entre a população de doentes e população controlo, foi utilizado o Teste de χ^2 ou Teste Exacto de *Fisher* (quando $n < 5$, sendo n o número de indivíduos). O *Odd Ratio* (OR) foi calculado como uma aproximação ao Risco Relativo. Esta medida estatística quantifica directamente a probabilidade que um indivíduo que possui determinado alelo de um gene tem de possuir a doença, comparando com aqueles que não possuem o alelo. A relação entre a frequência de determinado alelo com dados demográficos (sexo, presença ou ausência de convulsões febris na infância) foi estudada com o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. A relação entre idade de início e determinado alelo foi determinada com o teste T para variáveis independentes. A análise estatística foi efectuada usando o programa SPSS (*Statistics Package for the Social Sciences*) Versão 12.0.

As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

V – RESULTADOS

As frequências fenotípicas dos alelos HLA Classe II foram estimadas para os dois grupos em estudo. Estes resultados encontram-se expressos no Quadro 9.

ALELO	PC(n=282)		PS (n=95)		OR	95%CI	p
	n	f	n	f			
DR*01	66	0,23	18	0,19	0,77	(0,43-1,37)	0,3667
DR*03	44	0,16	25	0,26	1,93	(1,11-3,38)	0,0195
DR*04	69	0,24	16	0,17	0,63	(0,34-1,14)	0,124
DR*07	72	0,26	29	0,31	1,28	(0,77-2,14)	0,3418
DR*08	24	0,09	13	0,14	1,70	(0,83-3,50)	0,1427
DR*09	14	0,05	1	0,01	0,20	(0,03-1,57)	0,0916
DR*10	11	0,04	2	0,02	0,53	(0,12-2,43)	0,4069
DR*11	55	0,20	20	0,21	1,10	(0,62-1,95)	0,7436
DR*12	9	0,03	2	0,02	0,65	(0,14-3,07)	0,5864
DR*13	84	0,30	21	0,22	0,67	(0,37-1,16)	0,1486
DR*14	17	0,06	6	0,06	1,05	(0,40-2,74)	0,9194
DR*15	56	0,20	21	0,22	1,15	(0,65-2,02)	0,6385
DR*16	13	0,05	7	0,07	1,65	(0,64-4,26)	0,2995

Quadro 9: Frequências fenotípicas e dos alelos DRB1* em doentes com PS (Patologia do Sono) e PC (População Controlo)

A análise das frequências dos alelos do *locus* DRB1, permitiu observar que o alelo DRB1*07 era o mais frequente na população Portuguesa em estudo, sendo que a frequência na PS e PC foi 31,0% e 26,0% respectivamente. A frequência do alelo DRB1*03 era mais elevada na população com patologias do sono do que na população controlo (26,0% vs. 16,0% respectivamente, $p=0,0195$ e OR [1,11-3,38]).

Considerando as diferentes patologias do sono (narcolepsia, hipersónia, SAOS e outras patologias de sono) observou-se que alelo HLA-DRB1*15 era mais frequente no grupo de doentes com narcolepsia do que na população controlo (50% vs. 20%, $p=0,012$ OR= 4,04 [1,25 – 13,0]). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências dos alelos HLA-DRB1 nas restantes patologias de sono.

O gráfico 1 resume as principais diferenças encontradas para as frequências dos alelos HLA-DRB1 nos diferentes grupos de doentes.

