



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cláudia Bueno Abdalla Carvalho

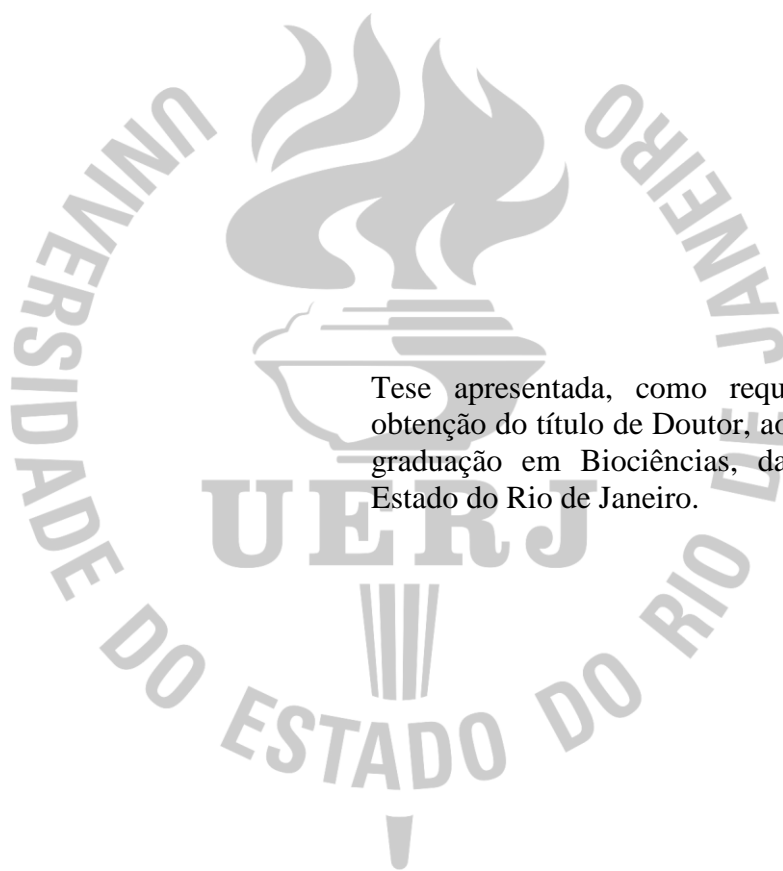
**Relação entre a doença de Parkinson e o gene *LRRK2*: um estudo na  
população brasileira**

Rio de Janeiro

2011

Cláudia Bueno Abdalla Carvalho

**Relação entre a doença de Parkinson e o gene *LRRK2*: um estudo na população brasileira**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cíntia Barros Santos-Rebouças

Rio de Janeiro

2011

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

C331 Carvalho, Cláudia Bueno Abdalla.  
Relação entre a doença de Parkinson e o gene LRRK2: um estudo na população brasileira / Cláudia Bueno Abdalla Carvalho. - 2011.  
172 f. : il.

Orientadora: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel  
Coorientadora: Cíntia Barros Santos-Rebouças.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Parkinson, Doença de - Teses. 2. Mutagênese - Teses. I. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. II. Santos-Rebouças, Cíntia Barros. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.858-008.6

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

---

Assinatura

---

Data

Cláudia Bueno Abdalla Carvalho

**Relação entre a doença de Parkinson e o gene *LRRK2*: um estudo na população brasileira**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2011.

Orientadores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Barros Santos-Rebouças (Coorientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Vitória de Moura Gallo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

---

Prof. Dr. Juan Clinton Llerena Junior  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

---

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa de Souza Fernandez Seixas  
Instituto Nacional de Câncer – INCA

Rio de Janeiro

2011

## AGRADECIMENTOS

À Deus - pois “Grandes coisas fez o senhor por nós, e por isso estamos alegres... , aquele que leva a preciosa semente andando e chorando, voltará sem dúvida com alegria, trazendo consigo os seu molhos”. Obrigada pai, porque tudo que tenho na minha vida até hoje é graças a ti. Obrigada por alcançar mais esta vitória.

Aos meus pais - por serem os maiores e melhores exemplos de vida, por terem me incentivado e me apoiado para que eu pudesse continuar os meus estudos e por dedicarem toda sua vida a mim. Pelas orações e conselhos que só pai e mãe são capazes de fazer e de dar.

À minha irmã Érika - pelas alegrias e pelos infinitos momentos de descontração, por sempre torcer por mim.

Ao meu marido Fabiano - pelo seu amor, pela sua companhia, pela força, otimismo, apoio e conselhos que sempre me trouxeram paz nos momentos de angústia, porque sempre acreditou na minha vitória.

À minha avó Maria (*in memoriam*) - por suas preciosas orações.

Ao meu nenozinho(a) - um grande presente de Deus, que mesmo dentro de mim, permitiu com toda serenidade e paz que eu pudesse escrever esta tese, sem sentir fortes enjôos, tão comuns nesta fase.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel - por ter acreditado na minha capacidade como aluna, desde os primeiros momentos em que me integrei ao laboratório. Pela oportunidade de realização do projeto, pelo apoio e orientação durante os nove anos de convivência. Por ser um exemplo de profissional, com quem eu pude aprender a cada dia. Por me apoiar nos momentos em que mais precisei de compreensão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Barros Santos-Rebouças - pela orientação e confiança durante toda a minha permanência no laboratório e durante o desenvolvimento deste projeto, por ser uma excelente profissional sempre disposta a esclarecer as dúvidas e a transmitir seus conhecimentos.

Ao Mário - pois não poderia esquecer desta pessoa excepcional que sempre me ajudou e orientou com toda paciência todas as vezes que precisei durante a pós-graduação. Por me ajudar a manipular o Corel, por corrigir meus trabalhos, por tirar minhas dúvidas e tantas outras coisas. Agradeço por toda ajuda nos momentos mais difíceis e, principalmente, por ser

uma pessoa de extrema boa vontade. Tenho orgulho de ter sido sua madrinha de casamento e espero que possamos levar esta amizade por toda a vida.

À Karla - por ser uma grande amiga desde a época de graduação e por sempre me ajudar e aconselhar nos momentos mais difíceis. Pelas saídas, conversas, desabafos e risos e pela companhia que tive sempre de uma grande amiga. Espero também que nossa amizade seja para toda vida.

À Jussara - por ser uma pessoa tão especial e servir como exemplo de maturidade que eu sempre admirei, pela sua experiência e seus conselhos profissionais.

À Bia e à Natalia, pelas alegrias, pelas conversas e risos, que ajudaram a tornar agradável o dia-a-dia e, em particular, à Bia, por sua ajuda na parte experimental.

Ao Richard, Ana Paula, Fábio, Adriana, Cristiane, Juliana, Karen, Paloma e Marcela - pessoas que passaram pelo laboratório durante todos os anos em que aí estive e que mesmo não fazendo mais parte do grupo, passaram pela minha vida trazendo alegrias, principalmente, pelas brincadeiras e conversas na hora do cafezinho.

À Andressa, Carol, Julinha, Fabíola e Ana Carolina - pela companhia e conversas nos momentos de descanso.

À Flavia e à Juciara - pela ajuda técnica indispensável no laboratório.

À Profª Drª Ana Carolina Paulo Vicente e à técnica Rosa - pelo apoio e colaboração na realização do sequenciamento automático.

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

À técnica Ângela - que ajudou no sequenciamento realizado na Plataforma Genômica do IBRAG/UERJ.

Aos médicos Dr. João Santos Pereira, Drª. Ana Lúcia Zuma de Rosso, Drª. Denise Hack Nicaretta e Drª. Izabel Cristina Constantino Bastos - pela importante colaboração.

Ao Dr. Floriano P. Silva-Jr - por ter me recebido em seu laboratório, pela ajuda e orientação para que eu pudesse iniciar as análises de modelagem e de dinâmica molecular e a suas alunas Aline e Ana Carolina pelas ajudas e esclarecimentos.

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

À CAPES, FAPERJ, CEPUERJ e ao CNPq - pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biologia da UERJ e do Departamento de Genética - sem os quais, a minha formação não seria possível.

## RESUMO

CARVALHO, Cláudia Bueno Abdalla. *Relação entre a Doença de Parkinson e o gene LRRK2: um estudo na população brasileira*. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente depois da Doença de Alzheimer, afetando aproximadamente 1% da população com idade superior a 65 anos. Clinicamente, esta doença caracteriza-se pela presença de tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural, os quais podem ser controlados com a administração do levodopa. As características patológicas da DP incluem a despigmentação da substância nigra devido à perda dos neurônios dopaminérgicos e a presença de inclusões proteicas denominadas corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes. As vias moleculares envolvidas com esta patologia ainda são obscuras, porém a DP é uma doença complexa, resultante da interação entre fatores ambientais e causas genéticas. Mutações no gene *leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2; OMIM 609007)* constituem a forma mais comum de DP. Este gene codifica uma proteína, membro da família de proteínas ROCO, que possui, entre outros domínios, dois domínios funcionais GTPase (ROC) e quinase (MAPKKK). Neste estudo, os principais domínios do gene *LRRK2* foram analisados em 204 pacientes brasileiros com DP por meio de sequenciamento dos produtos da PCR. Através da análise de 14 exons correspondentes aos domínios ROC, COR e MAPKKK foram identificadas 31 variantes. As alterações novas, p.C1770R e p.C2139S, possuem um potencial papel na etiologia da DP. Três alterações exônicas (p.R1398R, p.T1410M e p.Y2189C) e nove intrônicas (c.4317+16C>T, c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+52T>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T, c.6382-36G>A, c.6382-37C>T e c.6576+44T>C) são potencialmente não patogênicas. Ao todo, dezessete variantes exônicas e intrônicas constituem polimorfismos já relatados na literatura (p.R1398H, p.K1423K, p.R1514Q, p.P1542S, c.4828-31T>C, p.G1624G, p.K1637K, p.M1646T, p.S1647T, c.5015+32A>G, c.5170+23T>A, c.5317+32C>T, p.G1819G, c.5948+48C>T, p.N2081D, p.E2108E e c.6381+30A>G). A frequência total de alterações potencialmente patogênicas ou patogênicas detectadas em nossa amostra foi de 3,4% (incluindo a mutação p.G2019S, anteriormente descrita em 2 artigos publicados por nosso grupo: Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010), sendo a frequência de mutações nos casos familiares (11,1%) cerca de seis vezes maior do que a encontrada nos casos isolados da DP (1,8%). Os resultados alcançados neste estudo revelam que mutações no gene *LRRK2* desempenham um papel significativo como fator genético para o desenvolvimento da DP em pacientes brasileiros.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Mutações gênicas. Gene *LRRK2*.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease, affecting nearly 1% of people above 65 years of age. The major clinical symptoms of this disease are: resting tremor, bradykinesia, rigidity, postural instability and a positive response to dopamine replacement therapy. Pathological findings include selective degeneration of dopaminergic neurons within the substantia nigra, with proteinaceous Lewy body inclusions in surviving cells. The pathogenesis of PD is not yet completely understood, however, both genetic and environmental factors contribute to the disease phenotype. Mutations in the *leucine-rich repeat kinase 2 gene* (*LRRK2*; OMIM 609007) represent the most frequent genetic known cause of familial and sporadic PD. The *LRRK2* gene encodes a protein, member of the ROCO protein family, that contains both GTPase (ROC) domain and kinase (MAPKKK) domain, as well as, other motifs. In this study, we have screened the main domains of the *LRRK2* in a group of 204 PD Brazilian patients. The screening was performed by direct sequencing of the PCR products. By the analysis of 14 exons corresponding to ROC, COR and MAPKKK domains, we identified 31 sequence variations. The novel variants, p.C1770R and p.C2139S, may play a role in the PD pathogenesis. Three exonic alterations (p.R1398R, p.T1410M and p.Y2189C) and nine intronic variants (c.4317+16C>T, c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+52T>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T, c.6382-36G>A, c.6382-37C>T and c.6576+44T>C) seem to be not pathogenic. A total of 17 exonic and intronic alterations were previously described in the literature as non-pathogenic polymorphisms (p.R1398H, p.K1423K, p.R1514Q, p.P1542S, c.4828-31T>C, p.G1624G, p.K1637K, p.M1646T, p.S1647T, c.5015+32A>G, c.5170+23T>A, c.5317+32C>T, p.G1819G, c.5948+48C>T, p.N2081D, p.E2108E and c.6381+30A>G). The frequency of pathogenic mutations or potentially pathogenic variants was 3.4% (including the p.G2019S mutation, previously described in our previous report: Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010). In familial cases (11.1%) this frequency was approximately six times higher than in sporadic cases (1.8%). Our results suggest that *LRRK2* mutations have an important contribution to PD development among Brazilian population.

Keywords: Parkinson's disease. Gene mutations. *LRRK2* gene.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias comuns ligadas à patogênese da DP.....	21
Figura 2 -	Seção lateral de um cérebro humano.....	23
Figura 3 -	Esquema do gene <i>LRRK2</i> e de sua proteína.....	24
Figura 4 -	Esquema das proteínas da família ROCO e seus respectivos domínios....	26
Figura 5 -	Modelo de regulação do dímero <i>LRRK2</i> proposto por Deng e colaboradores (2008).....	28
Figura 6 -	Esquema do modelo proposto para a regulação da <i>LRRK2</i> .....	30
Figura 7 -	Esquema da digestão dos produtos da PCR com a enzima <i>Hgal</i> .....	54
Figura 8 -	Esquema do gene e da proteína <i>LRRK2</i> com a localização das variantes identificadas.....	60
Figura 9 -	Sequência da proteína <i>LRRK2</i> na região das alterações <i>missense</i> , alinhada com ortólogos de outras espécies.....	64
Figura 10 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4193G>A (p.R1398H). C) Alteração c.4193G>A (p.R1398H) em homozigose.....	67
Figura 11 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4194T>G (p.R1398R).....	67
Figura 12 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4229C>T (p.T1410M).....	68
Figura 13 -	Heredograma da família do paciente PAR1455.....	69
Figura 14 -	Análise de indivíduos controles feita através de gel de poliacrilamida dos produtos da PCR (exon 30) digeridos com a enzima <i>Hgal</i> .....	69
Figura 15 -	Representação da estrutura cristalográfica do dímero ROC (número de acesso “2ZEJ”) visualizada no programa Swiss-Pdb Viewer 4.0.1.....	70

Figura 16 -	Modelagem das regiões ausentes feitas através do programa SWISS-MODEL.....	71
Figura 17 -	Modelagem das regiões ausentes feitas através do programa Modeller 9v7.....	71
Figura 18 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4269G>A (p.K1423K). C) Alteração c.4269G>A (p.K1423K) em homozigose.....	72
Figura 19 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4317+16C>T.....	72
Figura 20 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4541G>A (p.R1514Q).....	73
Figura 21 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4624C>T (p.P1542S).....	73
Figura 22 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4828-31T>C em heterozigose e (C) em homozigose.....	74
Figura 23 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4872C>A (p.G1624G). C) Alteração c.4872C>A (p.G1624G) em homozigose.....	75
Figura 24 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4911A>G (p.K1637K). C) Alteração c.4911A>G (p.K1637K) em homozigose.....	75
Figura 25 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4937T>C (p.M1646T).....	76
Figura 26 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.4939T>A (p.S1647T) em heterozigose e (C) em homozigose.....	76
Figura 27 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.5015+32A>G.....	77
Figura 28 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5170+23T>A em heterozigose e (C) em homozigose.....	77

Figura 29 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.5308T>C (p.C1770R).....	78
Figura 30 -	Heredograma da família do paciente PAR1209.....	78
Figura 31 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. (A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . (B) Alteração c.5317+32C>T.....	79
Figura 32 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.5317+59A>C.....	79
Figura 33 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5457T>C (p.G1819G) em heterozigose e (C) em homozigose.....	80
Figura 34 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5509+20A>C.....	80
Figura 35 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5509+52T>C.....	81
Figura 36 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5509+122A>G.....	81
Figura 37 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.5657-46C>T.....	82
Figura 38 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.5948+48C>T em heterozigose e (C) em homozigose.....	82
Figura 39 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.6241A>G (p.N2081D).....	83
Figura 40 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.6324G>A (p.E2108E) em heterozigose e (C) em homozigose.....	83
Figura 41 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.6381+30A>G.....	84
Figura 42 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. (A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . (B) Alteração c.6382-36G>A.....	84

Figura 43 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.6382-37C>T.....	84
Figura 44 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.6415T>A (p.C2139S).....	85
Figura 45 - Heredograma da família do paciente PAR2043.....	86
Figura 46 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> . B) Alteração c.6566A>G (p.Y2189C).....	87
Figura 47 - Heredograma da família do paciente PAR1319.....	87
Figura 48 - Heredograma da família do paciente PAR1493.....	88
Figura 49 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene <i>LRRK2</i> e em (B) a alteração c.6576+44T>C.....	88

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1 -	Proporção de idosos de 60 e 65 anos ou mais de idade no Brasil de 1998 a 2008.....	18
Tabela 1 -	Genes e <i>loci</i> descritos envolvidos na doença de Parkinson familiar.....	20
Tabela 2 -	Variantes no gene <i>LRRK2</i> encontradas em pacientes com DP.....	36
Tabela 3 -	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons que codificam os domínios ROC, COR e MAPKKK do gene <i>LRRK2</i> .....	47
Tabela 4 -	Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons analisados do gene <i>LRRK2</i> .....	48
Tabela 5 -	Variantes de sequências encontradas no gene <i>LRRK2</i> e suas características principais.....	61
Tabela 6 -	Resultados das análises <i>in silico</i> .....	63
Tabela 7 -	Características clínicas dos pacientes com alterações no gene <i>LRRK2</i> .....	66
Tabela 8 -	Alterações identificadas neste estudo e sua classificação.....	98
Tabela 9 -	Resumo de estudos que rastrearam alterações no gene <i>LRRK2</i> através do sequenciamento de vários exons.....	101
Tabela 10 -	Frequência de mutações nos principais genes associados à DP.....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
A	alanina
AD	autossômica dominante
AR	autossômica recessiva
ANK	<i>ankyrin domain</i>
ARM	<i>armadillo domain</i>
C	citocina
C	cisteína
°C	grau Celsius
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COR	<i>C-terminal of ROC domain</i>
C-terminal	carboxiterminal
D	ácido aspártico
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos tri fosfatos
DP	Doença de Parkinson
E	ácido glutâmico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F	fenilalanina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fs	<i>frame-shift</i>
G	guanine
G	glicina
GDP	5'-difosfato de guanosina
GTP	5'-trifosfato de guanosina
H	histidina
HgaI	enzima de restrição <i>Haemophilus gallinarum</i>
I	isoleucina
IM	idade de manifestação
K	lisina
kb	quilobase

kDa	quilodalton
L	leucina
LRR	<i>leucine-rich repeat domain</i>
<i>LRRK2</i>	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
M	metionina
M	molar
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase domain</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
N	asparagina
N-terminal	amino-terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
p	braço curto de um cromossomo
P	prolina
pb	par de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	potencial hidrogeniônico
Q	glutamina
q	braço longo de um cromossomo
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
T	timina
TBE	tampão tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N' tetrametiletlenodiamina
Tris	trihidroximetil aminometano
U	unidade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
V	volt
W	triptofano

Y	tirosina
ng	nanograma
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
pmol	picomol



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	44
2.1	<b>Pacientes</b> .....	44
2.2	<b>Extração de DNA genômico</b> .....	45
2.3	<b>Estimativa da concentração e da integridade do DNA</b> .....	45
2.4	<b>Rastreamento de mutações no gene <i>LRRK2</i></b> .....	46
2.4.1	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> .....	46
2.4.2	<u>Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação</u> .....	50
2.4.3	<u>Purificação dos produtos da PCR</u> .....	50
2.4.4	<u>Sequenciamento automático</u> .....	50
2.5	<b>Análise das alterações em indivíduos controles</b> .....	52
2.6	<b>Ferramentas eletrônicas</b> .....	55
2.7	<b>Estudo de modelagem molecular e dinâmica molecular</b> .....	56
2.7.1	<u>Busca de estruturas cristalográficas homólogas aos domínios de interesse</u> .....	56
2.7.2	<u>Visualização da estrutura cristalográfica do domínio ROC</u> .....	57
2.7.3	<u>Modelagem das regiões ausentes na estrutura cristalográfica do dímero ROC</u> ....	57
2.7.3.1	Ferramenta SWISS-MODEL.....	57
2.7.3.2	Ferramenta Modeller 9v7.....	58
2.7.3.3	Avaliação dos modelos obtidos, através da ferramenta “Structural Analysis and Verification Server”.....	58
2.7.4	<u>Estudo de dinâmica molecular</u> .....	58
3	<b>RESULTADOS</b> .....	59
3.1	<b>Alterações identificadas</b> .....	59
3.2	<b>Resultados das análises <i>in silico</i></b> .....	62
3.3	<b>Características fenotípicas dos pacientes portadores de alterações no gene <i>LRRK2</i></b> .....	65
3.4	<b>Características das variantes encontradas</b> .....	67
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	90
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	106

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107
<b>ANEXO A</b> – Termo de consentimento dos pacientes.....	121
<b>ANEXO B</b> – Termo de consentimento da amostra controle.....	122
<b>ANEXO C</b> – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UERJ.....	123
<b>ANEXO D</b> – A study of LRRK2 mutations and Parkinson’s disease in Brazil...	124
<b>ANEXO E</b> – Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson’s disease.....	129
<b>ANEXO F</b> – Pacientes analisados para alterações no gene <i>LRRK2</i> e suas características principais.....	132
<b>ANEXO G</b> – Resultados das análises moleculares do gene <i>LRRK2</i> em pacientes com doença de Parkinson.....	137
<b>ANEXO H</b> – Resultados das análises moleculares do gene <i>LRRK2</i> em indivíduos saudáveis (amostra controle).....	162

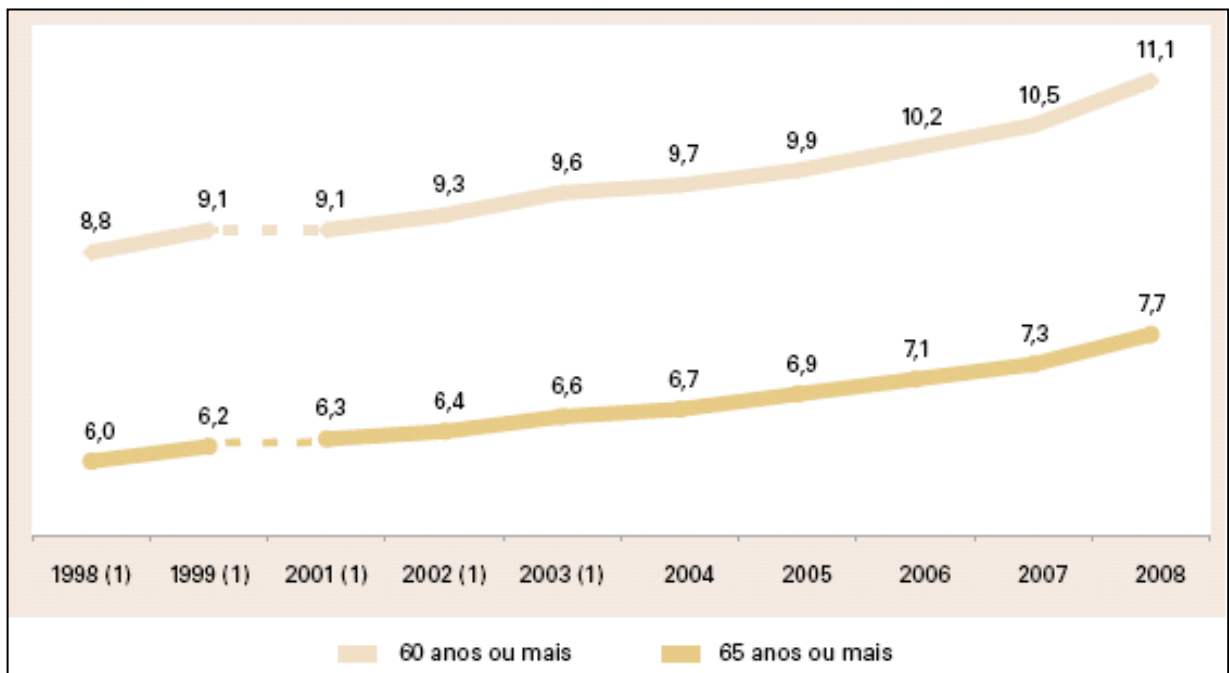
## INTRODUÇÃO

### A doença de Parkinson

Descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, a doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) é a doença neurodegenerativa motora mais comum e a segunda doença neurodegenerativa mais frequente depois da Doença de Alzheimer (Tanner & Aston, 2000). Sua incidência é similar no mundo todo afetando aproximadamente 1% da população com idade superior a 65 anos, aumentando para 4-5% aos 85 anos (Fahn, 2003). Esta condição é mais prevalente em homens do que em mulheres e cerca de 4% dos pacientes desenvolvem a DP antes dos 50 anos (Belin & Westerlund, 2008).

Devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial, espera-se que a prevalência da DP aumente consideravelmente (Lin *et al.*, 2009). O impacto desta doença está relacionado à sua taxa de mortalidade que é duas a cinco vezes mais alta em pacientes do que em controles, resultando na redução da qualidade de vida e da expectativa de vida (Lin *et al.*, 2009). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que a população idosa no Brasil tem tomado proporções significativas. Entre 1998 e 2008, a proporção de idosos aumentou de 8,8% para 11,1%, revelando que em 2008 o contingente de pessoas de mais de 60 anos somava cerca de 21 milhões (IBGE, 2009) (**gráfico 1**).