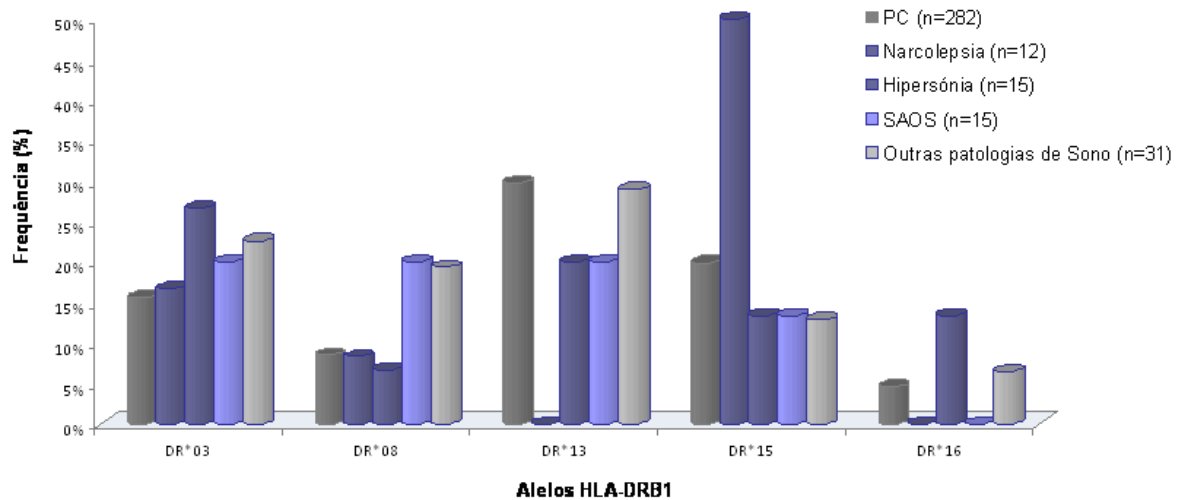


Gráfico 1 – Distribuição das frequências fenotípicas de alguns alelos HLA-DRB1 nos grupos de doentes com várias patologias de sono

Os resultados para o polimorfismo 102T>C, no gene HTR2A, encontram-se descritos no Quadro 10.

POLIMORFISMO	ALELO	PC(n=40)		PS (n=89)		OR	95%CI	p
		n	f	n	f			
102T>C	TT	21	0,53	29	0,33	0,44	(0,20-0,94)	0,03176
	TC	19	0,47	44	0,49	1,08	(0,51-2,28)	0,83859
	CC	0,00	0,00	16	0,18	0,00	-	0,0417
	T	61	0,76	102	0,57	0,42	(0,23-0,76)	0,00352
	C	19	0,24	76	0,43	2,39	(1,32-4,33)	0,00352

Quadro 10- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene HTR 2A na população doente(PS) e controlo(PC).

Quando se comparou a frequência do polimorfismo na população doente e na população controlo observou-se que o alelo 102T está representado no total de indivíduos estudados da PC enquanto que na PS o mesmo não acontece. Verificou-se que o genótipo 102TT era menos frequente na população PC do que na população controlo (33% vs. 53% respectivamente, $p= 0,032$ $OR=0,44$ [0,20 – 0,94]. Observou-se ainda que na população controlo não foram encontrados indivíduos com o genótipo 102CC enquanto que na população PS 18,0% dos indivíduos apresenta este genótipo (quadro 10).

O Gráfico 2 resume as diferenças encontradas nas populações com diferentes patologias de sono. Verificou-se que o genótipo 102 CC era mais frequente nas populações com hipersónia (29%) e SAOS (27%) no que nas restantes populações com patologias do

sono. Foi ainda possível observar que o genótipo 102TT estava menos representado na população de doentes com SAOS do que na população controlo (33% vs. 53%, respectivamente, $p=n.s.$) e nas restantes populações com patologias do sono. As diferenças encontradas não eram estatisticamente significativas.