**Gráfico 1** - Proporção de idosos (em porcentagem) de 60 e 65 anos ou mais de idade no Brasil de 1998 a 2008.



Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 1998/2008. (1): Excluída a população rural de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá.

As características patológicas da DP incluem a despigmentação da substância nigra do mesencéfalo devido à perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos e a presença de inclusões proteicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes (Forno, 1996). Acredita-se que os corpos de Lewy são formados como resposta citoprotetora aos níveis excessivos de proteínas anormais potencialmente tóxicas nos neurônios (Andrade *et al.*, 2010). A perda de neurônios e a presença de inclusões proteicas também são observadas em outras regiões cerebrais do sistema nervoso central e periférico, incluindo o bulbo olfatório, o núcleo da medula oblonga, a ponte, o locus coeruleus, a amígdala, o núcleo basal de Meynert, e nos estágios avançados da doença, o estriado e o córtex cerebral (Para revisão: Gomez & Ferrer, 2010). A deficiência de dopamina no sistema nervoso causa anomalias nos circuitos motores resultando nas manifestações clínicas da DP (Belin & Westerlund, 2008).

Clinicamente, esta doença caracteriza-se pela presença de três sintomas motores principais (i) tremor em repouso, (ii) bradicinesia, (iii) rigidez muscular e instabilidade postural, os quais podem ser controlados com a administração de um precursor exógeno da

dopamina, o levodopa ( $L$ -3,4-dihidroxifenilalanina). Entretanto, esta substância é ineficaz no tratamento de sintomas não motores que podem também ser observados em pacientes com DP e, muitas vezes, precederem aos sintomas motores. Os dados prospectivos relacionados aos sintomas não motores são ainda raros, mas apontam que constipação, hiposmia (disfunção olfativa) e distúrbio comportamental do sono REM podem preceder o diagnóstico formal da DP. A perda da sensibilidade olfativa, por exemplo, ocorre em 70 a 90% dos pacientes com DP (Andrade *et al.*, 2010). Dentre outros sintomas não motores, destacam-se depressão, ansiedade, distúrbios do humor, disautonomia, déficit cognitivo e perda de peso (Alves *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010; Dauer & Ho, 2010). Contudo, um diagnóstico definitivo da doença requer a confirmação pós-morte de análises histopatológicas de tecido cerebral (Alves *et al.*, 2008), pois a presença de inclusões é um critério utilizado para diferenciar a DP de outras desordens associadas com parkinsonismo (Forno, 1996).

Atualmente não há cura para esta doença e as vias moleculares envolvidas com esta patologia ainda são obscuras, porém considera-se a DP uma doença complexa, resultante da interação entre fatores ambientais e causas genéticas (Thomas & Beal, 2007). Durante muitos anos, a DP foi vista como uma doença não genética, sendo inúmeros fatores ambientais apontados como causa desta doença, tais como, a utilização de drogas sintéticas, doenças infecciosas, exposição a substâncias tóxicas, exposição a herbicidas e pesticidas (paraquat, rotenona), vida rural, consumo de água de poço e traumas na cabeça (Hardy, 2006).

Entretanto, estudos de associação genética e a identificação de famílias com uma clara herança mendeliana da doença trouxeram evidências de que os fatores genéticos desempenham um importante papel na etiologia da DP (Duvoisin, 1998) (**tabela 1**). Familiares de pacientes com a doença possuem um risco 3 a 4 vezes maior de desenvolver a DP, comparados com pessoas da população normal (Autere *et al.*, 2000).

**Tabela 1** - Genes e *loci* descritos envolvidos na doença de Parkinson familiar.

<i>Locus</i> gênico e posição cromossômica	Gene*	Proteína	Modo de herança**	Idade de manifestação da DP	OMIM®****
PARK1 (=PARK4) (4q21)	<i>SNCA</i>	$\alpha$ -sinucleína	AD	38-65 anos 24-48 anos	163890
PARK2 (6q25.2-q27)	<i>PRKN</i>	Parkin	AR	~30 anos	602544
PARK3 (2p13)	-	-	AD	~60 anos	602404
PARK5 (4p14)	<i>UCHL1</i>	UCHL1	AD	55-58 anos	191342
PARK6 (1p35-p36)	<i>PINK1</i>	PINK1	AR	20-40 anos	608309
PARK7 (1p36)	<i>DJ1</i>	DJ1	AR	20-40 anos	606324
PARK8 (12q12)	<i>LRRK2</i>	LRRK2 ou Dardarina	AD	50-70 anos	609007
PARK9 (1p36)	<i>ATP13A2</i>	ATP13A2	AR	20-40 anos	606693
PARK10 (1p32)	-	-	AD	50-60 anos	606852
PARK11 (2q36-q37)	<i>GIGYF2</i>	-	AD	tardio	607688
PARK12 (Xq21-25)	-	-	Cromossomo X	tardio	300557
PARK13 (2p13)	<i>HTRA2</i>	HtrA2 ou Omi	-	tardio	606441
PARK14 (22q13.1)	<i>PLA2G6</i>	PLA2G6	AR	juvenil	612953
PARK15 (22q12-13)	<i>FBXO7</i>	FBXO7	AR	precoce	260300
PARK16 (1q32)	-	-	-	-	-
1q21	<i>GBA</i>	GBA	AD	-	606463

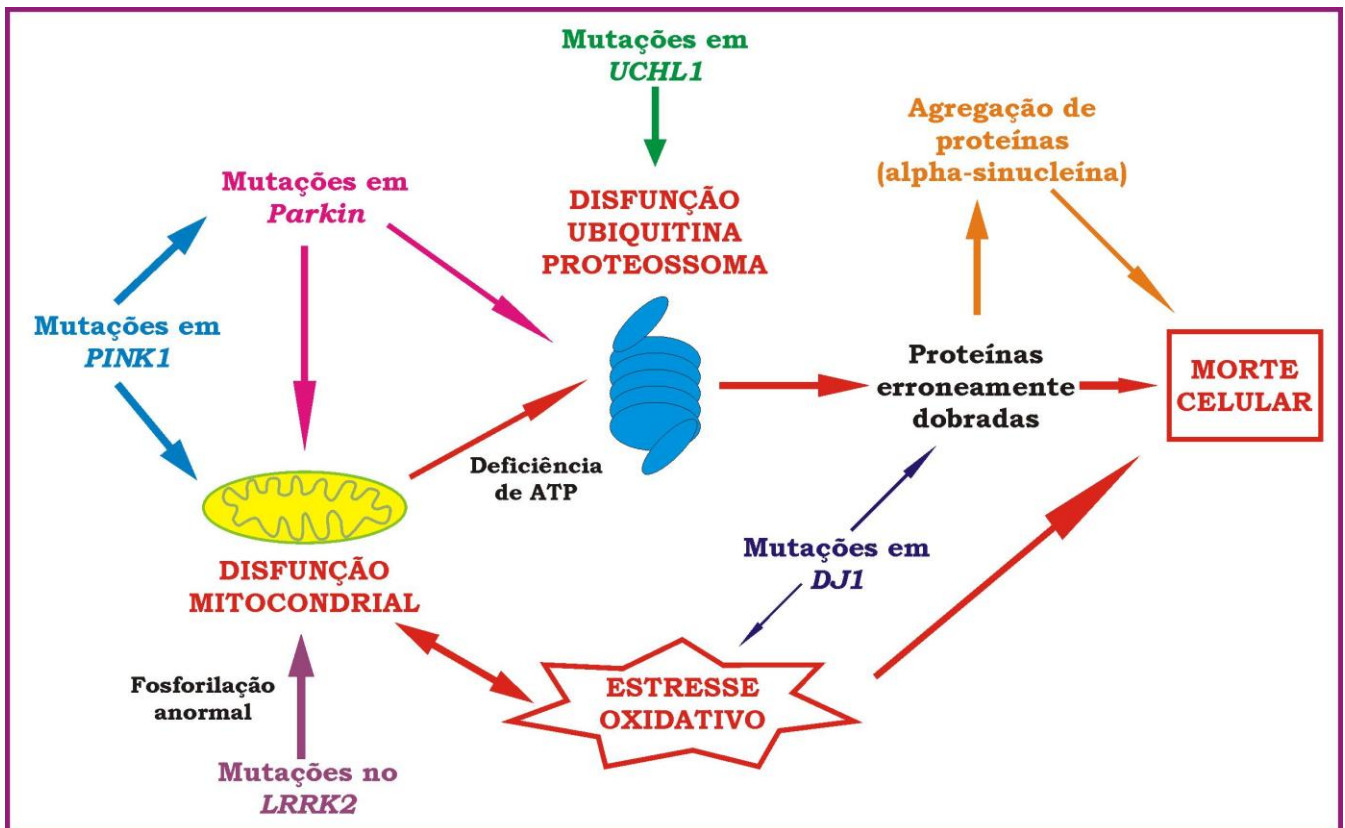
\**SNCA*,  $\alpha$ -synuclein; *PRKN*, Parkin; *UCHL1*, ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1; *PINK1*, *PTEN*-induced putative kinase 1; *DJ1*, oncogene *DJ1*; *LRRK2*, leucine-rich repeat kinase 2; *ATP13A2*, *ATPase* type 13A2; *HTRA2*, *HTRA* serine peptidase 2; *PLA2G6*, phospholipase A2, group VI; *FBXO7*, *F-box* only protein 7; *GBA*, Glucocerebrosidase (Belin & Westerlund, 2008; Biskup *et al.*, 2008; Schulz, 2008; Seol, 2010 - com modificações).

\*\*AD – autossômica dominante/ AR – autossômica recessiva.

\*\*\*OMIM<sup>®</sup>, *Online Mendelian Inheritance in Man*<sup>®</sup>.

Dos genes identificados, seis estão associados a formas recessivas de parkinsonismo: *PRKN*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2*, *PLA2G6* e *FBXO7* e outros cinco, *SNCA*, *UCHL1*, *LRRK2*, *GIGYF2* e *GBA* estão associados a formas dominantes da doença. O gene *HTRA2* ainda não foi associado a um tipo determinado de herança.

Dados da literatura sinalizam que mutações em alguns destes genes comprometem determinadas vias metabólicas como o sistema ubiquitina-proteossomo e a função mitocondrial (Biskup *et al.*, 2008; Schulz, 2008) (**figura 1**).



**Figura 1** - Vias comuns ligadas à patogênese da DP. As mutações patogênicas nos genes *SNCA*, *Parkin*, *UCHL1*, *PINK1*, *DJ1* e *LRRK2* causam a DP devido à disfunção do sistema ubiquitina-proteossomo, à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo, comprometendo vias importantes na sobrevivência e na função neuronal dopaminérgica (Farrer, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006; Thomas & Beal, 2007 - com modificações).

A disfunção do sistema ubiquitina-proteossomo resulta em um controle de qualidade de proteínas alterado, o que leva à agregação acelerada de proteínas dentro da célula (Krüger *et al.*, 2002; Skovronsky *et al.*, 2006). A agregação da  $\alpha$ -sinucleína representa um passo crucial na patogênese da DP, visto que esta proteína é o principal componente dos corpos de Lewy. Mutações no gene *Parkin* prejudicam a função da proteína Parkin que é uma ubiquitina E3-ligase, envolvida na degradação de proteínas via ubiquitina-proteossomo e que pode estar localizada na mitocôndria, possuindo um papel no aumento da biogênese mitocondrial. *UCHL1* possui funções ubiquitina-hidrolase e ubiquitina E3-ligase e mutações neste gene promovem a agregação de proteínas. A disfunção mitocondrial leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e à redução na produção de ATP, o que pode comprometer o sistema ubiquitina-proteossomo. Mutações no gene *PINK1* interferem na função mitocondrial, prejudicam a síntese de ATP e aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio (Gandhi *et al.*, 2009). Além disso, PINK1 pode modular a atividade e a estabilidade de Parkin indicando que estas proteínas podem atuar na mesma via (Dodson & Guo, 2007). *DJI* codifica uma proteína antioxidante e sua função chaperona previne o dobramento incorreto de proteínas. Mutações em *DJI* estão associadas com o estresse oxidativo e possivelmente com a apoptose celular (Farrer, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006; Dodson *et al.*, 2007; Thomas & Beal, 2007) (**figura 1**).

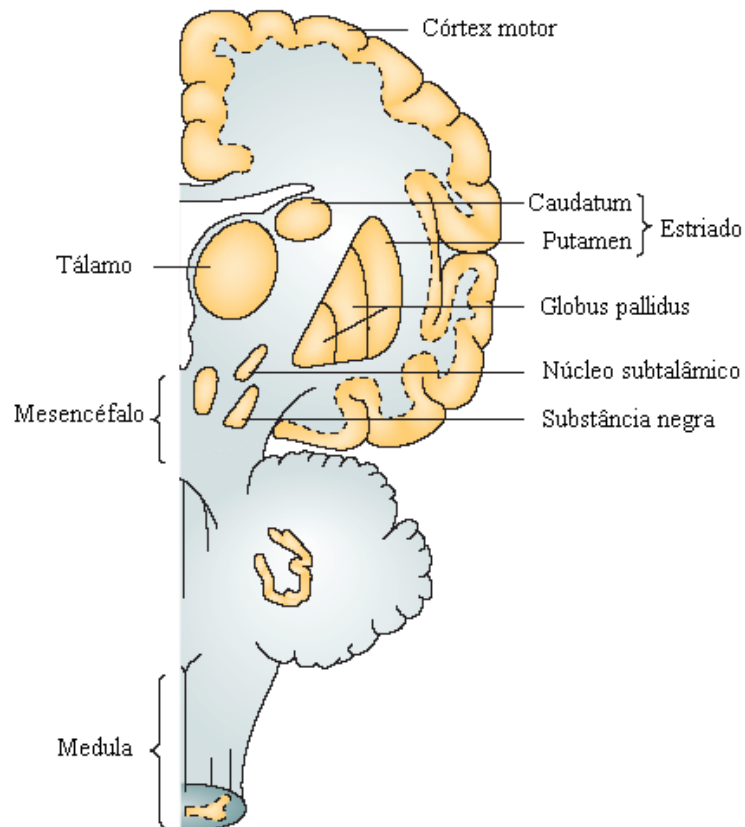
Particularmente, mutações no gene *LRRK2* constituem a forma mais comum da DP. Cerca de 10% da proteína LRRK2 está localizada na membrana mitocondrial externa (West *et al.*, 2005). Entre os diferentes domínios funcionais, a proteína LRRK2 possui o domínio catalítico serina/treonina quinase (MAPKKK). Mutações patogênicas neste domínio e em outros domínios da proteína são responsáveis por aumentarem sua atividade quinase (West *et al.*, 2007). A fosforilação anormal de proteínas possivelmente inclui proteínas da mitocôndria, podendo afetar diretamente a função mitocondrial (Henchcliffe & Beal, 2008; Lin *et al.*, 2009) (**figura 1**).

### **O gene *LRRK2***

O gene *leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*, OMIM 609007) está localizado na região cromossômica 12q12 no locus PARK8 (Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004; Funayama *et al.*, 2005). Este gene possui 51 exons distribuídos em 144 Kb de extensão, sendo



expresso em humanos em diversas regiões, como coração, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético e pâncreas (Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Miklossy *et al.*, 2006). Seu transcrito de 9 Kb é expresso em todas as células do sistema nervoso (Miklossy *et al.*, 2006) sendo amplamente identificado na substância nigra, no núcleo *caudatum* e no *putamen* (Zimprich *et al.*, 2004) (**figura 2**).

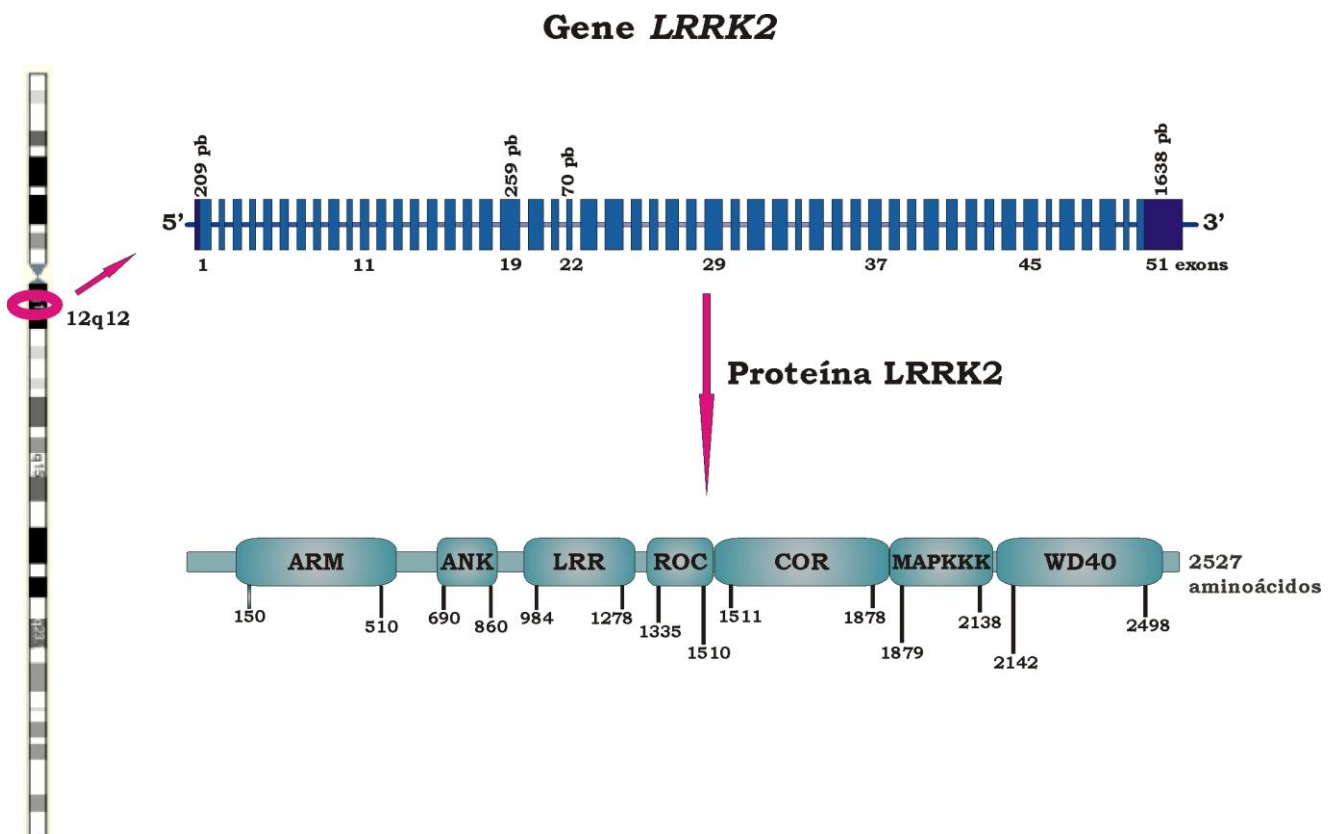


**Figura 2** - Seção lateral de um cérebro humano com a porção anterior para a esquerda. As principais regiões do cérebro afetadas na DP estão destacadas em amarelo (Farrer, 2006).

### A proteína LRRK2

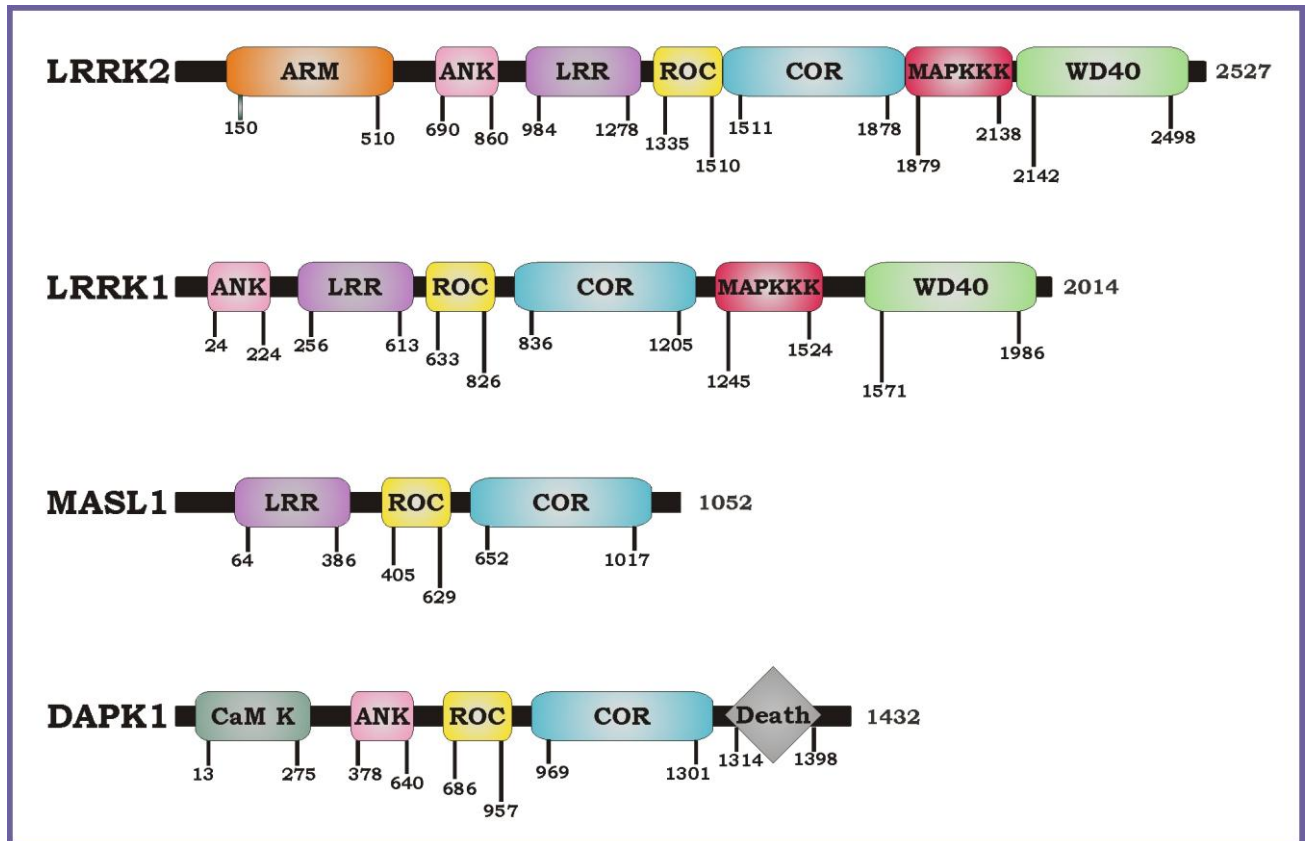
Conhecida também como dardarina, termo derivado da palavra Basca *dardara* que significa tremor, a proteína LRRK2 é formada por 2.527 aminoácidos com massa molecular de 286 kDa (Paizan-Ruíz *et al.*, 2004) (**figura 3**). Esta proteína pertence ao grupo de proteínas

ROCO dentro da superfamília Ras/GTPase e possui sete domínios. Um domínio ARM (*armadillo*), ANK (*ankyrin repeat*) e LRR (*leucine rich repeat*) estão presentes na metade N-terminal da proteína, seguidos por um domínio ROC (Ras - *renin-angiotensin system* - em proteínas complexas) e um domínio COR (*C-terminal of ROC*). O domínio catalítico de tirosina quinase, MAPKKK (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) e o domínio WD40 estão presentes no final C-terminal da proteína (Giasson & Van Deerlin, 2008; Lesage & Brice, 2009; Sheng *et al.*, 2010) (**figura 3**).



**Figura 3** - Esquema do gene *LRRK2* e de sua proteína, mostrando a região no cromossomo 12 onde ele se encontra, a estrutura do gene *LRRK2* e da proteína LRRK2. ARM- domínio armadillo; ANK- domínio ankirina; LRR – domínio rico em repetições leucina; ROC – domínio ROC; COR – domínio COR; MAPKKK – domínio MAPKKK; WD40 – domínio WD40 (Lu & Tan, 2008, Kumari & Tan, 2009; Sheng *et al.*, 2010 - com modificações).

Além da proteína LRRK2, três outras proteínas pertencem à família ROCO (termo combinado de ROC e COR) em humanos: *leucine-rich repeat kinase 1* (LRRK1), *death-associated protein kinase* (DAPK1) e *malignant fibrous histiocytoma-amplified sequence with leucine-rich tandem repeats-1* (MASL1) (**figura 4**). Destas proteínas, a LRRK1 exibe o maior grau de similaridade com a proteína LRRK2 (70% de homologia dos domínios ROC, COR e MAPKKK) (Guo *et al.*, 2006; Dächsel *et al.*, 2010a). Até o momento, não há relatos indicando que estas proteínas estejam relacionadas à DP. Entretanto, um recente estudo *in vitro* mostrou que a LRRK1 e a LRRK2 podem se associar e formar um heterodímero, indicando uma possível interação entre as duas proteínas (Dachsel *et al.*, 2010b). Além disso, a avaliação de variantes no gene *LRRK1* em pacientes portadores da alteração p.G2019S no *LRRK2*, mostrou que o polimorfismo p.L416M no gene *LRRK1* foi associado à diminuição da idade de manifestação da DP nestes indivíduos (Dachsel *et al.*, 2010b).



**Figura 4** - Esquema das proteínas da família ROCO e seus respectivos domínios. ARM- domínio armadillo; ANK- domínio ankirina; LRR – domínio rico em repetições leucina; ROC – domínio ROC; COR – domínio COR; MAPKKK – domínio MAPKKK; WD40 – domínio WD40; CaM K - domínio cálcio/calmodulina-regulado por quinase; Death – domínio *death* com função apoptótica (Fonte: Guo *et al.*, 2006; Dashsel *et al.*, 2010a).

Em relação aos seus domínios, a proteína LRRK2 possui múltiplos domínios de interação proteína-proteína (armadillo, ankirina, LRR e WD40) o que sugere que ela seja uma proteína multifuncional e que forme complexos com outras proteínas (Lesage *et al.*, 2007a; Kumari & Tan, 2009). Domínios armadillo são identificados em muitas proteínas de eucariotos. Proteínas com esta estrutura podem estar envolvidas com o citoesqueleto e com vias de sinalização, dentre outras funções (Tewari *et al.*, 2010).

Repetições de ankirina são encontradas em diversas proteínas bacterianas e de eucariotos, incluindo proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, proteínas de sinalização e de regulação do ciclo celular (Mata *et al.*, 2006b).

Proteínas que contêm regiões ricas em repetições leucina (LRRs) estão associadas a diversas funções que envolvem interação proteína-proteína, como interações com receptores de hormônios, inibição de enzimas, adesão celular, tráfego celular, processamento de RNA e ligação a substratos para ubiquitinação (Kobe & Kajava, 2001).

Domínios WD40 têm sido implicados na transdução de sinais, no processamento de pré-RNA e no arranjo do citoesqueleto. O domínio COR possui uma função ainda desconhecida (Smith *et al.*, 1999).

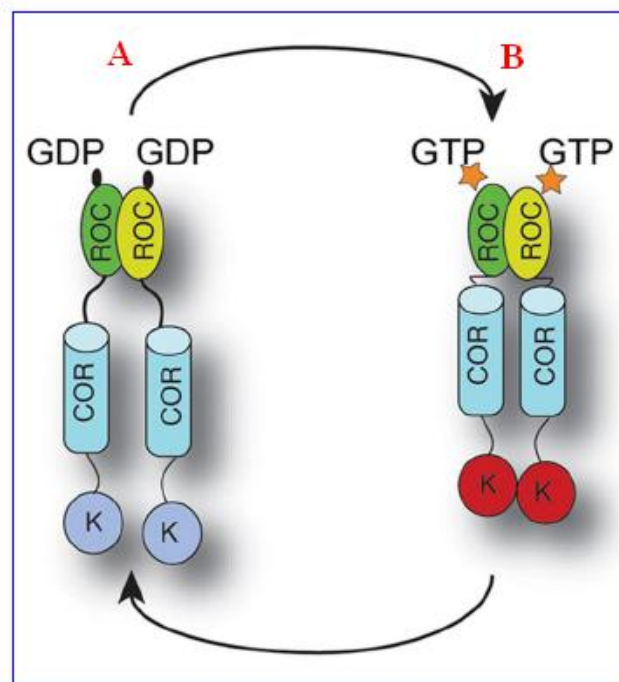
Os domínios ROC-GTPase e MAPKKK estão envolvidos na regulação intramolecular da proteína LRRK2 (Guo *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008). Domínios ROC-GTPase se assemelham à família de GTPases Rab (Ras no cérebro) que estão envolvidas na sinalização mitogênica, no transporte vesicular, na reorganização do citoesqueleto e no transporte núcleo-citoplasma (Guo *et al.*, 2006).

Enzimas com domínios MAPKKK compartilham um centro catalítico conservado, comum a proteínas serina/treonina quinases e tirosina quinases. Elas exercem sua função catalisando a transferência de  $\gamma$ -fosfato do ATP para resíduos de tirosina em substratos proteicos (Hubbard & Till, 2000). Cascatas de MAPquinases são mecanismos chaves para a regulação de muitas funções celulares, tais como o crescimento celular, a transformação e a apoptose. Elas podem ser iniciadas através de proteínas Ras, responsáveis por transmitirem o sinal extracelular de um receptor a uma cascata de quinases citosólicas, ativando proteínas MAPKKK. Uma vez ativadas, estas proteínas fosforilam e ativam proteínas MAPKK, que por sua vez, fosforilam e ativam proteínas MAPK, as quais fosforilam substratos citosólicos e nucleares relacionados a várias funções celulares (Guo *et al.*, 2006).

A presença de ambos os domínios ROC-GTPase e MAPKKK na proteína LRRK2 representa um mecanismo análogo a pequenas GTPases (H-Ras), que ativam proteínas quinases (Moore, 2008). A ligação do GTP a uma GTPase leva ao recrutamento e à ativação de uma quinase. Quando o GTP é convertido a GDP a associação entre a GTPase e a quinase termina (Dauer & Ho, 2010). O domínio ROC possui atividade GTPase, sendo responsável por hidrolizar o GTP. Sua ligação ao GTP é necessária para estimular a atividade quinase do domínio MAPKKK (Smith *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007). *In vitro*, a atividade quinase da LRRK2 é aumentada pelo tratamento com análogos do GTP não hidrolizáveis ou reprimida pelo tratamento com GDP. A atividade quinase pode também ser prejudicada pela presença de mutações que comprometem a hidrólise do GTP. Contudo, não ocorre um efeito inverso, visto que mutações que prejudicam a atividade quinase não influenciam na ligação ou hidrólise do GTP. Além disso, mutações no domínio COR também influenciam na atividade

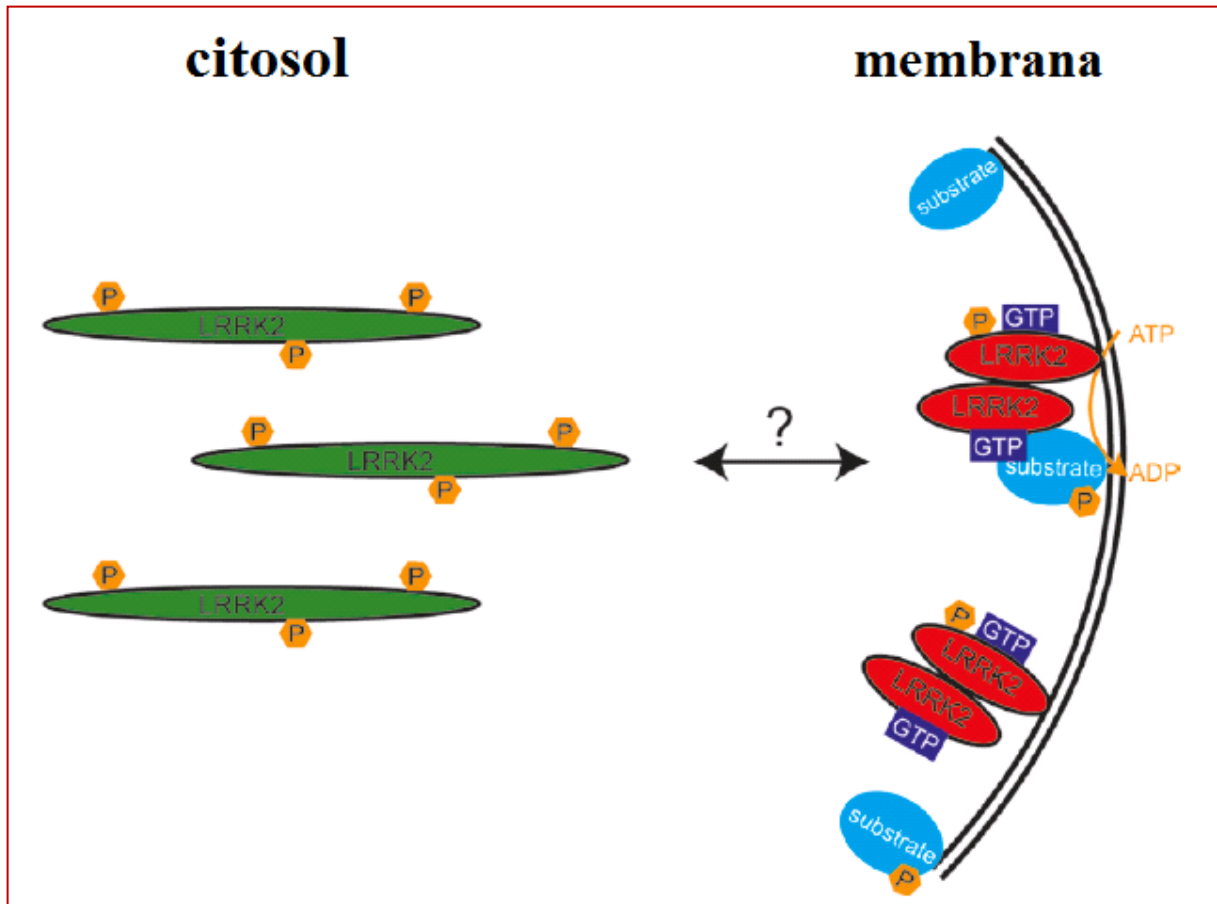
quinase, mostrando que este domínio pode estar envolvido no mecanismo de regulação da LRRK2 (West *et al.*, 2007).

Predominantemente, a proteína LRRK2 é um dímero formado pela interação dos domínios ROC de cada monômero (Deng *et al.*, 2008; Greggio *et al.*, 2008). Deng e colaboradores (2008) propuseram um modelo de regulação da proteína LRRK2, sugerindo que a atividade quinase é alterada pela mudança de conformação através da ligação ao GTP (estado ativo) e GDP (estado inativo) (**figura 5**). Assim, quando o domínio ROC se liga ao GTP, ocorre a dimerização de COR, o que induz à autointeração do domínio MAPKKK, resultando em sua atividade de fosforilação. Com a conversão do GTP ao GDP, mudanças conformacionais em ROC interrompem o dímero COR e MAPKKK, inativando a atividade quinase (Deng *et al.*, 2008) (**figura 5**).



**Figura 5** - Modelo de regulação do dímero LRRK2 proposto por Deng e colaboradores (2008). **(A)** Com a hidrólise do GTP a GDP, mudanças conformacionais no dímero ROC (verde e amarelo) interrompem o dímero COR (azul claro) e MAPKKK, inativando a atividade quinase (azul). **(B)** Na ligação ao GTP o domínio ROC dimérico (verde e amarelo) induz a dimerização de COR (azul claro), induzindo a auto-interação do domínio MAPKKK, resultando em sua atividade de fosforilação (vermelho) (Deng *et al.*, 2008).

A proteína LRRK2 está presente no citosol e pode estar associada a várias organelas (Gloeckner *et al.*, 2006). Em células de mamíferos, esta proteína localiza-se nas mitocôndrias, em membranas microssomais, no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi, nos microtúbulos, nos endossomos, nos lisossomos e no envelope nuclear (West *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006; Hatano *et al.*, 2007). Em pacientes com DP, a proteína LRRK2 pode ser encontrada nos corpos de Lewy (Zhu *et al.*, 2006; Alegre-Abbarategui *et al.*, 2008). Embora a LRRK2 esteja presente em ambos citosol e membranas de organelas, um estudo realizado em células cerebrais de camundongos e primatas mostrou que a presença da LRRK2 em diferentes compartimentos celulares está relacionada à sua atividade. A associação da LRRK2 a membranas está ligada a eventos bioquímicos como a diminuição de seu nível de fosforilação em certos sítios, aumento de sua dimerização, ligação mais eficiente ao GTP, atividade kinase aumentada, quando comparado à sua presença no citosol, mostrando que o dímero associado a membranas representa a forma ativa da proteína. Isto sugere que eventos pós traducionais, como a fosforilação da proteína LRRK2, contribuem para a regulação de sua função (Berger *et al.*, 2010) (**figura 6**).



**Figura 6** - Esquema do modelo proposto para a regulação da LRRK2. No citosol, a LRRK2 está mais fosforilada e presente na forma de monômero, onde ela pode se translocar para a membrana. Ligada à membrana, esta proteína está menos fosforilada e em forma de dímero, estando mais propensa a se ligar ao GTP, com atividade quinase aumentada e, consequentemente, podendo fosforilar seus substratos (Berger *et al.*, 2010).

### Prováveis funções da LRRK2 e interação com outras proteínas

Embora a estrutura da proteína LRRK2 seja bem definida, a elucidação de sua função biológica necessita ser esclarecida (Häbig *et al.*, 2008). Em neurônios, esta proteína está relacionada à regulação do crescimento dos neuritos, visto que a diminuição de sua expressão resulta no aumento do tamanho dos neuritos e da ramificação (MacLeod *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados na tentativa de identificar possíveis substratos e proteínas que interagem com a LRRK2. A proteína moesina, um membro da família de proteínas ERM (*exrin/radixin/moesin*), envolvidas na ancoragem do citoesqueleto de actina à



membrana plasmática, foi descrita como alvo para a fosforilação da LRRK2 *in vitro* (Jaleel *et al.*, 2007). Em humanos e em *Drosophila*, a LRRK2 pode fosforilar *in vitro* e *in vivo* a proteína 4E-BP, que é um regulador negativo da proteína mediadora de tradução eIF4E, a qual atua na resposta ao estresse e na manutenção neuronal dopaminérgica. A fosforilação de 4E-BP impede sua ligação inibitória a eIF4E, aumentando o estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos de *Drosophila* (Imai *et al.*, 2008).

O domínio ROC da LRRK2 pode interagir com o segundo domínio de RING-finger de Parkin, entretanto, a relação fisiológica entre estas duas proteínas ainda não é clara (Smith *et al.*, 2005). A interação *in vitro* do domínio ROC ocorre também com proteínas formadoras de microtúbulos,  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas. A nível celular, a LRRK2 colocaliza com  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas em neurônios do hipocampo primários de ratos. Esta associação é de extrema relevância, uma vez que os microtúbulos são componentes celulares envolvidos na patogênese de várias doenças neurodegenerativas (Gandhi *et al.*, 2008). Shin e colaboradores (2008) caracterizaram a interação da LRRK2 com a GTPase Rab5b, uma proteína reguladora do transporte de vesículas da membrana plasmática a endossomos. Ambas as proteínas colocalizam em regiões pré-sinápticas e a superexpressão ou a inibição da proteína LRRK2 prejudica a endocitose de vesículas sinápticas, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida em defeitos de transmissão sináptica (Shin *et al.*, 2008). Outra proteína, a chaperona Hsp90, pode interagir com o domínio kinase da LRRK2 *in vivo* e a inibição de Hsp90 interrompe esta ligação e leva à degradação proteossômica da LRRK2 (Wang *et al.*, 2008).

Proteínas da família DVL (DVL1 a 3), envolvidas na orientação axônica, na formação sináptica e na manutenção neuronal, podem interagir com o domínio ROC-COR da LRRK2. Além disso, DVL1 e LRRK2 colocalizam em neuritos de células dopaminérgicas SH-SY5Y diferenciadas. Estes dados sugerem uma possível regulação da LRRK2 por estas proteínas, tendo em vista que proteínas DVL interagem e medeiam a ativação de pequenas GTPases com similaridades estruturais ao domínio ROC (Sancho *et al.*, 2009). *In vitro*, a LRRK2 pode fosforilar, através de seu domínio kinase, a serina 129 da  $\alpha$ -sinucleína. Este resíduo é comumente fosforilado quando a  $\alpha$ -sinucleína está depositada nos corpos de Lewy. Além disso, a presença da mutação p.G2019S na LRRK2 conferiu uma maior capacidade de fosforilar a  $\alpha$ -sinucleína, explicando como o ganho de função causado por esta mutação pode estar relacionado à DP (Qing *et al.*, 2009).

Um trabalho realizado em células dopaminérgicas SH-SY5Y que expressavam baixos níveis da LRRK2 mostrou através *microarray* que 187 genes estavam diferencialmente

regulados. Estes genes estão envolvidos, dentre outras funções, na orientação axonal, no desenvolvimento do sistema nervoso, no ciclo celular, no crescimento celular, na diferenciação celular, na comunicação celular, em cascatas de MAPKKK e na transdução de sinais (Häbig *et al.*, 2008). Outro estudo mais recente mostrou que indivíduos com DP portadores da mutação p.G2019S apresentaram uma alteração no padrão de expressão gênica em células do sangue mononucleadas. Muitos genes que foram desregulados estão envolvidos em sistemas afetados na DP como o sistema ubiquitina-proteosomo, a via de oxidação mitocondrial e a apoptose. Além dessas vias, foram detectadas alterações na expressão de genes envolvidos em cascatas de MAPK, ciclo celular, adesão celular, citoesqueleto, metabolismo lipídico, transcrição, tradução e transporte vesicular (Mutez *et al.*, 2010).

### **Mutações no gene *LRRK2* versus Doença de Parkinson**

Um estudo de ligação em uma extensa família japonesa com DP autossômica dominante de manifestação tardia levou à identificação de um *locus* no cromossomo 12 denominado PARK8 (Funayama *et al.*, 2002). A ligação desta região cromossômica com a DP foi posteriormente confirmada em duas famílias de ancestralidade europeia que apresentaram mutações no gene *LRRK2* (Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Zimprinch *et al.*, 2004). Desde então, inúmeras pesquisas foram realizadas a fim de correlacionar mutações neste gene com o desenvolvimento da DP.

Até o momento, sete mutações *missense* associadas com a forma autossômica dominante da DP já tiveram o seu caráter patogênico confirmado: c.4321C>T (p.R1441C), c.4321C>G (p.R1441G), c.4322G>A (p.R1441H), c.5096A>G (p.Y1699C), c.6055G>A (p.G2019S), c.6059T>C (p.I2020T) (Healy *et al.*, 2008; Nuytemans *et al.*, 2010) e c.4309 A>C (p.N1437H) (Aasly *et al.*, 2010). Nenhuma alteração *frameshift* (Nichols *et al.*, 2007) ou deleções e duplicações envolvendo grande parte do gene *LRRK2* foram identificadas (Paisán-Ruíz *et al.*, 2008).

A maioria dos pacientes com mutações no *LRRK2* exibem características similares aos casos esporádicos da DP, incluindo boa resposta ao tratamento com carbidopa/levodopa. Grande parte dos pacientes com mutações neste gene recorre aos neurologistas quando manifestam tremor de repouso e bradicinesia, similar aos casos esporádicos (Biskup & West,

2009). Entretanto, estudos em um grande número de pacientes com mutações no *LRRK2* indicam que estes apresentam sintomas mais brandos em relação aos pacientes com DP idiopática (Healy *et al.*, 2008). Além disso, na maioria dos pacientes ocorre perda neuronal dopaminérgica e os corpos de Lewy estão presentes, embora algumas diferenças patológicas tenham sido observadas (Bonifati, 2007; Giasson & Van Deerlin, 2008). Em poucos indivíduos com mutações no *LRRK2* os corpos de Lewy foram ausentes e somente inclusões ubiquitina-positivas ou tauopatias foram detectadas (Zimprinch *et al.*, 2004; Gaig *et al.*, 2007). A patologia pleiomórfica pode ocorrer entre portadores de uma mesma mutação e até dentro de uma mesma família (Zimprinch *et al.*, 2004).

A mutação mais comum no gene *LRRK2*, a c.6055G>A (p.G2019S), está situada no exon 41 dentro do domínio MAPKKK da proteína (Di Fonzo *et al.*, 2005, 2006a; Gilks *et al.*, 2005; Mata *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2005). Esta mutação encontra-se difundida em diversas populações mundiais, constituindo a causa mais comum de DP (Aasly *et al.*, 2005; Bras *et al.*, 2005; Lesage *et al.*, 2005; Gaig *et al.*, 2006; Goldwurm *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2006a; Ozelius *et al.*, 2006; Punia *et al.*, 2006; Zabetian *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Xiromerisiou *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2008). Entretanto, sua frequência varia muito de acordo com a origem geográfica e étnica da população estudada. Uma prevalência extremamente alta da mutação p.G2019S foi encontrada entre pacientes árabes do Norte da África (37% de casos familiares e 41% de casos esporádicos) (Lesage *et al.*, 2006) e entre pacientes judeus Ashkenazi (~29% de casos familiares e ~13% de casos esporádicos) (Ozelius *et al.*, 2006). Na África do Sul esta frequência é de 2% (Bardien *et al.*, 2010) e a p.G2019S não foi identificada na Nigéria (Okubadejo *et al.*, 2008). Em pacientes com DP do Norte da Europa esta alteração está presente em uma baixa frequência (Aasly *et al.*, 2005; Bialecka *et al.*, 2005; Carmine *et al.*, 2006; Pchelina *et al.*, 2006; Williams-Gray *et al.*, 2006) em comparação com pacientes do Sul da Europa, como a Itália (1,3 a 5,7% de casos familiares e 0,4 a 2% de casos esporádicos) (Goldwurm *et al.*, 2005; 2006; Marongiu *et al.*, 2006; Civitelli *et al.*, 2007; Squillaro *et al.*, 2007). A prevalência da mutação p.G2019S em pacientes com DP na Espanha e em Portugal varia de ~6-18% dos casos familiares e ~3-6% dos casos esporádicos (Bras *et al.*, 2005; Gaig *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2006a; Ferreira *et al.*, 2007). Na América do Norte, a frequência da mutação p.G2019S varia de 0,5-5% (Deng *et al.*, 2005; Farrer *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). Em contrapartida, em populações asiáticas (chineses, japoneses, coreanos e indianos) esta alteração é rara (<0,4%) (Lu *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2006; Punia *et al.*, 2006; Zabetian *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008). No

Chile, a mutação p.G2019S foi encontrada em 3% dos pacientes com DP (Perez-Pastene *et al.*, 2007). No Uruguai, a frequência da p.G2019S foi de 4,8% e no Peru esta frequência foi significativamente menor (0,4%) (Mata *et al.*, 2009). Similar à frequência encontrada no Peru, a alteração p.G2019S estava presente em 0,3% dos pacientes com DP mexicanos (Yescas *et al.*, 2010). Um estudo realizado por nosso grupo, mostrou que ~2% dos pacientes brasileiros com DP eram portadores desta alteração (Pimentel *et al.*, 2008).

Um importante fator a ser considerado no aconselhamento genético é o fato da penetrância da mutação p.G2019S ser incompleta. Sua penetrância aumenta com a idade variando de 17-33% aos 50 a 55 anos e de 24-100% aos ~80 anos, dependendo da amostra estudada e do método utilizado para o cálculo (Kachergus *et al.*, 2005; Lesage *et al.*, 2005; Goldwurm *et al.*, 2007). Apesar da penetrância da mutação variar com a idade, indivíduos homocigotos para a p.G2019S são clinicamente idênticos aos indivíduos heterocigotos (Ishihara *et al.*, 2006).

Um outro *hotspot* mutacional no gene *LRRK2* está localizado no exon 31 onde três mutações diferentes afetam um mesmo resíduo da proteína (c.4321C>T, p.R1441C; c.4321C>G, p.R1441G; c.4322G>A, p.R1441H) (Zimprich *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2005; Zabetian *et al.*, 2005; Di Fonzo *et al.*, 2006a). A variante p.R1441G é muito frequente em pacientes com DP do Norte da Espanha, sendo a prevalência mais alta encontrada nas populações bascas (8%) (Paizán-Ruíz *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2005; Gaig *et al.*, 2006), indicando ser esta alteração possivelmente restrita a estas populações. Entretanto, a mutação p.R1441G também foi identificada com baixa frequência na América Latina, no Chile e México (0,3%), sendo a origem étnica dos pacientes incerta (Yescas *et al.*, 2010). Um estudo da penetrância desta alteração na Espanha mostrou que ela variou de 12,5% aos 65 anos a 83,4% aos 80 anos (Ruiz-Martínez *et al.*, 2010). Já a mutação c.4321C>T (p.R1441C) foi encontrada numa frequência de 3,4% entre pacientes italianos com história familiar da DP. A outra mutação neste códon, c.4322G>A (p.R1441H), é bem menos frequente (Di Fonzo *et al.*, 2006a; Simón-Sánchez *et al.*, 2006; Yescas *et al.*, 2010).

A variante c.7153G>A (p.G2385R) está localizada no exon 48 do domínio WD40, sendo comum entre pacientes asiáticos com DP (Di Fonzo *et al.*, 2006b; Fung *et al.*, 2006; Farrer *et al.*, 2007; Funayama *et al.*, 2007; Tan, 2007; Tan *et al.*, 2007). Em 2006, Di Fonzo e colaboradores encontraram essa variante em, aproximadamente, 10% da população chinesa de Taiwan com DP e em 5% dos indivíduos controles, não sendo a mesma observada entre ocidentais. Outra análise em populações asiáticas identificou esta alteração em 6,7% dos

casos de DP de manifestação tardia, em 9,4% dos casos de manifestação precoce e em 3,9% dos indivíduos controles (Farrer *et al.*, 2007). Desta forma, a mutação p.G2385R representa

um fator comum de risco para a DP específico da população asiática (Di Fonzo *et al.*, 2006b; Funayama *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007).

Um segundo fator de risco para a DP na população asiática é a alteração p.R1628P, localizada no exon 34 do domínio COR. Esta variante possui maior frequência em pacientes com DP, quando comparada à população controle (Lu *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008; Pulkes *et al.*, 2010).