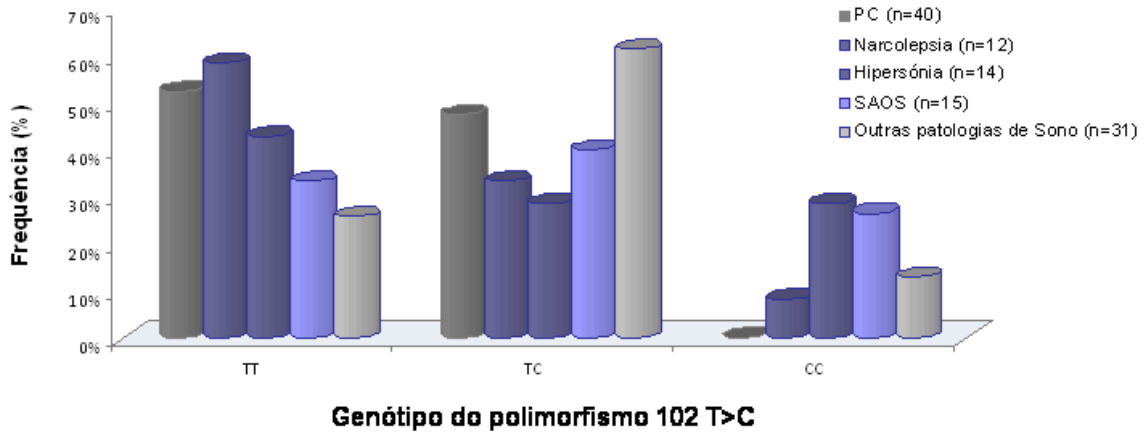


Gráfico 2 – Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo 102 T>C no gene HTR2A nos grupos de doentes com várias patologias de sono

Na análise do polimorfismo por HRM obteve-se dois grupos distintos os heterozigóticos (TC) e o grupo dos homozigóticos (TT e CC), apresentados no Gráfico 3.

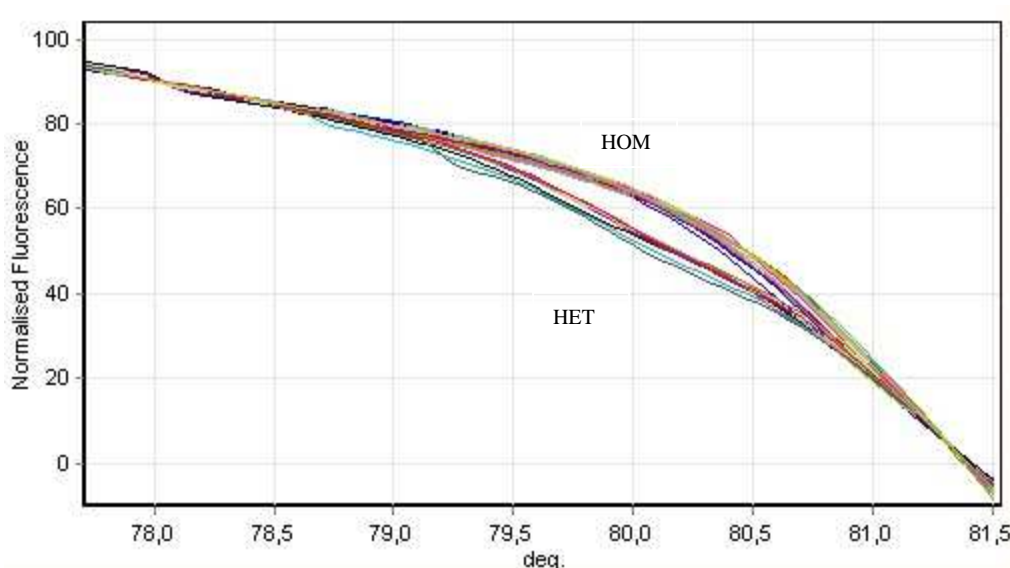


Gráfico 3 - representação das curvas de HRM dos dois grupos: HOM (homozigóticos: TT e CC) e HET (heterozigóticos: TC).

DISCUSSÃO

Existem vários estudos sobre a relação entre os genes do *locus* HLA e as patologias do sono. A associação mais frequentemente descrita entre a narcolepsia e o háplótipo DRB1*1501-DQA1* 0102-DQB1*0602.

Neste estudo realizado numa população portuguesa foi observado um aumento na frequência do alelo HLA-DRB1*03 na população com patologias do sono (PS) quando comparada com a população controlo. Estes dados indicam que o alelo HLA-DRB1*03 pode ser um factor de susceptibilidade geral para o desenvolvimento de patologias do sono. Tanto quanto sabemos este resultado é reportado pela primeira vez neste estudo ainda que uma associação entre o alelo HLA-DRB1*03 e o desenvolvimento de hipersónia tenha sido anteriormente descrito [44]. Quando o grupo de doentes foi dividido de acordo com o tipo de patologia do sono, verificou-se que apesar de a frequência do alelo HLA-DRB1*03 estar aumentada no grupo de doentes com hipersónia comparativamente com a população controlo, esse aumento não era estatisticamente significativo pelo que esta associação não foi confirmada neste estudo. Esta discrepância pode ser explicada pelo reduzido número de doentes analisado, o que não nos permite obter poder estatístico suficiente.