Devido ao fato dos exons 31 e 41 constituírem *hotspots* mutacionais, a grande maioria dos estudos restringe o teste genético a estes exons (Healy *et al.*, 2008). Estudos de triagem de toda a região codificante do gene *LRRK2* são conduzidos em menor escala, visto o grande número de exons existentes neste gene (51 exons) (Berg *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Paizán-Ruíz *et al.*, 2005; Di Fonzo *et al.*, 2006a; Mata *et al.*, 2006a; Johnson *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2007; Paisán-Ruíz *et al.*, 2008). No entanto, muitas alterações genéticas têm sido identificadas ao longo do gene e avaliadas quanto à sua patogenicidade ou ao risco aumentado para o desenvolvimento da DP (Giasson & Van Deerlin, 2008). A maioria das alterações se agrupa na região do gene que codifica os domínios LRR, ROC, COR, MAPKKK e WD40, sugerindo que estas regiões da proteína exibem um papel crítico no mecanismo de neurodegeneração associado à DP (Di Fonzo *et al.*, 2006a).

Recentemente, foi criado um banco de dados nomeado PDmutDB (*Parkinson Disease Mutation Database*) que disponibiliza não só as variantes identificadas no gene *LRRK2* mas também alterações encontradas em outros genes relacionados à DP (Nuytemans *et al.*, 2010). A **tabela 2** mostra as variantes exônicas no gene *LRRK2* definitivamente patogênicas ou de natureza patogênica ainda não definida (Biskup & West, 2009; PDmutDB).

**Tabela 2** - Variantes no gene *LRRK2* encontradas em pacientes com DP.

Variante	Domínio	Evidência da patogenicidade*	Atividade quinase <i>in vitro</i>	Atividade GTPase <i>in vitro</i>	Referências
p.E10K	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nichols <i>et al.</i> , 2007.
p.S52F	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2009
p.A211V	ARM	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Xiromerisiou <i>et al.</i> , 2007.
p.E334K	ARM	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nichols <i>et al.</i> , 2007.
p.N363S	ARM	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.V366M	ARM	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009
p.R506Q	ARM	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009
p.K544V	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Xiromerisiou <i>et al.</i> , 2007.
p.K616R	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Wang <i>et al.</i> , 2010.
p.M712V	ANK	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2008.
p.R793M	ANK	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Berg <i>et al.</i> , 2005.
p.I810V	ANK	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.Q923H	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Camargos <i>et al.</i> , 2009.
p.Q930R	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Berg <i>et al.</i> , 2005.
p.S973N	N-terminal	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Haubenberger <i>et al.</i> , 2007.
p.I1006M	LRR	Não conservado	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009.
p.R1067Q	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Skipper <i>et al.</i> , 2005
p.S1096C	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Berg <i>et al.</i> , 2005
p.Q1111H	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nichols <i>et al.</i> , 2007.
p.L1114L	LRR	Segregando	Não descrita	Não descrita	Zimprich <i>et al.</i> , 2004.
p.L1122V	LRR	Não conservado	Aumentada	Não descrita	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; West <i>et al.</i> , 2007.
p.A1151T	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Schlitter <i>et al.</i> , 2006.
p.L1165P	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Chen-Plotkin <i>et al.</i> , 2008.
p.I1192V	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nichols <i>et al.</i> , 2007.
p.S1228T	LRR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Berg <i>et al.</i> , 2005; Macedo <i>et al.</i> , 2009.
p.R1325Q	ROC	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008.
p.I1371V	ROC	Média conservação	Não alterada	Não descrita	Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2005; West <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.T1410M	ROC	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.N1437H	ROC	Altamente conservado	Aumentada	Diminuída	Aasly <i>et al.</i> , 2010.
p.R1441C/G/H	ROC	Altamente conservado/ segregando	Aumentada/ não alterada	Diminuída	Paisán-ruiz <i>et al.</i> , 2004; Zimprich <i>et al.</i> , 2004; West <i>et al.</i> , 2005; Zabetian <i>et al.</i> , 2005; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Lewis <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.A1442P	ROC	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Huang <i>et al.</i> , 2007.
p.K1468E	ROC	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008.
p.R1483Q	ROC	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008.
p.P1542S	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Mata <i>et al.</i> , 2005.
p.V1613A	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Pchelina <i>et al.</i> , 2008.
p.R1628P	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Mata <i>et al.</i> , 2005.
p.Y1699C	COR	Altamente conservado/ segregando	Aumentada/ não alterada	Diminuída	Paisán-ruiz <i>et al.</i> , 2004; Zimprich <i>et al.</i> , 2004; West <i>et al.</i> , 2005; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Lewis <i>et al.</i> , 2007; Luzón-Toro <i>et al.</i> , 2007; Tan <i>et al.</i> , 2010.

Variante	Domínio	Evidência da patogenicidade*	Atividade quinase <i>in vitro</i>	Atividade GTPase <i>in vitro</i>	Referências
p.R1725Q	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Shojaiee <i>et al.</i> , 2009a.
p.R1728L/H	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
p.L1795F	COR	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Nichols <i>et al.</i> , 2007.
p.Q1823K	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Shojaiee <i>et al.</i> , 2009a.
p.M1869T/V	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2005; Farrer <i>et al.</i> , 2005; Mata <i>et al.</i> , 2005; Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
p.1874Stop	COR	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2005.
p.R1941H	MAPKKK	Média conservação	Diminuída/não alterada	Não descrita	Khan <i>et al.</i> , 2005; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Luzón-Toro <i>et al.</i> , 2007.
p.Y2006H	MAPKKK	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2007a.
p.I2012T	MAPKKK	Média conservação	Diminuída	Não descrita	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; West <i>et al.</i> , 2007; Luzón-Toro <i>et al.</i> , 2007; Jaleel <i>et al.</i> , 2007.
p.G2019S	MAPKKK	Altamente conservado/segregando	Aumentada	Não descrita	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2005; Gilks <i>et al.</i> , 2005; Nichols <i>et al.</i> , 2007; West <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009.
p.I2020T	MAPKKK	Altamente conservado/segregando	Aumentada/diminuída/não alterada	Não descrita	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; Gloeckner <i>et al.</i> , 2006; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Luzón-Toro <i>et al.</i> , 2007; West <i>et al.</i> , 2007.
p.T2031S	MAPKKK	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Lesage <i>et al.</i> , 2007b.
p.T2141M	C-terminal	Não conservado	Não descrita	Não descrita	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
p.R2143H	WD40	Não conservado	Não descrita	Não descrita	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
p.D2175H	WD40	Não conservado	Não descrita	Não descrita	Shojaiee <i>et al.</i> , 2009a.
p.Y2189C	WD40	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010.
p.T2356I	WD40	Não conservado	Não alterada	Não descrita	Khan <i>et al.</i> , 2005; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Johnson <i>et al.</i> , 2007.
p.G2385R	WD40	Média conservação	Não alterada/diminuída	Não descrita	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006b; Fung <i>et al.</i> , 2006; Farrer <i>et al.</i> , 2007; Funayama <i>et al.</i> , 2007; Jaleel <i>et al.</i> , 2007; Tan, 2007; Tan <i>et al.</i> , 2007; West <i>et al.</i> , 2007.
p.V2390M	WD40	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Clarimón <i>et al.</i> , 2008.
p.M2397T	WD40	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Mata <i>et al.</i> , 2005.
p.L2439I	WD40	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Shojaiee <i>et al.</i> , 2009b.
p.L2466H	WD40	Média conservação	Não descrita	Não descrita	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
p.Q2490Nfs	WD40	Altamente conservado	Não descrita	Não descrita	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009.

**Tabela 2 (página anterior)** - As mutações definitivamente patogênicas estão destacadas em verde e o restante das variantes são aquelas associadas com a DP, mas que não tiveram seu valor patogênico ainda confirmado. As variantes que constituem polimorfismos conhecidos não estão incluídas nesta tabela.

\*Média conservação: o aminoácido alterado é conservado somente em mamíferos ou em outros vertebrados. Altamente conservado: o aminoácido alterado é altamente conservado entre as espécies. Segregando: a alteração segrega com a DP na família (Biskup & West, 2009; PDbmutDB).

Mais recentemente, estudos envolvendo grandes amostras caso-controle foram realizados, a fim de investigar o papel de alterações genéticas comuns em modular o risco de desenvolvimento da DP. Na China, uma amostra totalizando 2.614 pacientes e controles mostrou que o indivíduo portador de ambas as variantes, p.G2385R e p.R1628P, possui um risco 1,9 vezes maior de desenvolver a DP, quando comparado a indivíduos portadores de somente uma dessas variantes. Entretanto, se o indivíduo for também portador dos polimorfismos, p.R1398H ou p.N551K, este risco é reduzido em aproximadamente 1,5 vezes (Tan *et al.*, 2010). Corroborando estes dados, a análise *in vitro* da alteração p.R1398H mostrou que ela pode ter uma função protetora, uma vez que esta alteração diminui a atividade quinase da proteína LRRK2 (Tan *et al.*, 2010). A investigação de 932 pacientes e controles da Cingapura identificou um haplótipo de risco para a DP no gene *LRRK2*, compreendendo 25 SNPs, altamente prevalente na amostra caso e que aumenta significativamente o risco para a DP, quando presente em duas cópias (Skipper *et al.*, 2005).

Análises em maior escala, conduzidas também em outros *loci*, mostraram a associação de variantes comuns com a DP. Um *locus* localizado 38,4 Kb proximal ao gene *LRRK2* envolvendo 5 SNPs, foi fortemente associado à DP, indicando a primeira evidência que variantes próximas ao gene *LRRK2* podem estar associadas à DP (Satake *et al.*, 2009). Outro estudo (Simón-Sánchez *et al.*, 2009) identificou um SNP, proximal ao gene *LRRK2*, que foi associado ao risco aumentado de desenvolver a DP. Estes dados mostram que além de mutações patogênicas serem importantes para a manifestação da DP, variantes comuns situadas não só no gene *LRRK2*, mas também em outros genes que causam DP, podem conferir um risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Satake *et al.*, 2009).



## Associação de mutações no gene *LRRK2* com outras doenças

As características pleiomórficas identificadas em cérebros de pacientes portadores de mutações no gene *LRRK2*, tais como tauopatia, paralisia supranuclear e demência com corpos de Lewy, sugerem que alterações na proteína *LRRK2* podem estar envolvidas em múltiplos processos celulares levando a outras doenças neurodegenerativas além da DP (Santos-Rebouças *et al.*, 2009; Zahao *et al.*, 2009). Além disso, o gene *LRRK2* está localizado no cromossomo 12, dentro de um *locus* relacionado à doença de Alzheimer familiar de manifestação tardia (Pericak-Vance *et al.*, 1997), o que sugere que este gene pode estar associado à manifestação de outras doenças, como a doença de Alzheimer. Tendo em vista estas evidências, alguns estudos têm sido realizados a fim de investigar uma possível relação entre mutações no gene *LRRK2* e o desenvolvimento da doença de Alzheimer, embora a maioria não tenha encontrado uma associação positiva. Um estudo realizado por nosso grupo em uma amostra de 180 pacientes brasileiros com doença de Alzheimer mostrou que a mutação p.G2019S foi identificada em baixa frequência (0,5%) (Santos-Rebouças *et al.*, 2009). Em indivíduos com doença de Alzheimer da Noruega, América do Norte, China e Itália a alteração p.G2019S não foi detectada (Hernandez *et al.*, 2005; Toft *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Zabetian *et al.*, 2006; Tedde *et al.*, 2007). Além disso, dois estudos realizados na Ásia mostraram que o polimorfismo p.G2385R foi presente em frequência similar em pacientes com doença de Alzheimer e em controles (Chang *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2009).

Contudo, a ligação de mutações no gene *LRRK2* com a doença de Alzheimer não pode ser excluída, já que esta associação ainda é controversa e pouco entendida (Santos-Rebouças *et al.*, 2009). Em 2008, nosso grupo relatou um paciente de 86 anos com DP e doença de Alzheimer, portador da mutação p.G2019S (Santos-Rebouças *et al.*, 2008). Um outro estudo em pacientes com doença de Alzheimer da Ásia mostrou que o polimorfismo p.R1628P pode estar associado ao risco duas vezes maior de desenvolver a doença, uma vez que a alteração p.R1628P foi significativamente mais frequente nestes pacientes (3,5%) do que em controles (1,6%) (Zhao *et al.*, 2009).

A associação do gene *LRRK2* com o desenvolvimento de câncer tem sido apenas sugestiva. Em 1980, pesquisadores começaram a observar que a maioria dos pacientes com DP têm incidência de câncer diminuída, com algumas exceções, principalmente, no caso de melanoma (Garber, 2010). Indivíduos com DP têm um risco duas a cinco vezes aumentado de desenvolver melanoma (Olsen *et al.*, 2005). Alguns genes de Parkinson mostram uma

possível associação entre estas duas doenças. O gene *Parkin* pode ter uma função de supressor de tumor, uma vez que ele está localizado no braço longo do cromossomo 6, um segmento alterado em vários tipos de cânceres. Uma alta expressão de *DJ-1* tem sido encontrada em muitos cânceres. Em relação ao gene *LRRK2*, a alteração mais comum em sua proteína, p.G2019S, está na mesma posição estrutural de uma mutação (p.V600E) identificada em outra proteína quinase que é responsável por metade de todos os casos de melanoma maligno (BRAF quinase), mostrando uma possível relação deste gene e o câncer (Garber, 2010). Um recente estudo em pacientes com DP judeus Ashkenasi mostrou que portadores da mutação p.G2019S possuíam um risco aumentado de desenvolver câncer em relação aos outros pacientes sem a mutação (Saunders-Pullman *et al.*, 2010). Entretanto, outro estudo mostrou que a prevalência da mutação p.G2019S em pacientes judeus Ashkenasi com melanoma maligno não foi estatisticamente diferente da prevalência desta mesma alteração em controles Ashkenasi (Hassin-Baer *et al.*, 2009).

### **O efeito de mutações na proteína LRRK2: estudos *in vitro* e modelos animais**

Diversos estudos funcionais da proteína LRRK2 mutante têm sido realizados e o mecanismo patogênico observado é o ganho de função, consistente com o padrão de herança dominante da DP (Moore, 2008). A maioria das mutações patogênicas incluindo a p.R1441C, p.R1441G, p.Y1699C, p.G2019S e p.I2020T aumentam a atividade quinase (West *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006; West *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007). Entretanto, outros estudos não mostraram diferenças significativas na atividade quinase para as alterações p.R1441C, p.R1441G e p.Y1699C (Greggio *et al.*, 2006; Jaleel *et al.*, 2007) ou houve diminuição da atividade quinase para a p.I2020T (Jaleel *et al.*, 2007). As mutações p.G2019S e p.I2020T ocorrem no domínio MAPKKK, dentro do segmento de ativação da função quinase, altamente conservado nas proteínas ortólogas à LRRK2 e em todas as quinases de eucariotos (Hernandez *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2005). Estas substituições causam a introdução de novos sítios potenciais de auto-fosforilação e o aumento da atividade quinase da proteína (Gloeckner *et al.*, 2006).

As alterações patogênicas p.R1441C e p.R1441G, localizadas no domínio ROC-GTPase, diminuem a hidrólise do GTP o que leva ao aumento da atividade quinase no domínio MAPKKK (Lewis *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008).

Evidências sugerem que o mecanismo pelo qual as alterações no domínio ROC diminuem a hidrólise do GTP é o fato delas enfraquecerem a estrutura de dímero, o que poderia prejudicar a hidrólise do GTP, com o conseqüente aumento do tempo de ligação ao GTP (Deng *et al.*, 2008). Por exemplo, os resíduos p.R1441 e p.I1371, afetados em pacientes com DP, estão situados em uma região no domínio ROC importante para estabilização do dímero (Deng *et al.*, 2008). Similar aos dados obtidos para as alterações mais comuns no gene *LRRK2*, a alteração p.N1437H no domínio ROC, recentemente identificada em uma família com DP da Noruega, foi responsável por aumentar a atividade quinase e a ligação ao GTP *in vitro* (Aasly *et al.*, 2010).

A nível celular, a expressão de proteínas *LRRK2* mutantes (p.R1441C, p.Y1699C, p.G2019S e p.I2020T) é prejudicial, causando toxicidade em cultura de células, com a formação de inclusões citoplasmáticas (Smith *et al.*, 2005; Greggio *et al.*, 2006). Um estudo realizado por MacLeod e colaboradores (2006) mostrou que a expressão em neurônios corticais de ratos da proteína mutante p.G2019S ou p.I2020T levou à progressiva redução do tamanho dos neuritos e da ramificação, em comparação com a proteína selvagem. Em células SH-SY5Y, a expressão da mutante *LRRK2*/p.G2019S resultou na diminuição do tamanho dos neuritos e no aumento de vacúolos de autofagia (Plowey *et al.*, 2008).

Apesar dos domínios de interação proteína-proteína serem investigados em menor escala, alguns estudos tem mostrado a importância destes domínios na função da proteína. Um estudo em células neuronais de camundongos mostrou que a remoção do domínio WD40 da proteína *LRRK2* mutante (p.R1441C ou p.G2019S) impediu a formação do dímero, a atividade de autofosforilação e a morte neuronal, sugerindo que a autofosforilação e a dimerização da *LRRK2* são necessárias para a neurotoxicidade (Jorgensen *et al.*, 2009).

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos nos últimos anos a fim de se entender os mecanismos pelos quais mutações na proteína *LRRK2* levam à doença de Parkinson (Sheng *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Lin e colaboradores (2009) revelou uma importante ligação entre as proteínas  $\alpha$ -sinucleína e *LRRK2*. A co-expressão da *LRRK2* selvagem ou mutante (p.G2019S) com a  $\alpha$ -sinucleína mutante (p.A53T) acelerou significativamente a neurodegeneração em camundongos transgênicos, quando comparado a modelos em que a *LRRK2* não era expressa (Lin *et al.*, 2009). Modelos de camundongos nocauteados para *LRRK2* devido à introdução da mutação p.R1441C exibiram neurodegeneração dopaminérgica depois dos dois anos de idade, devido a alterações nos níveis de dopamina estriatal e na função do receptor de dopamina D2 (Tong *et al.*, 2009). Outro experimento com camundongos nocauteados para a *LRRK2* mostrou que eles exibiram

um acúmulo e agregação de  $\alpha$ -sinucleína no cérebro. Entretanto, o órgão mais prejudicado foi o rim, onde a LRRK2 é expressa em altos níveis. Foi verificado neste órgão um aumento de proteínas ubiquitinizadas, prejuízos na via de autofagia lisossômica e aumento da morte celular por apoptose, mostrando que a LRRK2 participa de vias importantes relacionadas à degradação de proteínas durante o desenvolvimento de camundongos (Tong *et al.*, 2010).

Em moscas (*Drosophila melanogaster*) que expressaram a LRRK2 mutante p.R1441C ocorreu uma perda significativa dos neurônios dopaminérgicos acompanhada de efeitos comportamentais complexos dependentes da idade. As moscas transgênicas apresentaram déficit de locomoção e degeneração da retina em comparação às moscas controles. Estes organismos também se tornaram mais sensíveis à rotenona, um pesticida que aumenta o estresse oxidativo, sugerindo uma potencial relação entre o ambiente e a genética (Venderova *et al.*, 2009).

A expressão de fragmentos da LRRK2 contendo o domínio GTPase reduziu significativamente a viabilidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* quando comparado a fungos que expressaram outras regiões da LRRK2. A viabilidade dos fungos foi modulada por mutações que alteram a atividade GTPase. As mutações p.R1441C/G e p.Y1699C diminuíram a atividade GTPase e foram associadas com defeitos no tráfego vesicular endocítico e em vias de autofagia, corroborando outros estudos que verificaram que a redução da atividade GTPase é tóxica para a célula. Experimentos feitos em células neuronais mostraram similaridades dos efeitos tóxicos observados em fungos, sugerindo que o fungo é um modelo preditivo de células de mamíferos (Xiong *et al.*, 2010).

O primeiro estudo *in vivo* em *Zebrafish* mostrou que esta espécie possui uma proteína (XM\_68270) ortóloga da LRRK2 de humanos exibindo um alto grau de conservação. A perda total da expressão da LRRK2 ocasionou retardo no desenvolvimento, lentidão no crescimento, tamanho reduzido do cérebro, edema no coração e nível reduzido da enzima tirosina hidroxilase no cérebro. Além disso, a expressão da LRRK2 com o domínio WD40 deletado resultou em neurodegeneração com a perda dos neurônios dopaminérgicos e desorganização do trato axônico no cérebro (Sheng *et al.*, 2010).

Tendo em vista a importância do gene *LRRK2* e as evidências de que mutações neste gene estão intimamente relacionadas a anomalias do sistema nervoso e à DP, torna-se extremamente importante a investigação genética de indivíduos brasileiros com DP, objetivando um maior conhecimento das causas dessa doença e melhorando nosso entendimento acerca do papel de mutações no gene *LRRK2*, crucial para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

## 1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar se mutações no gene *LRRK2* constituem um fator genético relevante na etiologia da DP na população brasileira. Com esta finalidade, temos como objetivos específicos:

- ✓ Rastrear a presença de mutações nas regiões do gene *LRRK2* que codificam os principais domínios da proteína (domínios ROC, COR e MAPKKK) em pacientes brasileiros com DP;
- ✓ Estabelecer correlações genótipo-fenótipo entre os pacientes identificados com alterações patogênicas no gene *LRRK2*, de forma a avaliar se o quadro clínico destes indivíduos é diferente daqueles com DP idiopática, ou seja, se representam um subtipo da doença;
- ✓ Ao identificar alterações ainda não descritas no gene *LRRK2*, realizar estudo de segregação nas famílias, análise de amostra controle normal e análise *in silico* das variantes identificadas, de forma a compreender se as alterações contribuem para o desenvolvimento da doença ou se elas constituem polimorfismos;
- ✓ Gerar dados relativos à frequência destas alterações na amostra de pacientes com DP e compará-las às frequências encontradas em outras populações, de forma a contribuir para um melhor entendimento do papel deste gene na etiologia da DP.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo 204 pacientes não aparentados de ambos os sexos (72 mulheres e 132 homens), portadores da DP idiopática (faixa etária: 33 a 88 anos/ $\bar{X}$ :  $62,0 \pm 11,9$ ). A idade média de manifestação da DP entre os pacientes avaliados foi de  $53,4 \pm 12,5$  anos, variando de 14 a 83 anos. Dentre estes pacientes, 36 (17,6%) relataram história familiar da DP em parentes de 1º ou 2º grau e os outros 168 pacientes (82,4%) eram casos isolados. Setenta e seis pacientes manifestaram a DP antes dos 50 anos de idade (37%), enquanto que 128 pacientes manifestaram a doença com idade igual ou superior a 50 anos (63%).

Com exceção de 7 casos de nacionalidade portuguesa (3,4%), todos os pacientes são brasileiros, residentes do Estado do Rio de Janeiro (197 pacientes) e Goiás (7 pacientes). Eles foram avaliados por médicos neurologistas especialistas em distúrbios do movimento ligados a centros de referência: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, Instituto de Neurologia Deolindo Couto/UFRJ, Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro e Hospital Geral de Goiânia. Os médicos neurologistas procederam à análise clínica, seguindo os critérios clínicos/patológicos aceitos para a DP (Hughes *et al.*, 2001) e levantaram a história familiar dos probandos. Foram incluídos na pesquisa apenas os pacientes com DP idiopática, sendo os casos de parkinsonismo secundário excluídos.

Além dos pacientes com DP, participaram deste estudo 327 indivíduos voluntários saudáveis (201 mulheres e 126 homens; faixa etária: 50 a 81 anos/ $\bar{X}$ :  $64,3 \pm 8,9$ ), que não apresentavam sinais ou sintomas da DP ou de qualquer outra doença neurodegenerativa, para fazerem parte da amostra controle. Todos estes indivíduos são brasileiros e residentes do Estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos participantes foram esclarecidos com relação aos objetivos da pesquisa e convidados a participar do estudo. A coleta de material biológico para a análise molecular teve início somente após a autorização destes indivíduos, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido próprio para pacientes e controles (**anexos A e B**). As condutas adotadas neste projeto seguiram as normas éticas do CONEP/Ministério da

Saúde (Resolução 196/96) que regem as pesquisas envolvendo seres humanos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (REG. 0004.1.2006) (**anexo C**).

## 2.2 Extração de DNA genômico

Dois kits comerciais foram utilizados para a extração de DNA. Em todos os pacientes do Rio de Janeiro, a extração foi feita a partir da coleta de 5 mL de sangue periférico, utilizando-se tubos *vacutainer* contendo anti-coagulante EDTA. A coleta de sangue foi realizada por um técnico em análises clínicas, seguindo normas de plena assepsia. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o Kit comercial GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Nos pacientes oriundos de Goiás, a extração foi feita a partir da coleta da saliva utilizando-se o Kit ORAGENE™ DNA self-collection (DNAGENOTEK) de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. As recomendações para a coleta adequada da saliva consistiram em não beber, fumar ou mastigar 30 minutos antes da utilização do frasco coletor.

Após a extração, duas alíquotas de DNA foram feitas para cada paciente, em microtubos de 1,5 mL, sendo uma delas armazenada a 4°C e a outra a -20°C.

## 2.3 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

Para avaliar a integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (INVITROGEN) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (GE Healthcare), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE Healthcare)]. A 25 mL do gel de agarose foi adicionado 1,0 µL de brometo de etídeo a 10 µg/µL (MERCK). No preparo das amostras, 1 µL da alíquota de DNA foi acrescentado a 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (GE Healthcare), xileno cianol 0,25% (GE Healthcare), glicerol 30% (ISOFAR)] e a 8 µL de água deionizada (MilliQ). A eletroforese foi realizada a 60 V, por 1 hora em cuba horizontal [Horizon 58 (INVITROGEN)], utilizando-se como tampão de

corrida TBE 1X. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)]. A intensidade e a integridade da banda de cada amostra foram comparadas com o padrão de DNA de Bacteriófago  $\lambda$  (INVITROGEN) de 100  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ .

A concentração das amostras de DNA foi estimada através de espectrofotometria em um biofotômetro 6131 (EPPENDORF). No preparo das amostras, 5  $\mu\text{L}$  da alíquota de DNA foram diluídos em 65  $\mu\text{L}$  de água deionizada (MilliQ) e colocadas em uma cubeta própria para a leitura do biofotômetro. Uma diluição de 5  $\mu\text{L}$  de tampão TE [Tris 10 mM (GE Healthcare)-HCl (MERCK); EDTA 1 mM (GE Healthcare); pH 7,4] em água deionizada (MilliQ) para um volume final de 70  $\mu\text{L}$  foi usada como branco na calibração do equipamento. A estimativa da concentração da amostra, bem como o seu grau de pureza, foi calculada pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita.

## 2.4 Rastreamento de mutações no gene *LRRK2*

### 2.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

No presente estudo, foram analisadas as regiões do gene *LRRK2* que codificam os principais domínios da proteína, os domínios ROC, COR e MAPKKK. Os exons 31 (que codifica parte do domínio ROC) e o 41 (que codifica parte do domínio MAPKKK) já haviam sido anteriormente analisados e estes dados resultaram em dois artigos, publicados por nosso grupo (**anexos D e E**). Para a amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes aos exons 29 e 30 que codificam o domínio ROC, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38 que codificam o domínio COR e 39, 40, 42, 43 e 44 que codificam o domínio MAPKKK e a parte inicial do domínio WD40 do gene *LRRK2*, foram utilizados 13 pares de oligonucleotídeos (INVITROGEN), a maioria descrita por Di Fonzo e colaboradores (2005). Apenas o par de oligonucleotídeos utilizado para amplificar os exons 36 e 37 foi descrito por Berg e colaboradores (2005) (**tabela 3**). As regiões de limite exon/intron que incluem os sítios doadores e receptores de encadeamento correspondentes a cada exon também foram analisadas. As condições finais das reações estão especificadas na **tabela 4**. Todas as reações de amplificação foram feitas em tubos de 0,2 mL.



**Tabela 3** - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons que codificam os domínios ROC, COR e MAPKKK do gene *LRRK2* (Berg *et al.*, 2005; Di fonzo *et al.*, 2005).

Domínio	Exon	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
ROC	29	PARK8_29F 5' gTgTgACATgTAAAAGAACTC 3' PARK8_29R 5' AATTCCATACAgTCTACCagg 3'	426 pb
	30	PARK8_30F 5' CCTAgTAAAACCCAgAATAg 3' PARK8_30R 5' AgACTgAAgCAATTgTTTgCC 3'	397 pb
COR	32	PARK8_32F 5' AACTgT TAGCACTgAATTTgC 3' PARK8_32R 5' AgTggCCTATTAAAAGAACCG 3'	412 pb
	33	PARK8_33F 5' AAAATgAggAAgTTggACTAg 3' PARK8_33R 5' TgCTCTgggCgCCATCTg 3'	248 pb
	34	PARK8_34F 5' ggCCACATggTTgCTAgAgA 3' PARK8_34R 5' TCAgTAggAggTTTACACTAgAAgCAA 3'	483 pb
	35	PARK8_35F 5' ACCTTCATTgACTTTAAgCAG 3' PARK8_35R 5' gCCATCTCCCTAATTTCTCT 3'	329 pb
	36 e 37	PARK8_36-37F 5' TggATCTTAATgTgCagggg 3' PARK8_36-37R 5' CAgCAT TCAAACCCTCAAATC 3'	900 pb
	38	PARK8_38F 5' TAgAgAAATATAggATTggTTAg 3' PARK8_38R 5' ATTATAACAAATATATgAAgA CAg 3'	408 pb
MAPKKK	39	PARK8_39F 5' CAATgAAACAAGTAggTCagg 3' PARK8_39R 5' gTATgCAAAATAAgAgTTCCAg 3'	298 pb
	40	PARK8_40F 5' CCATgTTCAgCCTgTTgATgC 3' PARK8_40R 5' CACAgTgTACTgggAAgTg 3'	375 pb
	42	PARK8_42F 5' ACAgCCTggTTTAgAACATC 3' PARK8_42R 5' AAggAATTAAgCATACA ACTAC 3'	384 pb
	43	PARK8_43F 5' TTCTTTgCAATgTCTggACC 3' PARK8_43R 5' gAgCATgTgAggTTTTggC 3'	391 pb
	44	PARK8_44F 5' CAgAgCTATAACACTTCAgTC 3' PARK8_44R 5' gTTCTAACAgAAggCTAATTg 3'	409 pb

**Tabela 4** - Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43 e 44 do gene *LRRK2*.

Reagentes	Exons do gene <i>LRRK2</i>												
	Exon 29	Exon 30	Exon 32	Exon 33	Exon 34	Exon 35	Exons 36-37	Exon 38	Exon 39	Exon 40	Exon 42	Exon 43	Exon 44
Tampão de reação 10X (BIOTOOLS)*	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dNTPs 5 mM (GE HEALTHCARE)	100 µM	100 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	300 µM	200 µM	100 µM	100 µM	200 µM	200 µM	200 µM
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS)	2,0 mM	1,8 mM	4,0 mM	4,0 mM	2,0 mM	4,0 mM	4,0 mM	4,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	4,0 mM	4,0 mM	4,0 mM
Oligonucleotídeo F 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM	0,36 µM	0,6 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
Oligonucleotídeo R 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM	0,36 µM	0,6 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polimerase 1U/µL (BIOTOOLS)	1,0 U	0,9 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U
DNA ~50 ng	1,0 µL	1,0 µL	1,5 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Volume final	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

\*Tampão de reação 10X [KCl 5 mM, Tris HCl 7,5 mM - pH 9,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM].

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) sob as condições de ciclagem (desnaturação inicial, ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, e extensão final) descritas abaixo. Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Condições de ciclagem:

Análise dos exons 29, 30, 32, 33, 35, 36-37, 39 e 40

95°C – 6 minutos  
 95°C – 1 minuto  
 60°C – 1 minuto  
 72°C – 1,5 minutos  
 72°C – 7 minutos

} 30 ciclos

Análise dos exons 42, 43 e 44

95°C – 6 minutos  
 95°C – 1 minuto  
 61°C – 1 minuto  
 72°C – 1,5 minutos  
 72°C – 7 minutos

} 30 ciclos

Análise do exon 34

95°C – 6 minutos  
 95°C – 1 minuto  
 60°C – 1 minuto  
 72°C – 2 minutos  
 72°C – 7 minutos

} 30 ciclos

Análise do exon 38

95°C – 6 minutos  
 95°C – 1 minuto  
 58°C – 1 minuto  
 72°C – 2 minutos  
 72°C – 7 minutos

} 30 ciclos

#### 2.4.2 Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação

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

A eletroforese foi realizada a 80 V, por 30 minutos em cuba horizontal [Horizon 58 (INVITROGEN)], utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)]. Para confirmação do tamanho do amplicon foi utilizado o padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder (INVITROGEN).

#### 2.4.3 Purificação dos produtos da PCR

Após a amplificação, 20 µL do produto da PCR foram purificados utilizando-se o Kit de purificação [AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER)], seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 2.4.4 Sequenciamento automático

As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 20 µL, utilizando-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS), contendo: 1,0 µL de oligonucleotídeo a 3,2 µmol (senso ou anti-senso), 1,0 µL do tampão (APPLIED BIOSYSTEMS), 1,0 µL (cerca de 60 ng) do DNA purificado e 0,5 µL do Kit Big Dye

Terminator (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL ou em uma placa contendo 96 poços [MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (APPLIED BIOSYSTEMS)] e conduzidas no termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS). A ciclagem compreendeu 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação das reações de seqüenciamento em tubos de 0,2mL, foram adicionados ao produto da reação 64 µL de etanol absoluto gelado (ISOFAR) e 16 µL de água deionizada (MilliQ). O material foi homogeneizado em um agitador para tubos (PHOENIX) e deixado à temperatura ambiente por 15 minutos para a precipitação. Após este tempo, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos (microcentrífuga EPPENDORF). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250 µL de etanol 70% (ISOFAR). O material foi novamente homogeneizado e levado à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado utilizando-se uma micropipeta e as amostras precipitadas foram protegidas da luz e deixadas à temperatura ambiente por pelo menos 12 horas para a secagem. As amostras secas foram conservadas à -20°C. Para a aplicação no sistema de sequenciamento, o material precipitado foi ressuspense em 10 µL de solução de formamida [Hi Di Formamida (APPLIED BIOSYSTEMS)], submetido ao agitador de tubos por 5 segundos e transferido para a placa de sequenciamento contendo 96 poços (APPLIED BIOSYSTEMS).

Para a precipitação das reações de sequenciamento feitas diretamente na placa, foi adicionado a cada reação 80 µL de isopropanol a 75% (MERCK). A placa foi deixada à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 3.000 rpm por 50 minutos (centrífuga de placas SIGMA 2-16P). Depois da centrifugação, a placa foi invertida em um papel toalha, que logo após foi retirado, sendo outro papel colocado abaixo da mesma. A placa invertida foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto. Para a secagem, a placa foi colocada em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) por 5 minutos a 75° C e posteriormente mantida à -20°C. Para a aplicação no sequenciador, foi adicionado a cada reação 10 µL de solução de formamida [Hi Di Formamida (APPLIED BIOSYSTEMS)] e a placa foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto.

As placas contendo as reações de sequenciamento juntamente com a formamida foram levadas ao termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH) ou a um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) por 5 minutos a 95°C para a desnaturação e, imediatamente, incubadas em gelo para permitir a manutenção da desnaturação das amostras.

Parte das reações feitas foi conduzida em um sequenciador automático ABI Prism 3730 (APPLIED BIOSYSTEMS) da Plataforma Genômica (PDTIS - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz). Outra parte das reações foi processada em um sequenciador automático ABI Prism 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS) na Plataforma Genômica do IBRAG/UERJ.

A análise das sequências foi realizada através dos programas Chromas Lite versão 2.0 (TECHNELYSIUM) e BioEdit Sequence Alignment Editor versão 6.0.6 (Isis Pharmaceuticals, Inc). As seqüências obtidas foram alinhadas com o fragmento correspondente à sequência selvagem do gene *LRRK2* (número de acesso AY792511), acessada no banco de dados Ensembl (endereço eletrônico: “<http://www.ensembl.org/index.html>”). Os indivíduos que apresentaram variação nas sequências tiveram uma nova alíquota do DNA analisada para a confirmação da variante encontrada.

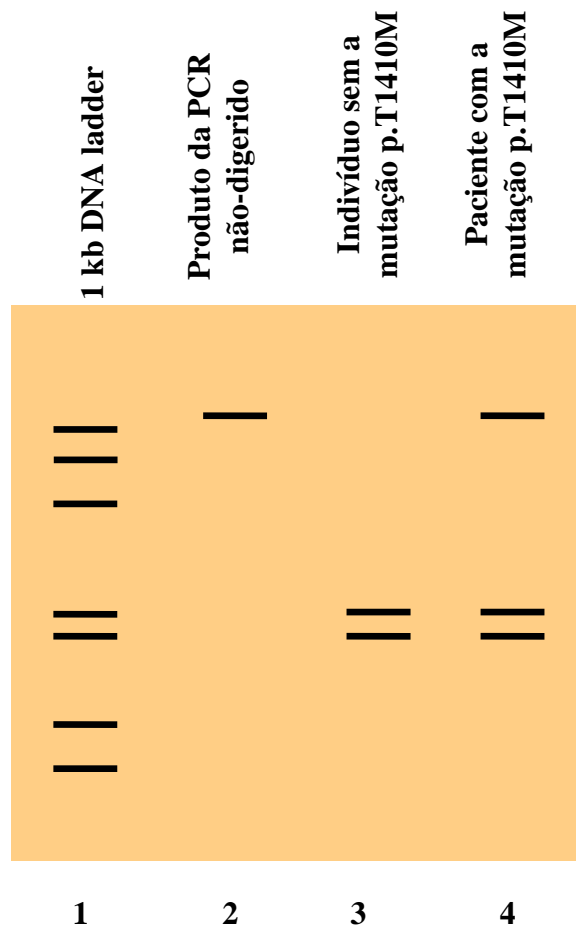
#### **2.5 Análise das alterações c.4229C>T (p.T1410M), c.5308T>C (p.C1770R), c.6415T>A (p.C2139S) e c.6566A>G (p.Y2189C) em indivíduos controles.**

Cada uma das alterações que apresentaram dúvidas em relação à sua patogenicidade foi analisada em 210, dos 327 indivíduos controles selecionados. A análise da alteração c.4229C>T foi realizada através da técnica de PCR-RFLP. A amplificação do fragmento referente ao exon 30 foi realizada de acordo com a reação de PCR descrita no item 3.4.1 e os fragmentos resultantes foram verificados em gel de agarose, conforme descrito no item 3.4.2. A digestão dos produtos de PCR foi realizada com a enzima de restrição *HgaI* (NEW ENGLAND). As amostras da digestão foram preparadas com 15,5 µL de água deionizada (MilliQ), 9 µL do produto da PCR, 3 µL de tampão da enzima (1X NEBuffer 4) (NEW ENGLAND) e 5U da enzima *HgaI* e foram mantidas por 16 horas em banho de aquecimento (Modelo 100 – FANEM) a 37 °C.

O produto digerido da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante. A composição do gel consistia em 1,25 mL de solução de acrilamida (PHARMACIA BIOTECH): bis acrilamida 20% (19:1) (PHARMACIA BIOTECH), 0,25 mL de tampão TBE 10X, 35 µL de persulfato de amônio 10% (USB), 5 µL de TEMED (INVITROGEN) e 3,46 mL de água deionizada (MilliQ). Oito microlitros do produto da digestão foram adicionados a 2,0 µL de corante de corrida e a preparação foi aplicada no gel.

A eletroforese foi realizada em uma cuba vertical Mini-Protean (BIO RAD) a uma voltagem de 110V por aproximadamente 1 hora.

Ao término da eletroforese, o gel foi imerso sob agitação moderada em uma solução fixadora [ácido acético 0,5% (ISO FAR), etanol 10% (ISO FAR)] por 2 minutos, corado em uma solução de nitrato de prata [ácido acético 0,5% (ISO FAR), etanol 10% (ISO FAR) e  $\text{AgNO}_3$  0,2% (MERCK)] por 10 minutos e lavado em água destilada por 20 segundos. Após a lavagem, o gel foi revelado em uma solução contendo 3% de hidróxido de sódio (ISO FAR) e 0,1% de formaldeído (MERCK) por 10 minutos e fixado em uma solução fixadora [ácido acético 0,5% (ISO FAR), etanol 10% (ISO FAR)] por 2 minutos. Para análise do exon 30 foi utilizado o padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder (INVITROGEN), uma amostra de DNA não-digerida e uma amostra de uma paciente, sabidamente positivo para a mutação c.4229C>T (p.T1410M), para fins comparativos (**figura 7**). O fragmento da PCR de 397 pb é clivado na presença do alelo C (selvagem) em dois fragmentos de 209 pb e 188 pb. Na presença do alelo T (mutado) o amplicon não é clivado (**figura 7**).



**Figura 7** - Esquema da digestão dos produtos da PCR com a enzima *HgaI*. Linha 1: Padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder; linha 2: Fragmento referente ao produto de PCR não digerido; linha 3: Fragmentos referentes à digestão de uma amostra de uma paciente sem a mutação c.4229C>T (p.T1410M); linha 4: Fragmentos da digestão de uma amostra de uma paciente heterozigoto para a mutação c.4229C>T (p.T1410M) no gene *LRRK2*.

O estudo das alterações c.5308T>C (p.C1770R), c.6415T>A (p.C2139S) e c.6566A>G (p.Y2189C) em indivíduos controles foi feito através da amplificação dos fragmentos gênicos referentes aos exons 36 e 44, descrita nos itens 3.4.1 e 3.4.2. A reação de PCR foi purificada e sequenciada, conforme já descrito nos itens 3.4.3 e 3.4.4.

A análise estatística usada para comparar a frequência de alterações nos pacientes e nos controles, em particular, a alteração p.T1410M, foi feita através do teste exato de Fisher, com  $P < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Este cálculo, bem como o cálculo de *odds ratio* (OR) e do intervalo de confiança de 95%, foi realizado utilizando-se o programa GraphPad InStat versão 3.01.



## 2.6 Ferramentas eletrônicas

A análise de predições dos efeitos das alterações que causam substituições de aminoácidos na proteína foi realizada utilizando-se as ferramentas eletrônicas PolyPhen-2 (Adzhubei *et al.*, 2010), PMut (Ferrer-Costa *et al.*, 2005) e SIFT (Ng & Henicoff, 2003). Esses programas consideram determinados parâmetros (como a conservação do aminoácido em proteínas homólogas e as propriedades físicas dos aminoácidos) para classificarem uma substituição como patogênica ou neutra.

O programa PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) classifica a alteração como provavelmente prejudicial (quando se supõe com alta probabilidade que a alteração afete a estrutura ou a função da proteína), possivelmente prejudicial (quando se supõe que a alteração afete a função ou a estrutura da proteína), benigna (quando a alteração provavelmente não causa nenhum efeito) e não conhecida (quando a falta de dados não permite ao programa fazer a predição).

A ferramenta PMut (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>) possui uma taxa de sucesso maior que 80% (Ferrer-Costa *et al.*, 2005) e classifica uma alteração como patogênica ou neutra. Para tal classificação, o programa fornece valores de *NN output* e de confiança. Se o valor de *NN output* é maior que 0,5, a mutação é predita como patogênica. O valor de confiança é um valor que permite verificar se a predição é muito ou pouco confiável, variando de 0 (pouco confiável) a 9 (muito confiável).

O programa SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) fornece um *score* que prediz se a mutação é deletéria ou tolerável. Substituições de aminoácidos com valores menores que 0,05 são preditos serem deletérios.

As ferramentas eletrônicas SpliceView e NNSPLICE versão 0.9 foram utilizadas para a avaliação do impacto de variantes intrônicas em sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA. Estes programas são baseados na predição de sequências de encadeamento, tendo em vista a alta frequência de certos nucleotídeos em determinadas posições, formando sequências que podem ser reconhecidas por proteínas envolvidas no encadeamento. O programa SpliceView pode ser acessado no endereço eletrônico: “<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>” e o programa NNSPLICE, no endereço eletrônico: “[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)”.

Através do endereço eletrônico “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>” o programa BLASTP foi acessado com o objetivo de identificar sequências de proteínas

homólogas à LRRK2 entre diferentes espécies de organismos. Para alinhar e comparar estas seqüências com a seqüência da proteína LRRK2 humana, o programa ClustalW foi utilizado (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>).

## **2.7 Estudo de modelagem molecular e dinâmica molecular**

Esta parte do estudo foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da FIOCRUZ, com a orientação do Dr. Floriano P. Silva-Jr.

### **2.7.1 Busca de estruturas cristalográficas homólogas aos domínios de interesse**

Inicialmente, foi feita uma busca das estruturas cristalográficas homólogas aos domínios ROC e WD40, onde as alterações identificadas neste estudo que apresentaram dúvidas em relação à sua patogenicidade estão localizadas. Esta busca foi feita através do servidor ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>). Nesta página, o banco de dados UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) foi acessado, o qual possui a opção de pesquisa: *Sequence similarity searches* (BLAST) (<http://www.expasy.org/tools/blast/>), na qual foi submetida a seqüência de aminoácidos desejada, relativas aos domínios ROC ou WD40. Não foi possível identificar estruturas cristalográficas de proteínas homólogas ao domínio WD40 no local onde estão situadas as mutações identificadas neste estudo. Somente a estrutura cristalográfica do domínio ROC foi identificada. Esta estrutura foi relatada por Deng e colaboradores (2008) e possui o número de acesso “2ZEJ”. Para obter o arquivo referente à estrutura cristalográfica do domínio ROC, o número de acesso “2ZEJ” foi submetido no banco de dados RSCB Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)).

## 2.7.2 Visualização da estrutura cristalográfica do domínio ROC

Para a visualização da estrutura cristalográfica do domínio ROC foi utilizada a ferramenta Swiss-Pdb Viewer 4.0.1, acessada no endereço eletrônico “<http://spdbv.vital-it.ch/>” e instalada em Windows Vista. Esta estrutura cristalográfica está em forma de dímero, com as cadeias A e B representado cada um dos monômeros. Observou-se que determinadas regiões na cadeia A (aminoácidos 1357-1367 e 1379-1387) e na cadeia B (aminoácidos 1358-1364 e 1379-1387) estavam ausentes. Para a modelagem dessas regiões foram utilizados dois programas diferentes: SWISS-MODEL e Modeller 9v7.

## 2.7.3 Modelagem das regiões ausentes na estrutura cristalográfica do dímero ROC

### 2.7.3.1 Ferramenta SWISS-MODEL

O programa SWISS-MODEL pode ser utilizado no endereço “<http://swissmodel.expasy.org/>”. Este programa gerou um modelo em forma de monômero tendo como referência a cadeia B da estrutura cristalográfica original (2ZEJ). O monômero gerado no programa SWISS-MODEL foi nomeado como “cadeia B modelada swiss-model”. Para a construção do dímero, foi utilizado o programa Swiss-Pdb Viewer 4.0.1. Neste, a “cadeia B” da estrutura original “2ZEJ” foi deletada, restando apenas a “cadeia A”. O modelo “cadeia B modelada swiss-model” foi então sobreposto à cadeia A de “2ZEJ” através da opção “*Fit → magic fit*”, sendo depois utilizada a opção “*Fit → improve fit*”. A formação do dímero foi feita com a união dos dois monômeros, selecionando as duas cadeias e utilizando a opção “*edit → create merged layer from selection*”. A proteína dimérica foi nomeada “dímero cadeia B swiss-model”. Posteriormente, foi feita uma minimização de energia no programa Swiss-Pdb Viewer, através da opção “*energy minimization*” e o modelo final foi nomeado “dímeroROC-swiss-model”.

### 2.7.3.2 Ferramenta Modeller 9v7

Este programa foi obtido no endereço eletrônico “<http://salilab.org/modeller/>” e instalado no sistema operacional Windows Vista. Esta ferramenta possibilitou a modelagem do dímero, tendo como referência a estrutura cristalográfica “2ZEJ”. Foram gerados 50 modelos diferentes, dos quais os 5 modelos com menor energia foram selecionados. Estes modelos foram posteriormente avaliados no programa “Structural Analysis and Verification Server”.

### 2.7.3.3 Avaliação dos modelos obtidos, através da ferramenta “Structural Analysis and Verification Server”

A ferramenta “Structural Analysis and Verification Server” pode ser acessada na página “<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>”. Este programa foi utilizado para checar a qualidade da estrutura proteica dos 5 modelos com menor energia, obtidos no programa Modeller, tendo sido escolhido apenas um modelo para o estudo de dinâmica molecular, nomeado “dímeroROC-modeller”.

### 2.7.4 Estudo de dinâmica molecular

O estudo de dinâmica molecular pôde ser iniciado após a obtenção e o refinamento dos dois modelos gerados pelos programas SWISS-MODEL e Modeller, nos quais a estrutura do dímero ROC estava completa, sem nenhum aminoácido faltando.