Verificou-se que no grupo da narcolepsia a frequência do alelo DRB1*15 apresentava um aumento estatisticamente significativo em relação à população controlo. Estes resultados indicam que o alelo HLA-DRB1*15 poderá ser um factor de susceptibilidade ao desenvolvimento de narcolepsia, o que está de acordo com estudos previamente publicados quer na população portuguesa [44] quer em outras populações.

O polimorfismo 102 T/C do gene HTR2A, apesar de silencioso, foi associado a uma alteração na estrutura secundária do transcrito e, conseqüentemente na estabilidade e actividade translaccional do receptor 5-HT_{2A}.

Neste estudo observou-se que a frequência do genótipo 102TT era menor na população com patologias do sono e a frequência do genótipo 102CC se encontrava aumentada no mesmo grupo, quando comparada com a população controlo.

Estes resultados parecem indicar que o genótipo 102CC poderá ser um factor de susceptibilidade ao desenvolvimento destas patologias enquanto que o genótipo 102TT poderá conferir protecção para essas doenças.

Estes resultados diferem dos descritos na literatura e deverão ser analisados com precaução uma vez que foi estudado um reduzido número de indivíduos. Além disso não foram encontrados na população controlo indivíduos com o genótipo 102CC e as frequências são bastante discrepantes relativamente a outras populações (Quadro 11).

POPULAÇÕES	TT	TC	CC
CONTROLO	f	f	f
Espanhois (2004)[40]	17,0%	58%	25%
Alemães (2001)[38]	21,5%	46,3%	32,2%
Japoneses (2005)[40]	25%	46%	29%
Chineses (2004)[37]	32,3%	45,6%	22,2%
Norte Portugal	52,5%	46,5%	0,0%

Quadro 11 – frequências genótipicas do polimorfismo 102T>C nas populações controlo dos diferentes estudos efectuados

Quando o grupo de doentes foi dividido com base nas várias patologias de sono, verificou-se que o genótipo 102CC era mais frequente nas populações com hipersónia e SAOS. Mais uma vez esta análise terá que ser feita com prudência uma vez que cada população tem um reduzido número de indivíduos.

Na análise do polimorfismo, por HRM, não se obtiveram resultados fiáveis, dado que esta técnica só nos permitiu diferenciar o grupo dos homozigóticos em relação aos heterozigóticos, não sendo possível observar o genótipo 102CC e o 102TT. A curva de *melting* do heterozigótico é uma composição entre ambos os componentes, heteroduplex e homoduplex, presentes no produto de amplificação devido à presença de dois alelos diferentes. Este facto implica que a dissociação seja mais precoce deslocando a curva para temperaturas inferiores. Salienta-se que a diferenciação por HRM de diferentes homozigóticos é frequentemente difícil, dado que as diferenças de Temperatura de *melting* (T_m) são pequenas e em cerca de 16% dos casos praticamente nulas [42].

É de realçar que seria necessário analisar um maior número de indivíduos para conferir um maior poder estatístico às análises e para que as conclusões sejam consistentes.