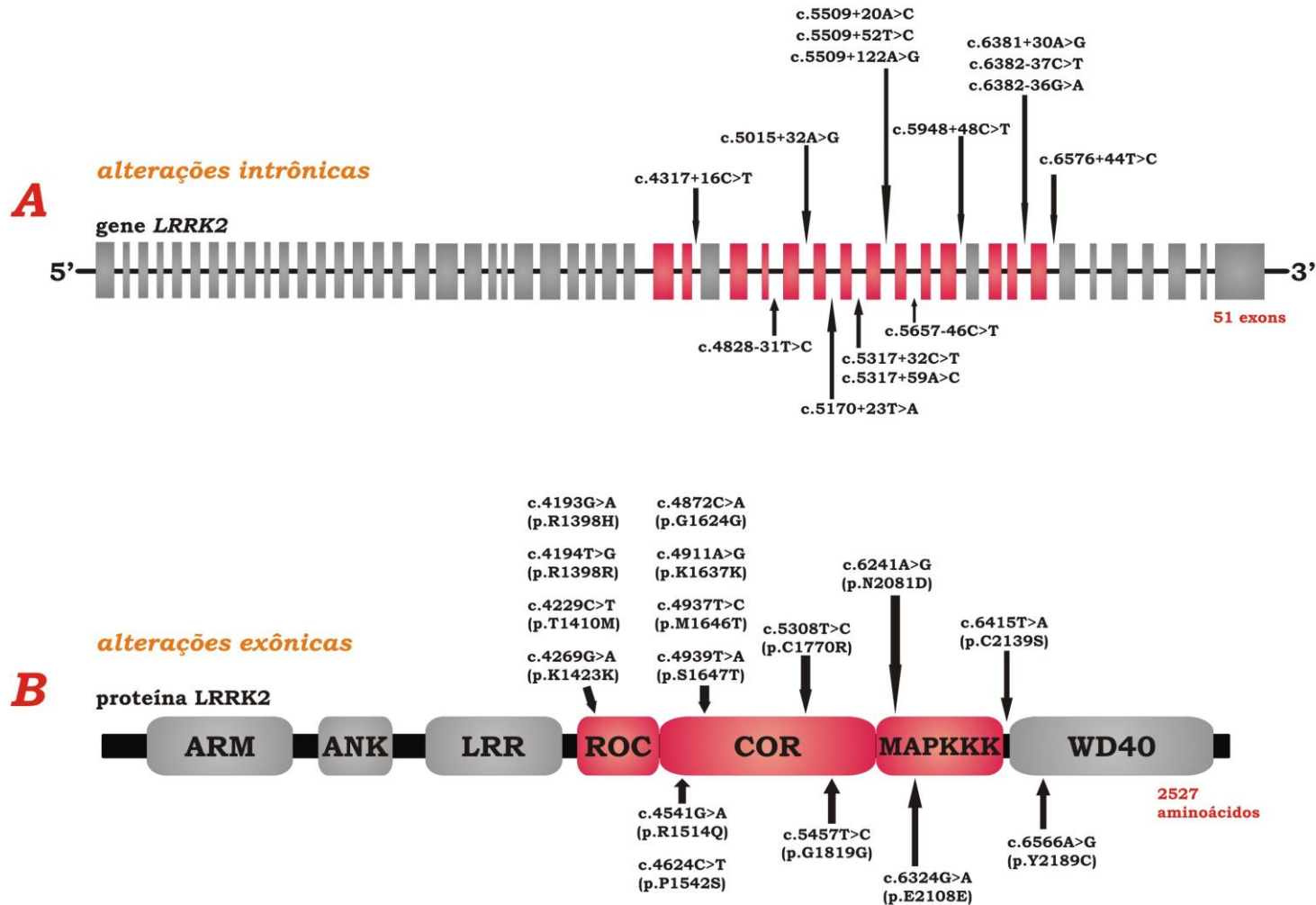
Esta parte do estudo foi realizada utilizando o programa GROMACS, acessado no endereço “<http://www.gromacs.org/>” e instalado em sistema operacional Ubuntu 9.04. Para a utilização e aprendizagem do programa foram feitos diversos tutoriais disponíveis no próprio site do GROMACS (*GROMACS Introductory Tutorial*, John E. Kerrigan; *Introduction to molecular dynamics simulations and analysis*, Tsjerk A. Wassenaar e *Tutorial for Drug-Enzyme Complex*, John E. Kerrigan).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Alterações identificadas

A triagem de mutações no gene *LRRK2* foi conduzida em 204 pacientes com DP idiopática. Foram analisadas as sequências dos exons 29 e 30, responsáveis por codificarem o domínio ROC, dos exons 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38, responsáveis por codificarem o domínio COR e dos exons 39, 40, 42, 43 e 44, responsáveis por codificarem o domínio MAPKKK e a parte inicial do domínio WD40. Os exons 31 e 41 já haviam sido anteriormente analisados por nosso grupo (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010) (**anexos D e E**). Nestes pacientes, foram identificadas 31 variantes de sequência: 15 variantes intrônicas, 6 variantes silenciosas e 10 variantes de sentido trocado (**figura 8 e tabela 5**). Todas as alterações nunca descritas na literatura foram submetidas ao banco de polimorfismo único de nucleotídeo (dbSNP) e depositadas neste banco, permitindo a geração de um número de identificação para cada uma delas. O banco de SNPs pode ser acessado no endereço “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>”.

O **anexo F** mostra a listagem de todos os pacientes com suas características principais (idade, idade de manifestação, sexo, caso familiar ou esporádico). Os resultados de todos os exons analisados, referentes a cada paciente, estão disponíveis no **anexo G**. As análises moleculares dos exons 30, 36 e 44 realizadas em indivíduos controles e suas características principais encontram-se no **anexo H**. Abaixo, veremos as características das alterações identificadas.



**Figura 8:** Esquema do gene e da proteína LRRK2 com a localização das variantes identificadas, mostrando em (A) as variantes intrônicas no gene e em (B) as alterações exônicas na proteína. Os exons e os domínios analisados neste estudo estão destacados em vermelho. ARM, domínio armadillo; ANK, domínio ankirina; LRR, domínio rico em repetições leucina; ROC, domínio ROC; COR, domínio COR; MAPKKK, domínio MAPKKK; WD40, domínio WD40.

**Tabela 5** - Variantes de sequências encontradas no gene *LRRK2* e suas características principais.

<i>Variação no cDNA<sup>a</sup></i>	<i>Variação na proteína</i>	<i>Exon/ intron do gene</i>	<i>Domínio proteico</i>	<i>Pacientes N (%)</i>	<i>Número de acesso do SNP<sup>c</sup></i>
c.4193G>A	p.R1398H	Exon 30	ROC	36 (17,6)	rs7133914
c.4194T>G	p.R1398R	Exon 30	ROC	2 (1,0)	rs112676052*
c.4229C>T	p.T1410M	Exon 30	ROC	4 (1,9)/ 1 (0,5) <sup>b</sup>	rs72546327
c.4269G>A	p.K1423K	Exon 30	ROC	27 (13,2)	rs11175964
c.4317+16C>T	–	Intron 30	–	1 (0,5)	rs111393147*
c.4541G>A	p.R1514Q	Exon 32	COR	3 (1,5)	rs35507033
c.4624C>T	p.P1542S	Exon 32	COR	6 (3,0)	rs33958906
c.4828-31T>C	–	Intron 33	–	162 (79,4)	rs1896252
c.4872C>A	p.G1624G	Exon 34	COR	186 (91,2)	rs1427263
c.4911A>G	p.K1637K	Exon 34	COR	165 (80,8)	rs11176013
c.4937T>C	p.M1646T	Exon 34	COR	2 (1,0)	rs35303786
c.4939T>A	p.S1647T	Exon 34	COR	67 (32,8)	rs11564148
c.5015+32A>G	–	Intron 34	–	31 (15,2)	rs11564205
c.5170+23T>A	–	Intron 35	–	141 (69,1)	rs7307276
c.5308T>C	p.C1770R	Exon 36	COR	1 (0,5)/ 0 (0) <sup>b</sup>	ss263194183*
c.5317+32C>T	–	Intron 36	–	182 (89,2)	rs7137665
c.5317+59A>C	–	Intron 36	–	7 (3,4)	rs73097447
c.5457T>C	p.G1819G	Exon 37	COR	163 (79,9)	rs10878371
c.5509+20A>C	–	Intron 37	–	8 (3,9)	rs11564134
c.5509+52T>C	–	Intron 37	–	1 (0,5)	ss263194184*
c.5509+122A>G	–	Intron 37	–	1 (0,5)	rs17444054
c.5657-46C>T	–	Intron 38	–	1 (0,5)	rs17491368
c.5948+48C>T	–	Intron 40	–	49 (24,0)	rs2404834
c.6241A>G	p.N2081D	Exon 42	MAPKKK	3 (1,5)	rs33995883
c.6324G>A	p.E2108E	Exon 43	MAPKKK	71 (34,8)	rs10878405
c.6381+30A>G	–	Intron 43	–	1 (0,5)	rs72546332
c.6382-36G>A	–	Intron 43	–	1 (0,5)	rs113647572*
c.6382-37C>T	–	Intron 43	–	4 (1,9)	rs79805220
c.6415T>A	p.C2139S	Exon 44	–	1 (0,5)/ 0 (0) <sup>b</sup>	rs112048985*
c.6566A>G	p.Y2189C	Exon 44	WD40	2 (1,0)/ 2 (1,0) <sup>b</sup>	rs35658131
c.6576+44T>C	–	Intron 44	–	1 (0,5)	rs75415619

<sup>a</sup>A posição no cDNA está de acordo com a sequência depositada no Genbank (número de acesso AY792511); <sup>b</sup> Frequência em 210 controles; <sup>c</sup> Número de acesso para cada variante depositada no dbSNP (banco de SNPs); \*, Variantes novas depositadas por nosso grupo no dbSNP.

### 3.2 Resultados das análises *in silico*

As análises *in silico* feitas através dos programas PolyPhen, Pmut e SIFT e do alinhamento da sequência da proteína LRRK2 humana com a de outras espécies estão resumidas na **tabela 6**. Para estas análises foram utilizadas as alterações *missense* identificadas neste estudo que apresentaram dúvidas quanto à sua patogenicidade. O alinhamento da sequência da proteína LRRK2 humana nos locais das alterações analisadas com as proteínas ortólogas de outros organismos está representado na **figura 9**.

Para fins de comparação, o polimorfismo p.S1647T já descrito na literatura como não patogênico e a mutação comprovadamente patogênica p.G2019S também foram avaliados, mostrando que a utilização destas análises *in silico* pode ser útil para ajudar a prever o valor patogênico das alterações. As três ferramentas utilizadas mostraram que a mutação patogênica p.G2019S pode alterar a estrutura ou a função da proteína e a comparação das sequências homólogas mostraram que este resíduo é muito conservado. O polimorfismo não patogênico p.S1647T é neutro, de acordo com os três programas utilizados, e também mostra não ser conservado entre proteínas de espécies homólogas.

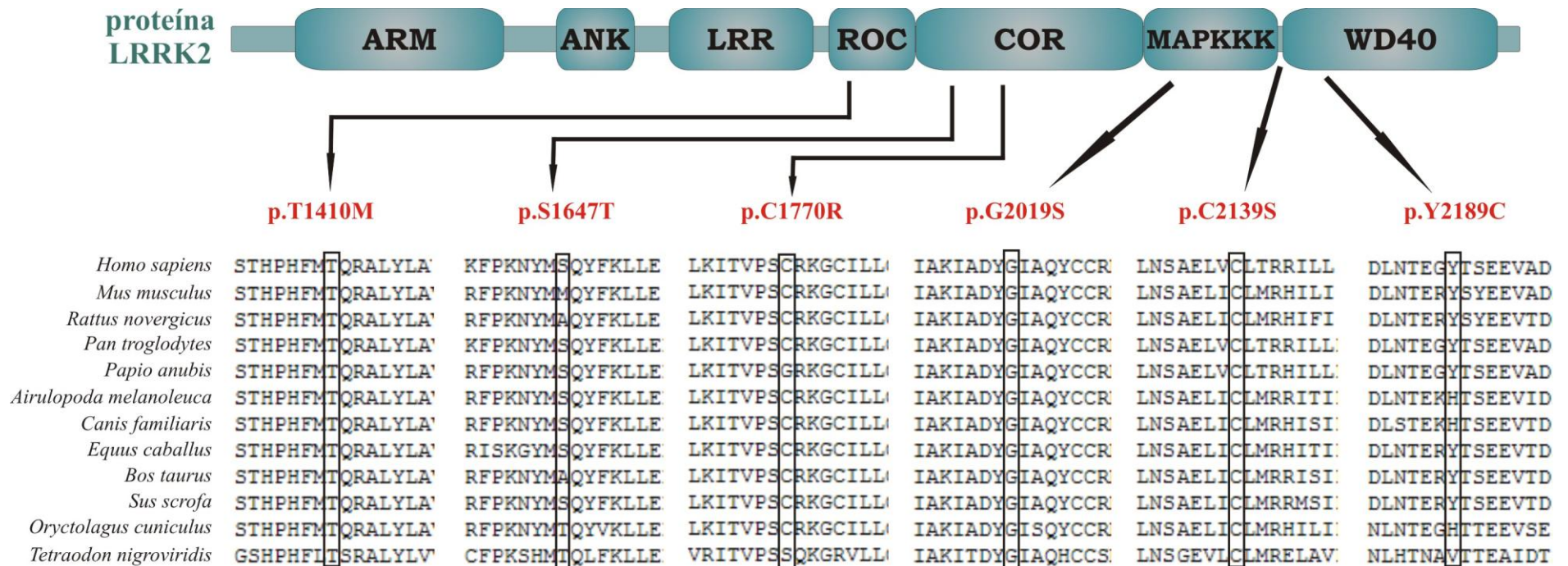


Tabela 6 - Resultados das análises *in silico*.

<b>Alteração</b>	<b>Programa PolyPhen</b>	<b>Programa Pmut<sup>a</sup></b>	<b>Programa SIFT<sup>b</sup></b>	<b>Alinhamento das sequências</b>
<b>c.4229C&gt;T (p.T1410M)</b>	Predição: Provavelmente prejudicial	Predição: Patogênica <i>NN output</i> : 0.8104 Confiança: 6	Predição: Deletéria <i>Score</i> : 0.01	Conservada
<b>c.4939T&gt;A (p.S1647T)</b>	Predição: Benigna	Predição: Neutra <i>NN Output</i> : 0.2640 Confiança: 4	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0.77	Não conservada
<b>c.5308T&gt;C (p.C1770R)</b>	Predição: Provavelmente prejudicial	Predição: Patogênica <i>NN Output</i> : 0.8947 Confiança: 7	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0.18	Não conservada
<b>c.6055G&gt;A (p.G2019S)</b>	Predição: Provavelmente prejudicial	Predição: Patogênica <i>NN Output</i> : 0.5489 Confiança: 0	Predição: Deletéria <i>Score</i> : 0.00	Conservada
<b>c.6415T&gt;A (p.C2139S)</b>	Predição: Provavelmente prejudicial	Predição: Patogênica <i>NN Output</i> : 0.7446 Confiança: 4	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0.88	Conservada
<b>c.6566A&gt;G (p.Y2189C)</b>	Predição: Benigna	Predição: Patogênica <i>NN Output</i> : 0.9497 Confiança: 8	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0.18	Não conservada

<sup>a</sup>A alteração é classificada como patogênica (quando o valor de *NN Output* é maior que 0,5) ou neutra, com um intervalo de confiança variando de 0 (pouco confiável) a 9 (muito confiável).

<sup>b</sup>A alteração é classificada como deletéria (quando o *score* é menor que 0,05) ou como tolerável.



**Figura 9** - Sequência da proteína LRRK2 na região das alterações *missense*, alinhada com ortólogos de *Mus musculus* (GenBank número de acesso AAV63976), *Rattus novergicus* (XP\_235581.4), *Pan troglodytes* (XP\_001168494.1), *Papio anubis* (ABX89281), *Airulopoda melanoleuca* (EFB28823.1), *Canis familiaris* (XP\_543734.2), *Equus caballus* (XP\_001914702.1), *Bos Taurus* (XP\_615760.3), *Sus scrofa* (XP\_01106908), *Oryctolagus cuniculus* (002712738) e *Tetraodon nigroviridis* (CAG05593.1).

Além das análises *in silico* feitas para alterações *missense*, os programas SpliceView e NNSPLICE foram utilizados para avaliar se as alterações intrônicas e silenciosas, nunca descritas na literatura ou com papel patogênico ainda não definido, podem alterar os sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA. Segundo as ferramentas utilizadas, as alterações intrônicas c.4317+16C>T, c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+52T>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T, c.6382-36G>A, c.6382-37C>T e c.6576+44T>C e a alteração silenciosa c.4194T>G (p.R1398R) não afetam o reconhecimento dos sítios doadores e dos sítios receptores de encadeamento selvagens.

### 3.3 Características fenotípicas dos pacientes portadores de alterações no gene *LRRK2*

Na **tabela 7** estão resumidas as características clínicas dos pacientes portadores de alterações com valor patogênico ainda não definido. Foi observado que todos os probandos apresentaram sintomas típicos da DP.

**Tabela 7** - Características clínicas dos pacientes com alterações no gene *LRRK2*.

Características	Pacientes							
	PAR1455	PAR1728	PAR1732	PAR2038	PAR1209	PAR2043	PAR1319	PAR1493
Alteração	c.4229C>T (p.T1410M)/ c.6055G>A (p.G2019S) <sup>a</sup>	c.4229C>T (p.T1410M)	c.4229C>T (p.T1410M)	c.4229C>T (p.T1410M)	c.5308T>C (p.C1770R)	c.6415T>A (p.C2139S)	c.6566A>G (p.Y2189C)	c.6566A>G (p.Y2189C)
História familiar para a DP	+	+	-	-	+	+	+	-
Sexo	M	F	M	F	F	M	M	M
Origem	brasileira	brasileira	brasileira	brasileira	brasileira	brasileira	portuguesa	brasileira
Idade de manifestação (anos)	47	55	83	47	51	68	50	62
Idade no exame (anos)	57	70	87	55	55	71	64	74
Primeiro sintoma	Bradicinesia	ND	ND	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor
Bradicinesia	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Tremor de repouso	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Rigidez	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Instabilidade postural	+	ND	ND	-	-	-	-	+
Manifestação assimétrica	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Distonia	-	ND	ND	-	-	-	-	-
Resposta ao levodopa	+	ND	ND	+	+	+	+	+
Declínio cognitivo	-	ND	ND	-	-	-	-	-

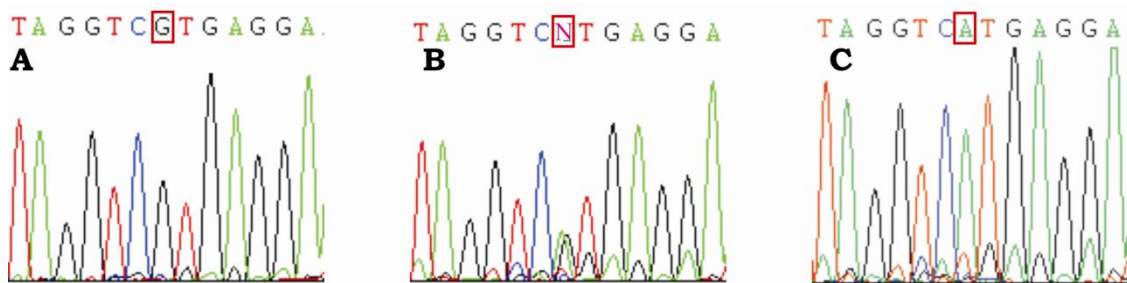
M, sexo masculino; F, sexo feminino; +, presente; - ausente; ND, informação não disponível.

<sup>a</sup>A alteração c.6055G>A (p.G2019S) foi descrita anteriormente em nosso artigo (Pimentel *et al.*, 2008) (**anexo D**).

### 3.4 Características das variantes encontradas

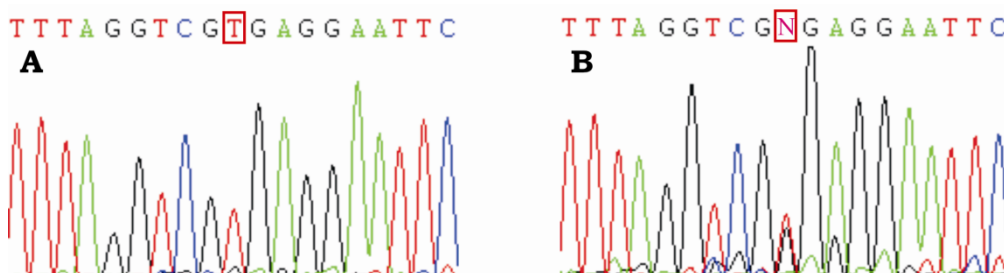
#### Variantes identificadas no exon 30 e no intron 30

Quatro alterações foram identificadas no exon 30. A alteração c.4193G>A (**figura 10**), resulta na troca de uma arginina por uma histidina no aminoácido 1398 da proteína LRRK2, tendo sido identificada em 36 pacientes (8 casos familiares e 28 casos esporádicos), dos quais dois pacientes (PAR1144 e PAR2066) são homozigotos (**anexo G**).



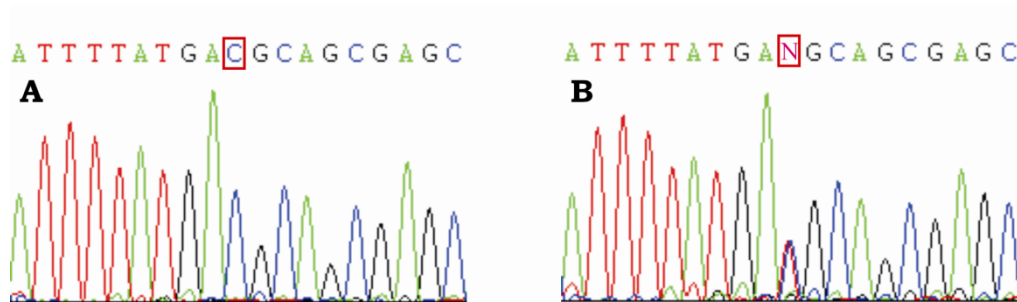
**Figura 10** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A**) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B**) Alteração c.4193G>A (p.R1398H). **C**) Alteração c.4193G>A (p.R1398H) em homozigose.

A variante c.4194T>G resulta na mutação silenciosa p.R1398R (**figura 11**). Esta alteração foi identificada em dois pacientes heterozigotos, PAR1297 e PAR1494, ambos casos esporádicos de DP (**anexo G**).

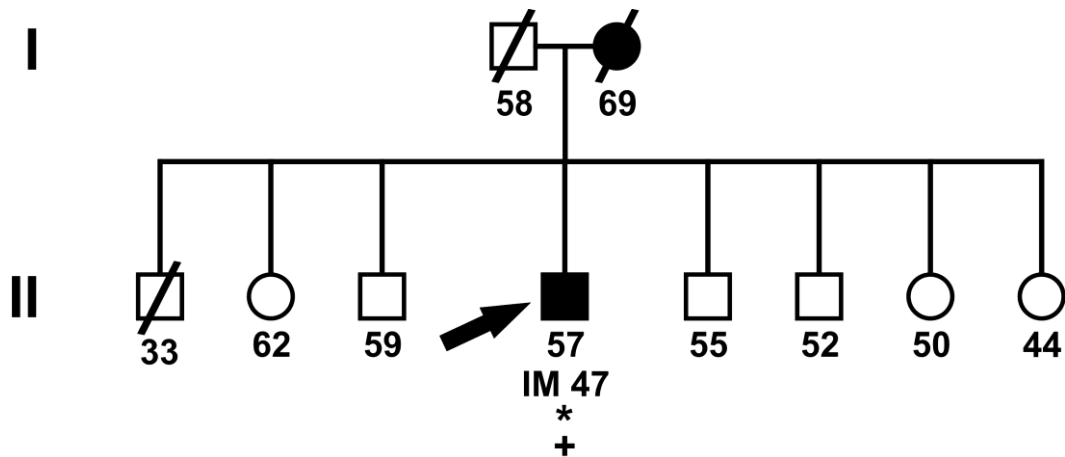


**Figura 11** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A**) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B**) Alteração c.4194T>G (p.R1398R).

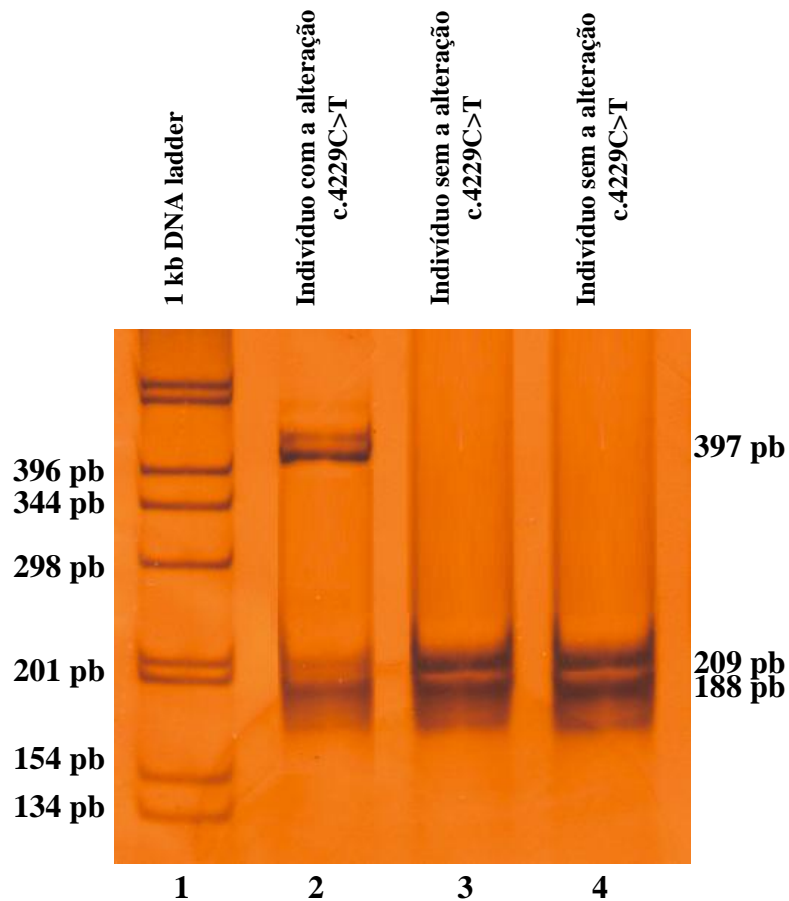
A variante c.4229C>T (**figura 12**), resulta na troca de uma treonina por uma metionina no aminoácido 1410, em uma posição altamente conservada no domínio ROC da proteína LRRK2 (**figura 9**). Ela foi identificada em heterozigose nos pacientes PAR1455, PAR1728 (casos familiares) e PAR1732, PAR2038 (casos isolados) (**anexo G**). As principais características clínicas destes indivíduos estão resumidas na **tabela 7**. Apenas o heredograma referente ao paciente PAR1455 foi obtido, entretanto, a análise de segregação desta variante na família não foi possível (**figura 13**). Este paciente também é heterozigoto para a mutação p.G2019S, anteriormente descrita por nosso grupo (Pimentel *et al.*, 2008) (**anexo D**). A análise de 210 indivíduos controles mostrou que esta substituição foi presente em uma mulher de 83 anos (**anexo H, figura 14**). A diferença das frequências da alteração p.T1410M entre indivíduos e controles foi estatisticamente não significativa ( $P=0,2098$ ; *odds ratio*=4,18; intervalo de confiança a 95%=0.46-37,7). Os três programas utilizados para a análise *in silico* (PolyPhen, Pmut e SIFT) mostraram que esta alteração pode afetar a estrutura ou a função da proteína (**tabela 6**).



**Figura 12** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4229C>T (p.T1410M).



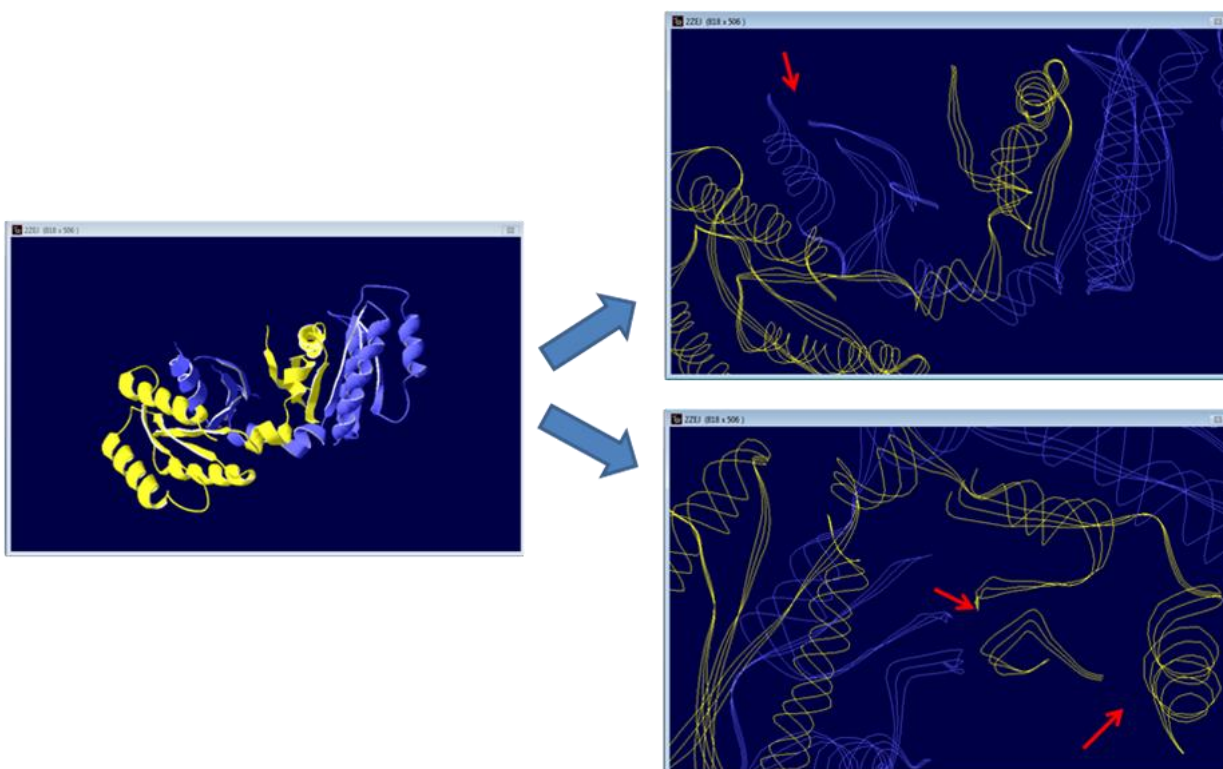
**Figura 13** - Heredograma da família do paciente PAR1455 (seta). IM, idade de manifestação da DP; \*, indivíduo positivo para a mutação c.6055G>A (p.G2019S) (Pimentel *et al.*, 2008); +, indivíduo positivo para a variante c.4229C>T (p.T1410M).



**Figura 14** - Análise de indivíduos controles feita através de gel de poliácridamida dos produtos da PCR (exon 30) digeridos com a enzima *HgaI*. Linha 1: padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder; linha 2: controle com a alteração c.4229C>T (p.T1410M) no gene *LRRK2*; linhas 3 e 4: controles sem a transição c.4229C>T.

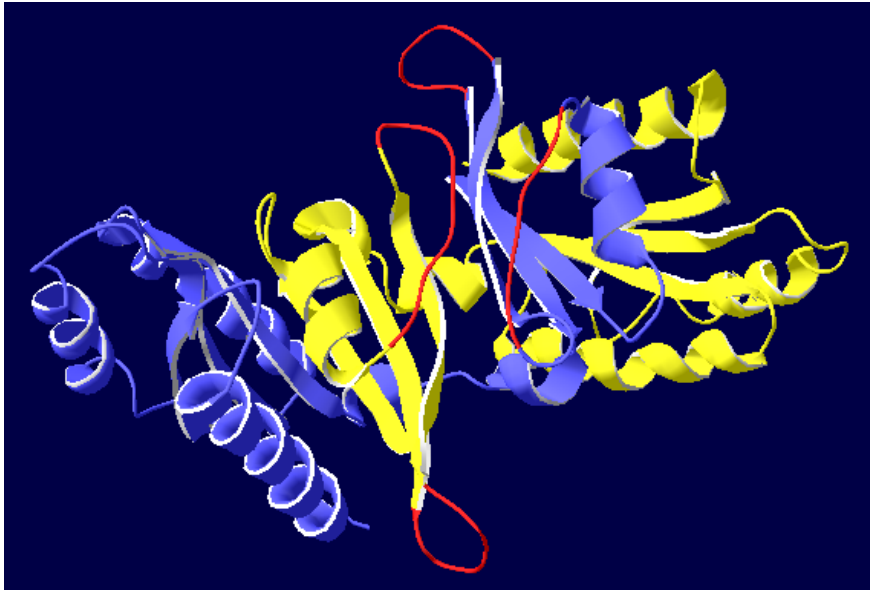


Com o objetivo de avaliar se a alteração c.4229C>T (p.T1410M) pode comprometer o comportamento da proteína LRRK2 *in silico*, os estudos de modelagem molecular e de dinâmica molecular foram iniciados. A modelagem molecular do domínio ROC foi realizada e o estudo de dinâmica molecular ainda se encontra em andamento. Na estrutura cristalográfica do dímero ROC (número de acesso “2ZEJ”) observou-se que determinadas regiões na cadeia A (aminoácidos 1357-1367 e 1379-1387) e na cadeia B (aminoácidos 1358-1364 e 1379-1387) estavam ausentes, como mostra a **figura 15**. Por isso, a modelagem molecular para estas regiões foi realizada através dos programas SWISS-MODEL e Modeller 9v7 (**figuras 16 e 17**). Os modelos gerados através destes programas serão utilizados para o estudo de dinâmica molecular.

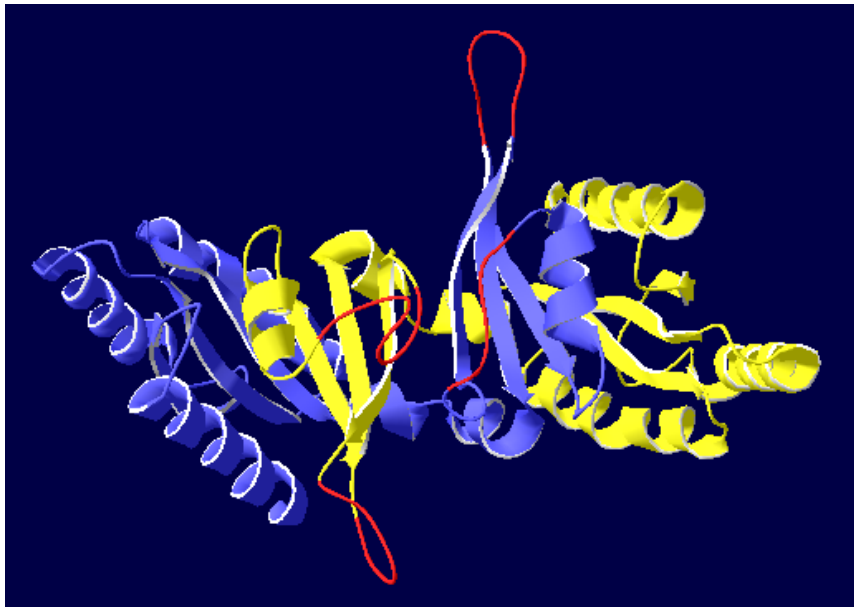


**Figura 15** - Representação da estrutura cristalográfica do dímero ROC (número de acesso “2ZEJ”) visualizada no programa Swiss-Pdb Viewer 4.0.1. As regiões em azul e amarelo mostram, respectivamente, as cadeias A e B do dímero ROC. As setas vermelhas indicam as regiões ausentes.



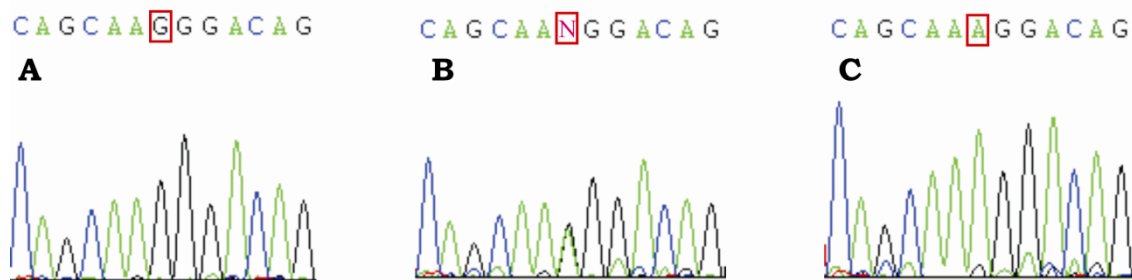


**Figura 16** - Modelagem das regiões ausentes feitas através do programa SWISS-MODEL. As regiões da proteína que estavam ausentes e que foram modeladas estão mostradas em vermelho.



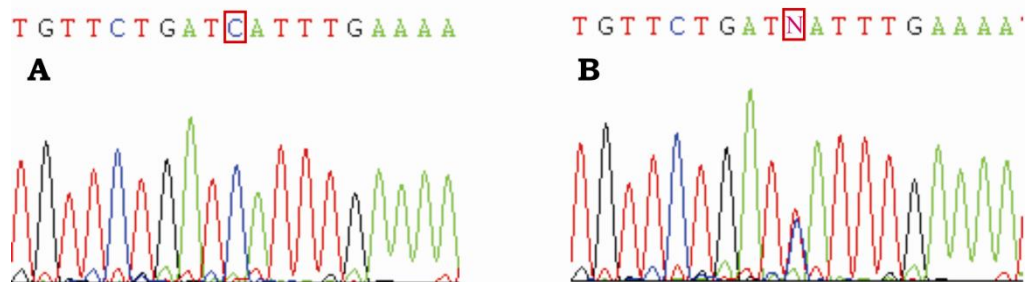
**Figura 17** - Modelagem das regiões ausentes feitas através do programa Modeller 9v7. As regiões da proteína que estavam ausentes e que foram modeladas estão mostradas em vermelho.

A alteração c.4269G>A (**figura 18**) é silenciosa (p.K1423K) e foi identificada em 25 pacientes heterozigotos e em dois pacientes homozigotos (PAR1144 e PAR2066) (**anexo G**). Todos os pacientes que apresentaram esta variante também exibiram a alteração c.4193G>A (p.R1398H) descrita anteriormente o que sugere que ambas estejam em desequilíbrio de ligação. Seis casos possuem história familiar da DP e 21 são casos esporádicos.



**Figura 18** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4269G>A (p.K1423K). **C)** Alteração c.4269G>A (p.K1423K) em homozigose.

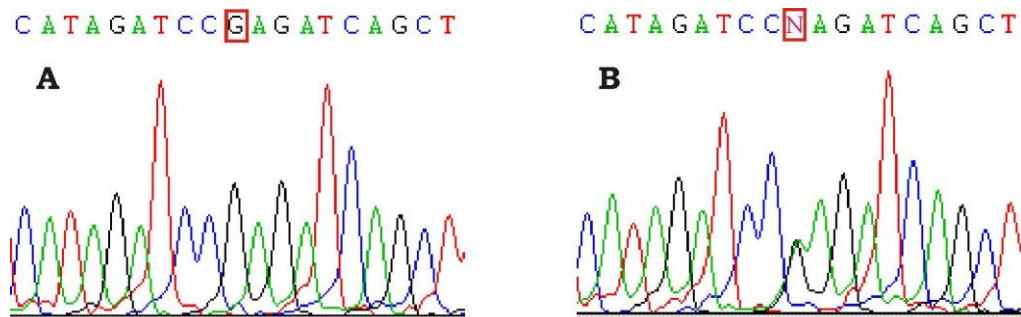
A alteração no intron 30, c.4317+16C>T, foi identificada em apenas um paciente heterozigoto (PAR1307) com DP esporádica (**figura 19** e **anexo G**).



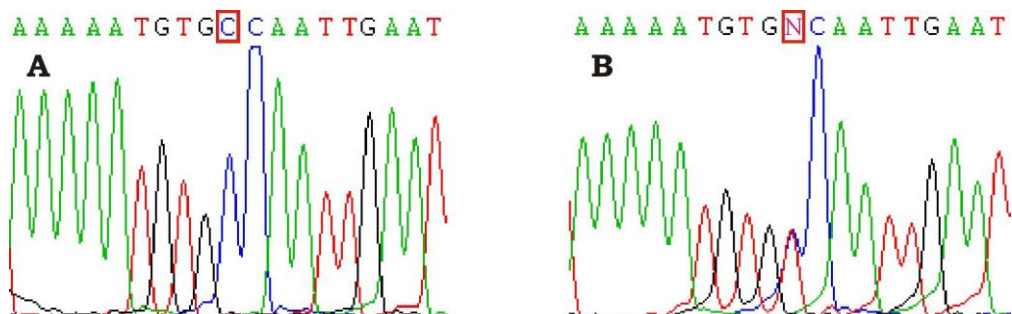
**Figura 19** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4317+16C>T.

### Variantes identificadas no exon 32

No exon 32, foram identificadas duas variantes que resultam em substituições de aminoácidos no domínio COR da proteína LRRK2. A alteração c.4541G>A resulta na troca de uma arginina por uma glutamina na posição 1514 da proteína, tendo sido identificada em heterozigose em três casos esporádicos da DP (**figura 20, anexo G**). A variante c.4624C>T (p.P1542S) foi identificada em 6 pacientes heterozigotos. Destes, apenas um paciente apresenta história familiar da DP (**figura 21, anexo G**).



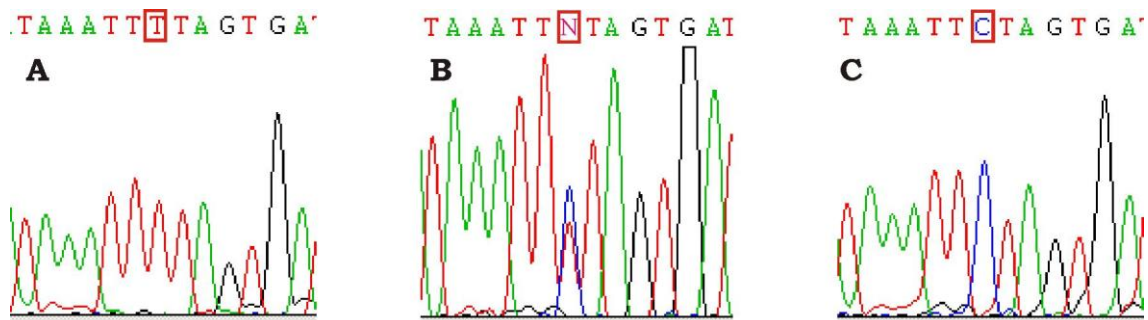
**Figura 20** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4541G>A (p.R1514Q).



**Figura 21** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4624C>T (p.P1542S).

### Variante identificada no intron 33

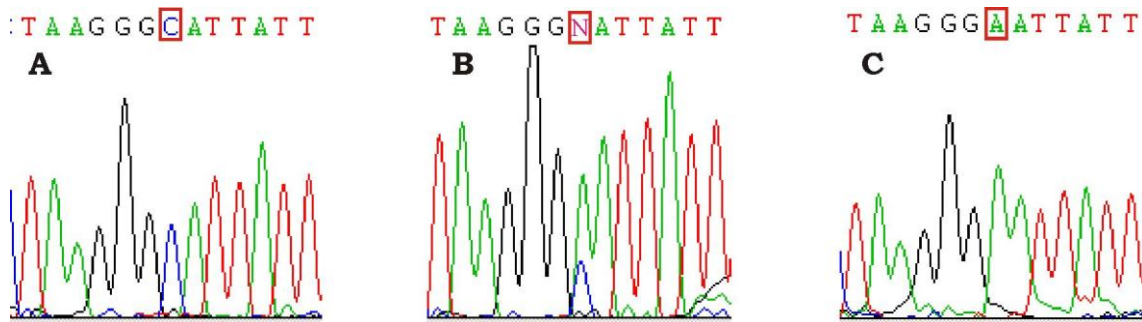
No exon 33 não foi detectada nenhuma alteração. Apenas uma variante no intron 33, a c.4828-31T>C (**figura 22**), foi identificada em 162 pacientes (25 casos familiares e 137 casos esporádicos). Cinquenta e sete pacientes são homozigotos para a alteração, enquanto que 105 são heterozigotos (**anexo G**).



**Figura 22** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4828-31T>C em heterozigose e **(C)** em homozigose.

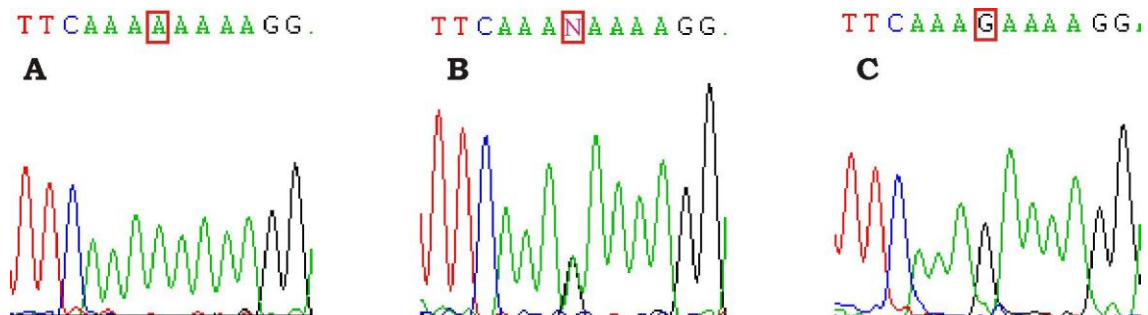
### Variantes identificadas no exon 34 e no intron 34.

No exon 34 foram identificadas 4 alterações. A alteração c.4872C>A (**figura 23**) resulta na mutação silenciosa p.G1624G. Ela foi encontrada em um total de 186 pacientes (34 casos familiares e 152 casos esporádicos), dos quais 103 são portadores heterozigotos e 83 são homozigotos para esta variante (**anexo G**).



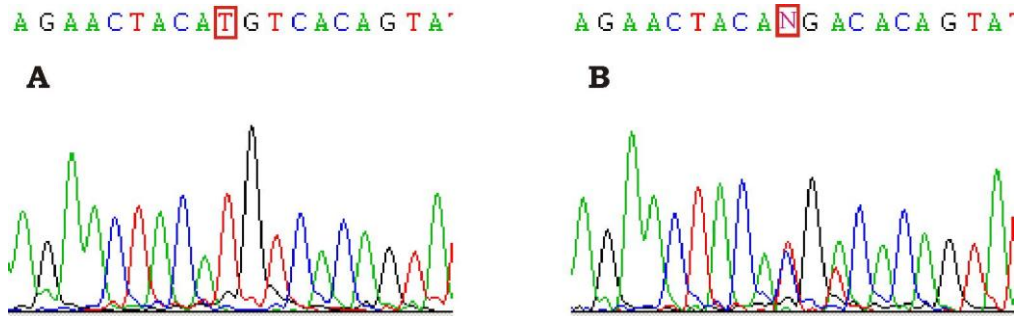
**Figura 23** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4872C>A (p.G1624G). **C)** Alteração c.4872C>A (p.G1624G) em homozigose.

A alteração silenciosa c.4911A>G (p.K1637K) (**figura 24**) foi encontrada em 165 pacientes. Um total de 27 pacientes apresenta história familiar da doença e 138 são casos esporádicos. Cinquenta e nove pacientes são portadores homozigotos e 106 apresentam a alteração em heterozigose (**anexo G**).



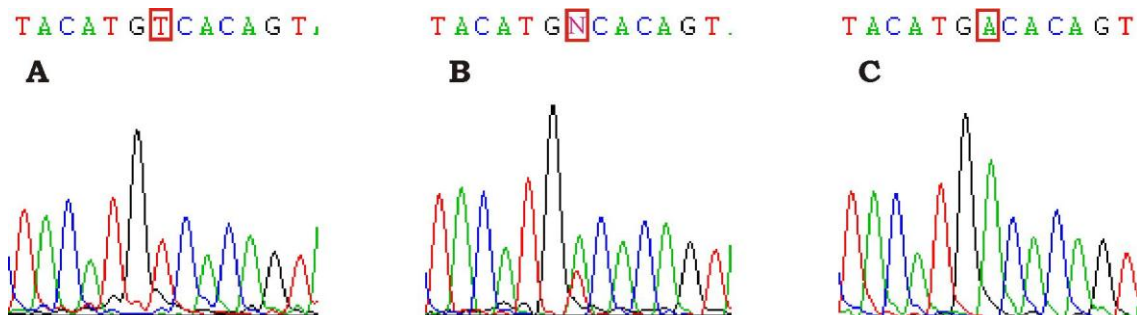
**Figura 24** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4911A>G (p.K1637K). **C)** Alteração c.4911A>G (p.K1637K) em homozigose.

Dois pacientes (ambos casos isolados) são portadores heterozigotos da substituição c.4937T>C (**figura 25, anexo G**) que resulta na troca de uma metionina por uma treonina no aminoácido 1646 na proteína LRRK2.



**Figura 25** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4937T>C (p.M1646T).

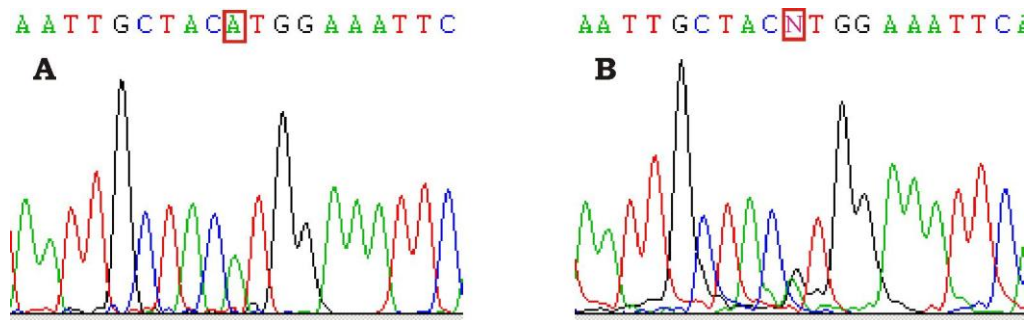
A variante c.4939T>A (**figura 16**) resulta na troca de uma serina por uma treonina na posição 1647 no domínio COR da proteína. Ela foi identificada em 67 pacientes (11 casos familiares e 56 esporádicos), dos quais 59 pacientes são heterozigotos e 8 são homozigotos (**anexo G**).



**Figura 26** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.4939T>A (p.S1647T) em heterozigose e **(C)** em homozigose.



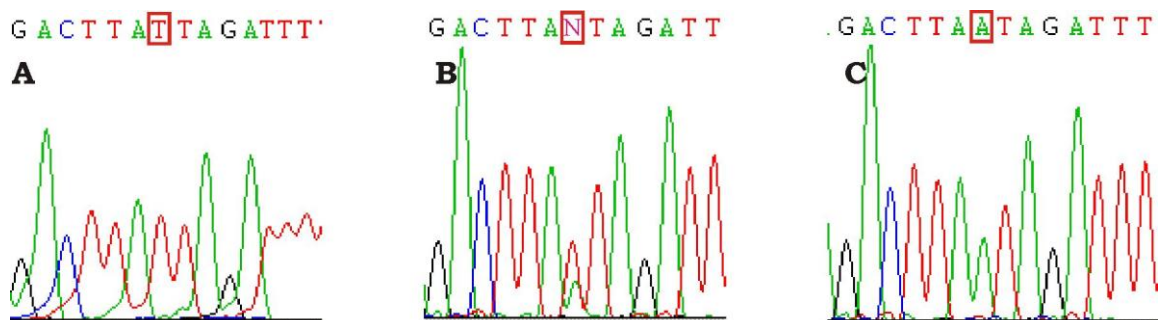
No intron 34, foi detectada a alteração c.5015+32A>G (**figura 27**), identificada em 31 pacientes heterozigotos, dos quais 6 pacientes apresentam histórico familiar da DP e o restante são casos esporádicos (**anexo G**).