O trabalho realizado reforça o envolvimento de genes de susceptibilidade nas patologias de sono. A identificação de factores de risco e susceptibilidade pode contribuir para uma melhor caracterização destes síndromes. Este conhecimento terá implicações importantes na qualidade de vida dos doentes e na prevenção de determinadas situações como acidentes de viação e de trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Dotan Y, Suraiya S, Pillar G.(2008) *Sleep spindles in post traumatic stress disorder: significant importance of selective serotonin reuptake inhibitors*. Harefuah. 2008 Oct;147(10):763-7, 839-40.
- [2] Harvey A. G, (2009). *A Transdiagnostic Approach to Treatng Sleep Disturbance in Psychiatric Disorders*. Cognitive Behaviour Therapy 1-8.
- [3] Tafti M. (2009) *Genetic aspects of normal and disturbed sleep*. Sleep Med 10:1:S17-21.
- [4] Eckert J D, Malhotra A, Jordan S A. (2009) *Mechanisms of Apnea*. Progress in Cardiovascular Diseases,51(4): 313-323.
- [5] Msaad S, Ayadi H, Triki F, Kawas H, Yangui I, Ayoub A. (2008) *Narcolepsy*. Tunis Med, 86(12):1042-50.
- [6] Landolt H.P., Wehrle R. (2009) *Antagonism of serotonergic 5HT 2A/2C receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood*. Journal of Neurociense,pp1795-1809.
- [7] Yilmaz M.,Bayazit Y.A, Ciftci T.U.,Erdal M. E, et al(2005) *Association of Sertonin Transporter Gene Polymorphism with Obstructive Sleep Apnea Syndrome*. Laryngoscope, 115:832-836.
- [8] Bowcock, A.M. and J.G. Krueger, *Getting under the skin: the immunogenetics of Psoriasis*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(9): p. 699-711.
- [9] Arosa, F.A., et al., *Fundamentos de Imunologia*. 2007, Lisboa: LIDEL – Edições Técnicas, Lda.
- [10] Shiina T., Hosomichi K., Inoko H., Kulski K., (2009) *The HLA genomic loci map: expression interaction, diversity and disease* .Journal of Human Genetics, 54,15-39.
- [11] Mignot E (1998). *Genetic and familial aspects of narcolepsy*. Neurology 50 (Suppl1): S16-S22.

- [12] Anic-Labat S, Guilleminault C, Kraemer HC *et al.* (1999). *Validation of a cataplexy questionnaire in 983 sleep-disorders patients.* Sleep 22 (1): 77-87.
- [13] Mignot E, Lin L, Risch N *et al.* (1999). *Identification of a novel HLA narcolepsy susceptibility subtype, HLA-DQB 1*0301.* Sleep 22: S121- S122.
- [14] Rogers AE, Meehan J, Guilleminault C *et al.* (1997). *HLA DR 15 (DR2) and DQB 1*0602 typing studies 188 narcoleptic patients with cataplexy.* Neurology 48: 1550-1556.
- [15] Mignot E, Hayduk R, Black J *et al.* (1997). *HLA DQB 1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients.* Sleep 20 (11):1012-1020.
- [16] Mignot E, Lin X, Arrigoni J *et ai.* (1994). *DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black americans.* Sleep 17 (8): S60-S67.
- [17] Mignot E, Tafti M, Dement WC *et al.* (1995). *Narcolepsy and immunity.*Advances in Neuroimmunology 5: 23-37.
- [18] Martins da Silva B , Lopes J, Pinto D *et al.* (2000). *Different HLA predisposition for narcolepsy-cataplexy and other hypersomnias.* Human Immunology 61: S79.
- [19] Omachi TA, Claman DM, Blanc PD, Eisner MD(2009). *Obstrutive sleep apnea: A risk factor for work disability.* Sleep 1; 32(6):791-8.
- [20] Alonderis A., Barbé F., Bonsignore M., Calverley P *et al* (.2009). *Medico- legal implications of sleep apnoea syndrome: Driving license regulations in Europe.* Sleep Medicine 9; 362-375.
- [21] Roscelli F., Spaggiari MC, (2008) *Sleep disorders questionnaire for medical surveillance of workers.* G Ital Med Lav Ergon; 30(3):10-8.
- [22] Geoge CFP.(2008). *5-Driving and automobile crashes in patients with obstrutive sleep apnoea/hypopnoea syndrome.* Thorax; 59:804-807.

- [23] Wing YK, Chen L, Fong SYY, Ng MHL, *et al.* (2008). *Narcolepsy in Southern Chinese patients: clinical characteristics, HLA typing and seasonality of birth.* J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry; 79; 1262-1267.
- [24] Lei Chen MSc, Fong SYY, MRCP, *et al.* (2007). *The Familial Risk and HLA Susceptibility among Narcolepsy Patients in Hong Kong Chinese.* Sleep30;7.
- [25] Coelho FMS, Pradella-Hallinan M, Neto MP, Bittencourt LRA, Tufik S.(2009). *Prevalence of the HLA-DQB1*0602 allele in narcolepsy and idiopathic hypersomnia patients seen at a sleep disorders outpatient unit in São Paulo.* Rev Bra Psiquiat; 31(1):10-4.
- [26] Alaez C, Lin L, Flores-A H, Vasquez M, *et al.* (2008). *Association of narcolepsy-cataplexy with HLA-DRB1 and DQB1 in Mexican patients: A relationship between HLA and gender is suggested.* BMC Medical Genetics 9:79.
- [27] Jeon JH, Hong SC, Shin YK, Han JH, Lee SP.(2007). *HLA-DQB1 Allele and Hypocretin in Korean Narcoleptics with Catalepsy.* J Korean Med Sci 22:127- 31
- [28] Heier MS, Evisukova T, Wilson J, Abdelnoor M, Hublin C, Ervik (2009). *Prevalence of narcolepsy with catalepsy in Norway.* Acta Neural Scand;120:276-280.
- [29] Hong SC, Lin L, Lo B, Jeon JH, Shin YK, *et al* (2007). *DQB1*0301 and DQB1*0601 Modulate Narcolepsy Susceptibility in Koreans.* Human Immunology 68,59-68.
- [30] Sasai T, Inoue Y, Komada, Sugiura T, Matsushima E. (2009) *Comparison of clinical characteristics among narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia without long sleep time, focusing on HLA- DRB1*/DQB1*0602 finding.* Sleep Medicine 10:961-966
- [31] Miyagawa T, Honda M, Kawashima, Shimada M, Tanaka S, Honda Y, Tokumaga K. (2009). *Polymorphism Located between CPT1B and CHKB, and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 Haplotype Confer Susceptibility to CNS Hypersomnias (Essential Hypersomnia).* Plos ONE 4:5394.

- [32] Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. (2007) *Narcolepsy with cataplexy*. Lancet; 369:499-511.
- [33] Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure forextracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. 16(3): p.1215.
- [34] Jones, D.C., et al., *Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility*. Genes Immun, 2006. 7(7): p. 576-82.
- [35] Audero E., Coppi E., Mlinar B., Rossetti T., Caprioli A., e tal (2008) *Sporadic Autonomic Dysregulation and Death associated with Excessive Serotonin Autoinhibition*. Science ,vol321.
- [36] Aghajanian K. G., Sandres-Bush. *Serotonin*. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.
- [37] Zhang X., Jiang S., He X., Zhang L., (2004) *102T/C SNP in the 5-Hydroxytryptamine Receptor 2A(HTR2A) Gene and Schizophrenia in Two Southern Han Chinese Population*. Neuropsychiatric Genetic; 126B:16-18.
- [38] Minov C., Baghai C. T., Schule C., Zwanzger., Schwarz J. M., et al (2001) *Serotonin-2A-receptor and transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression*. Neuroscience Letters 303:119-122
- [39] Heiser P., Dempfle A., Konrad K., Hinney A., Kiehl H., et al (2007) *Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample*. J. Neural Transm 114:513-521.
- [40] Mata I., Arranz M. J., Patino A., Lai T., Beperet M., Sierrasesumaga L., e tal (2004) *Serotonergic Polymorphisms and Psychotic Disorders in Populations from North Spain*. Neuropsychiatric Genetics 126B: 88-94.
- [41] Golimbet V. E., Alfimova M. V., Manadyan K.K., Mitushina N. G., et al (2002) *5HT2A gene polymorphism and personality traits in patients with major psychoses*. Eur Psychiatry 17: 24-8.

[42] Gundry N. C., Vandersteen G. J., Reed H. G., Pryor J. R., et al (2003) *Amplicon Melting analysis with Labeled primers: A closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. Clinical Chemistry 49:3; 396-406*

[43] Sakai K., Takada T., Nakayama H., Kubota Y., et al (2005) *Serotonin-2A and 2C receptor Gene Polymorphisms in Japanese Patients with Obstructive Sleep Apnea. Internal Medicine 44: 928-933.*

[44] Célia Bessa (2001) *Estudos Genéticos: HLA e TNFR2 na Patologia do Sono (Narcolepsia e Hipersónia Idiopática)*. Tese Mestrado Universidade do Porto – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.