**Figura 27** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.5015+32A>G.

### Variante identificada no intron 35

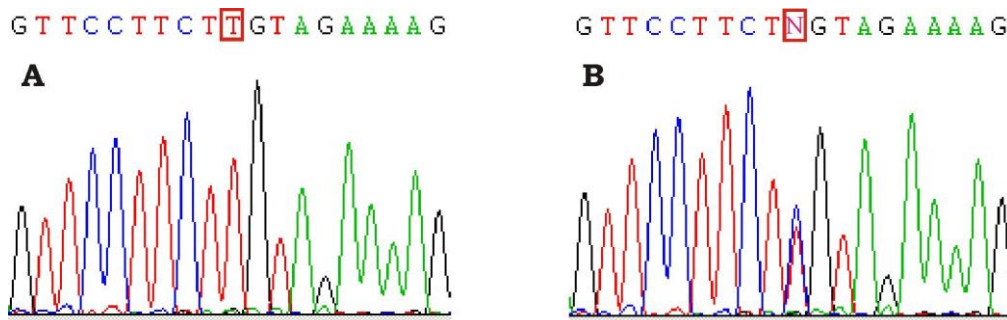
Somente a alteração c.5170+23T>A (**figura 28**) foi identificada no intron 35 em 87 pacientes heterozigotos e 54 pacientes homozigotos. Destes, 25 indivíduos têm história familiar da doença e 116 constituem casos isolados (**anexo G**).



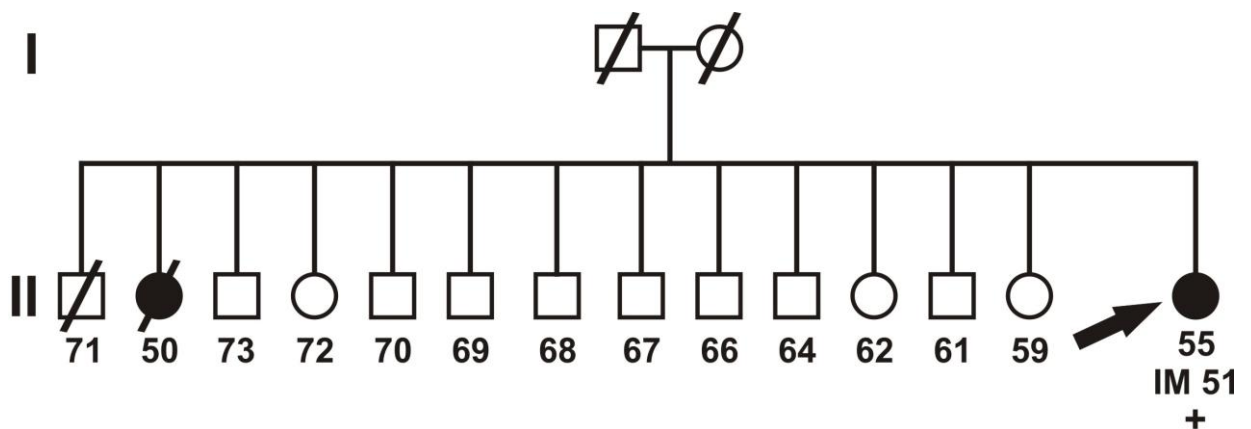
**Figura 28** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. B) Alteração c.5170+23T>A em heterozigose e (C) em homozigose.

### Variantes identificadas no exon 36 e no intron 36.

A alteração exônica c.5308T>C (**figura 29**) resulta na troca de uma cisteína por uma arginina na posição 1770 na proteína LRRK2, em uma posição não conservada no domínio COR (**figura 9**). Ela foi identificada em heterozigose no paciente PAR1209 que apresenta história familiar da doença (**anexo G**). O heredograma da paciente encontra-se na **figura 30**. Ela possui uma irmã falecida que também tinha doença de Parkinson. As características clínicas deste paciente estão resumidas na **tabela 7**. Esta alteração não foi encontrada em 210 indivíduos saudáveis (**anexo H**). Dos três programas utilizados para a análise *in silico*, somente o programa SIFT considerou esta substituição não patogênica (**tabela 6**).



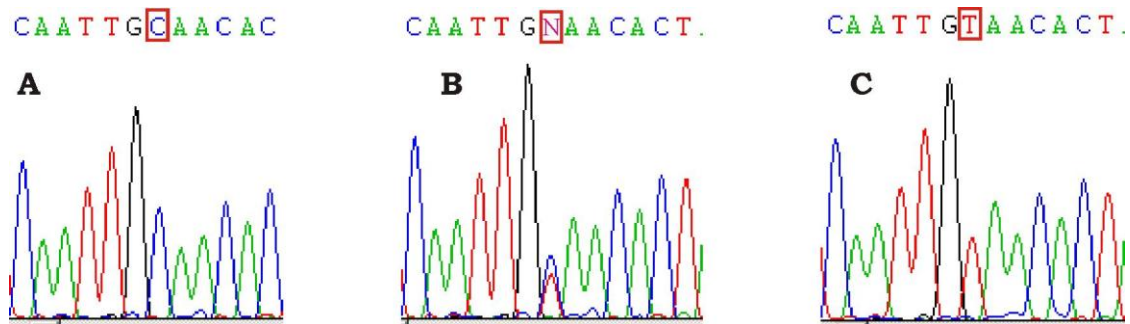
**Figura 29** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.5308T>C (p.C1770R).



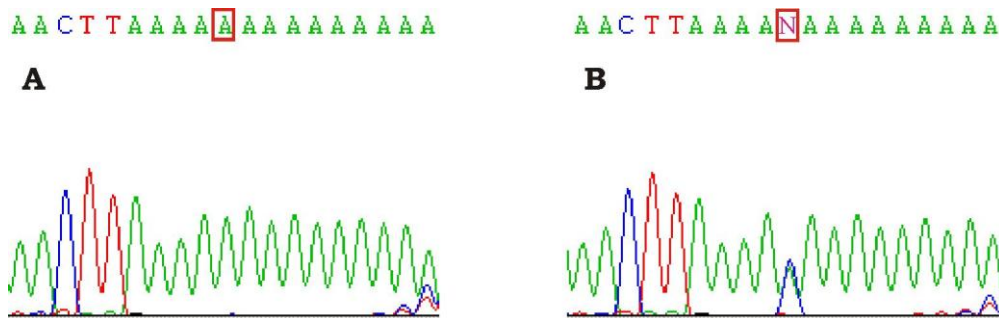
**Figura 30** - Heredograma da família do paciente PAR1209 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a mutação c.5308T>C (p.C1770R).



Duas alterações foram encontradas no intron 36. A alteração c.5317+32C>T (**figura 31, anexo G**) foi encontrada em 182 pacientes (113 pacientes heterozigotos e 69 pacientes homozigotos; 32 casos familiares e 150 casos esporádicos). Sete pacientes são portadores heterozigotos da variante c.5317+59A>C, destes apenas um apresenta história familiar da DP (**figura 32, anexo G**).



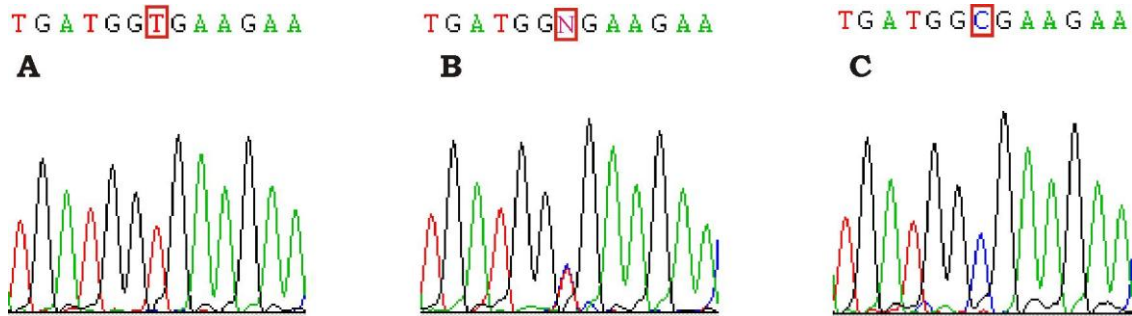
**Figura 31** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. (A) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. (B) Alteração c.5317+32C>T.



**Figura 32** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.5317+59A>C.

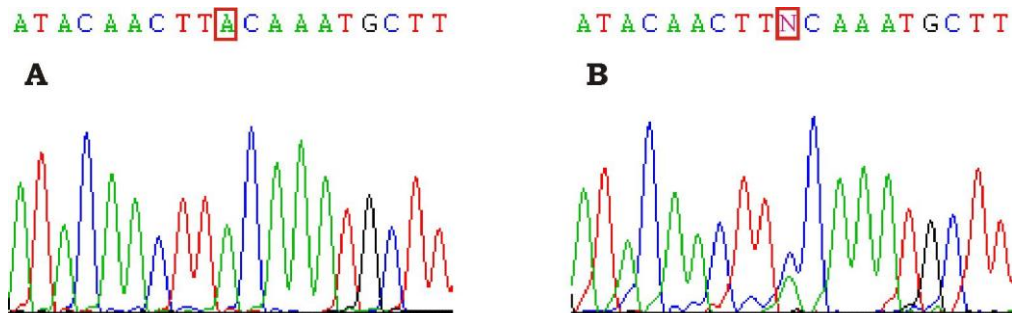
### Variantes identificadas no exon 37 e no intron 37.

A alteração exônica c.5457T>C (**figura 33**) é silenciosa (p.G1819G) e foi encontrada em 163 pacientes (105 pacientes heterozigotos e 58 pacientes homozigotos; 27 casos familiares e 136 casos esporádicos) (**anexo G**).

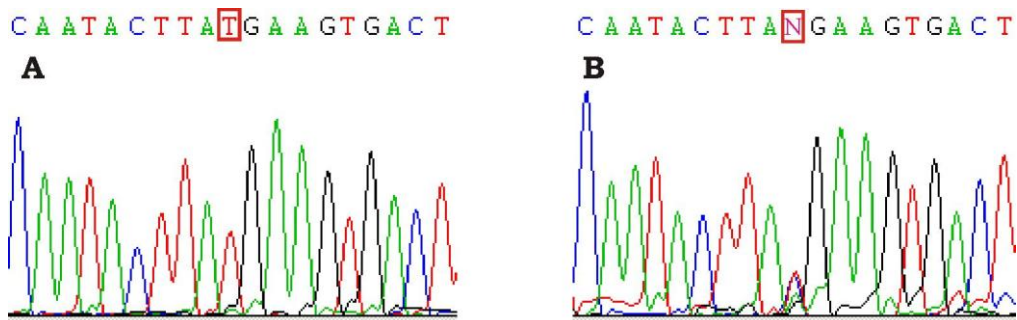


**Figura 33** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A**) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B**) Alteração c.5457T>C (p.G1819G) em heterozigose e **C**) em homozigose.

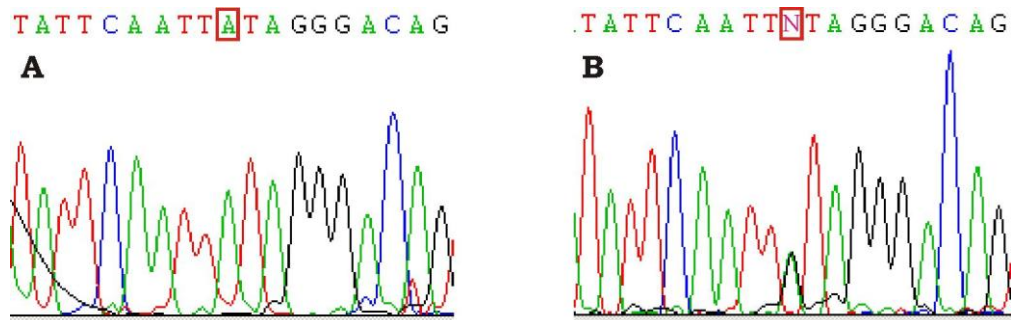
Três variantes foram identificadas no intron 37. A c.5509+20A>C foi encontrada em 8 pacientes heterozigotos, com apenas um apresentando história familiar da doença. A alteração c.5509+52T>C foi encontrada em um portador heterozigoto (PAR1435) com DP esporádica. Apenas um indivíduo (paciente PAR1154), sem história familiar da DP, foi portador heterozigoto da alteração c.5509+122A>G (**figuras 34, 35, 36, anexo G**).



**Figura 34** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A**) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B**) Alteração c.5509+20A>C.



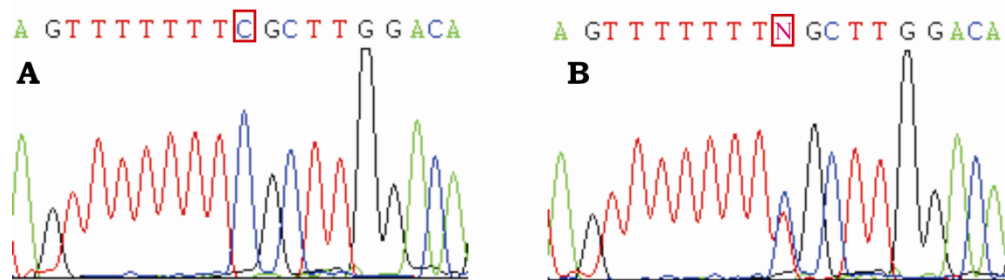
**Figura 35** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.5509+52T>C.



**Figura 36** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.5509+122A>G.

### Variante identificada no intron 38.

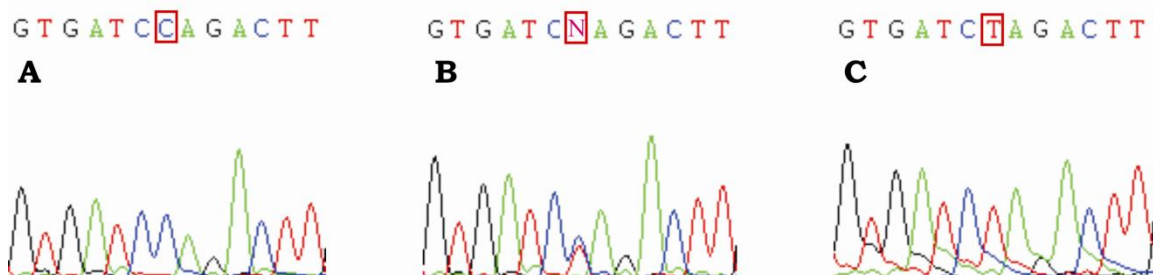
O paciente PAR1247, com DP esporádica, é portador heterozigoto da alteração c.5657-46C>T. Seu eletroferograma encontra-se na **figura 37**.



**Figura 37** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.5657-46C>T.

### Variante identificada no intron 40

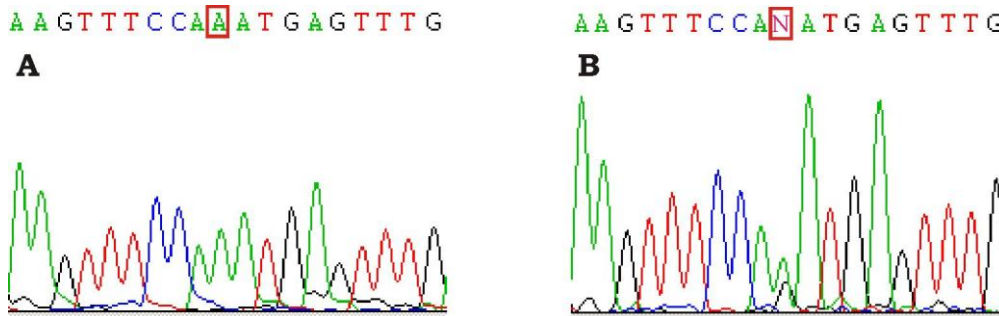
A alteração intrônica c.5948+48C>T (**figura 38**) foi encontrada em 47 indivíduos heterozigotos e em 2 indivíduos homozigotos. Doze indivíduos apresentam histórico familiar da DP e 37 são casos esporádicos (**anexo G**).



**Figura 38** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. B) Alteração c.5948+48C>T em heterozigose e (C) em homozigose.

### Variante identificada no exon 42

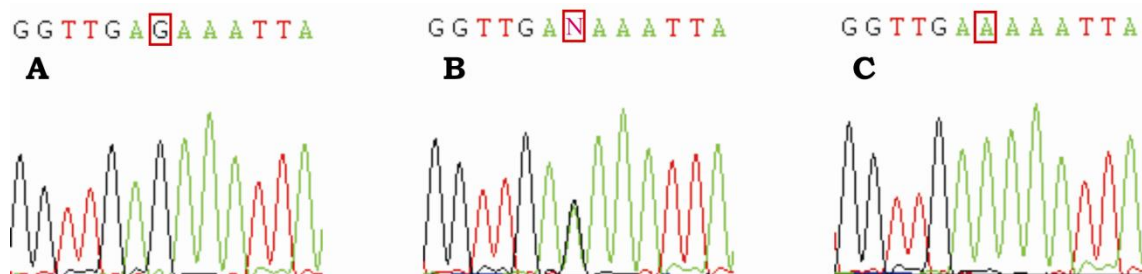
No exon 42, a alteração c.6241A>G (**figura 39**) que resulta na troca de uma asparagina por um ácido aspártico no aminoácido 2081 da proteína LRRK2, foi identificada em três pacientes heterozigotos, sem história familiar da DP (**anexo G**).



**Figura 39** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.6241A>G (p.N2081D).

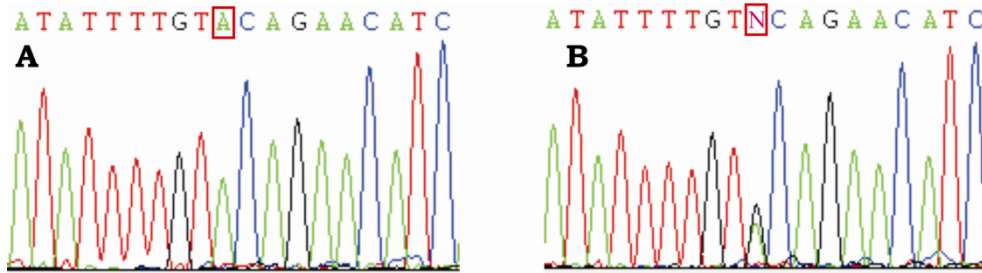
### Variantes identificadas no exon 43 e no intron 43.

A alteração c.6324G>A (**figura 40**) resulta na mutação silenciosa p.E2108E no domínio MAPKKK da proteína. Ela foi encontrada em 71 indivíduos (13 casos familiares e 58 esporádicos), dos quais 11 pacientes são portadores homozigotos (**anexo G**).

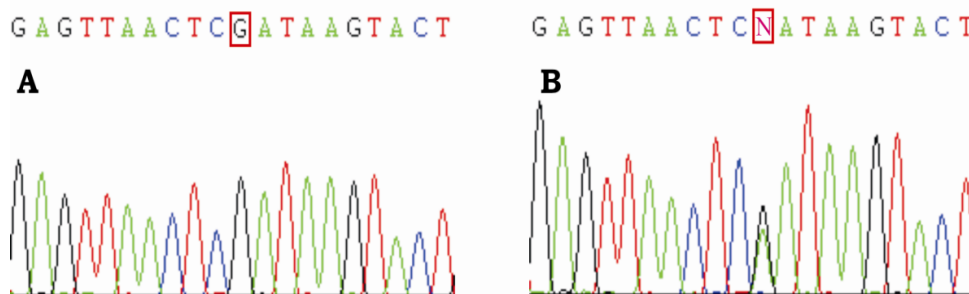


**Figura 40** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. B) Alteração c.6324G>A (p.E2108E) em heterozigose e (C) em homozigose.

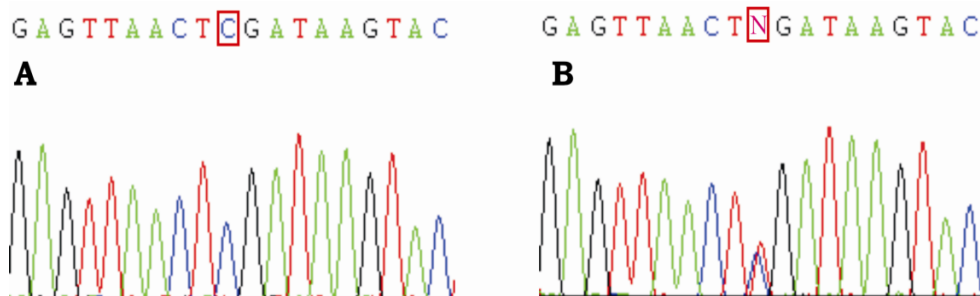
No intron 43, três alterações foram detectadas. A c.6381+30A>G está presente no paciente heterozigoto PAR1172, que não possui história familiar da DP. A c.6382-36G>A foi presente em heterozigose no paciente PAR1171, um caso esporádico da DP. Quatro pacientes são portadores heterozigotos da transição c.6382-37C>T, todos constituindo casos isolados da doença (**figuras 41, 42 e 43, e anexo G**).



**Figura 41** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.6381+30A>G.



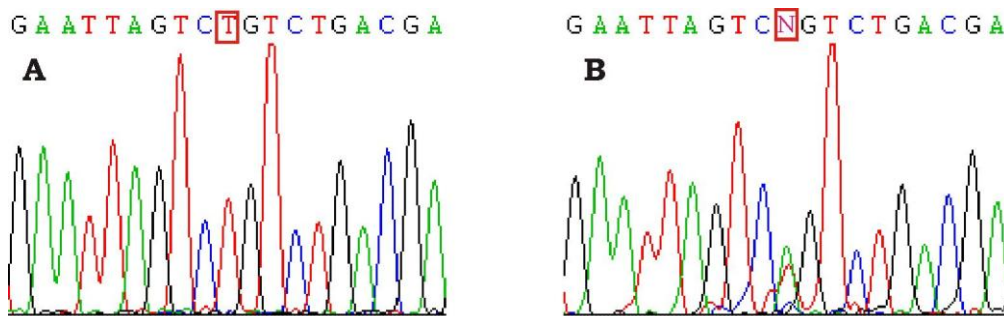
**Figura 42** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. (A) Sequência selvagem do gene *LRRK2*. (B) Alteração c.6382-36G>A.



**Figura 43** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.6382-37C>T.

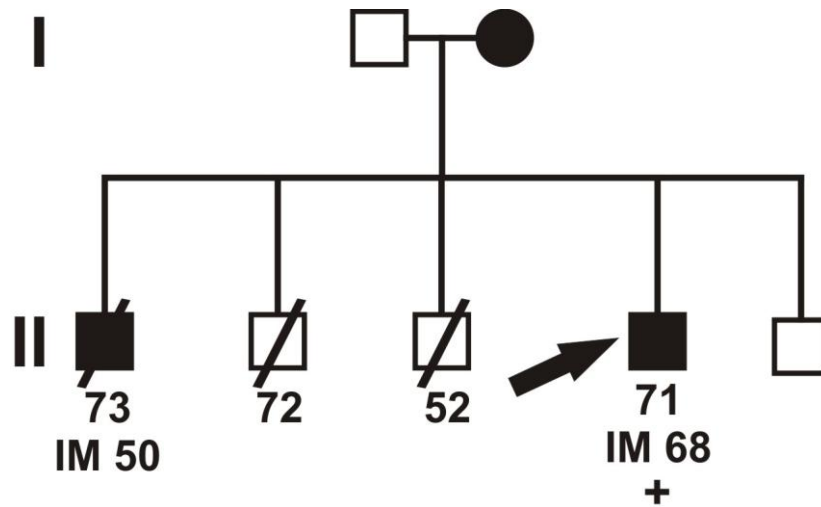
#### Variantes identificadas no exon 44 e no intron 44.

O paciente PAR2043 é portador heterozigoto da alteração missense c.6415T>A (p.C2139S) (**figura 44**), que resulta na troca de uma cisteína por uma serina em uma posição altamente conservada da proteína LRRK2, entre os domínios MAPKKK e WD40 (**figura 9**). O probando tem 71 anos e apresenta sintomas típicos da DP, tendo manifestado a doença aos 68 anos. Suas características clínicas estão descritas na **tabela 7**. Ele apresenta história familiar da DP, como mostra o heredograma na **figura 45**. Não foi possível o estudo genético de seus familiares. Para fins de comparação, 210 indivíduos controles foram analisados e a alteração c.6415T>A foi ausente nesta amostra (**anexo H**). As análises *in silico* mostraram que somente um dos programas (SIFT) apontou a variante c.6415T>A (p.C2139S) como tolerável, enquanto que os outros dois programas utilizados avaliaram esta alteração como patogênica.



**Figura 44** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.6415T>A (p.C2139S).

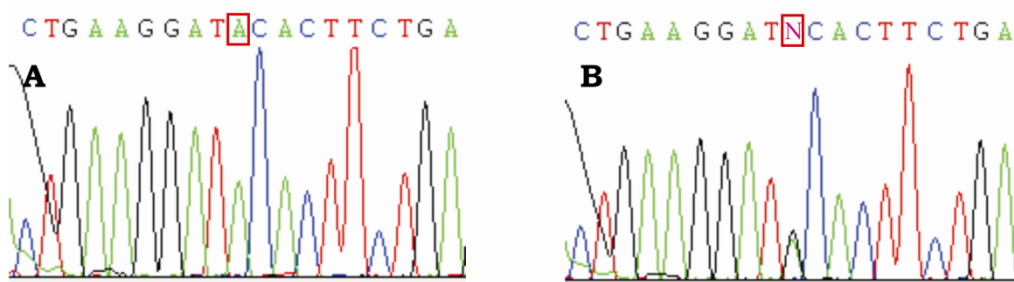




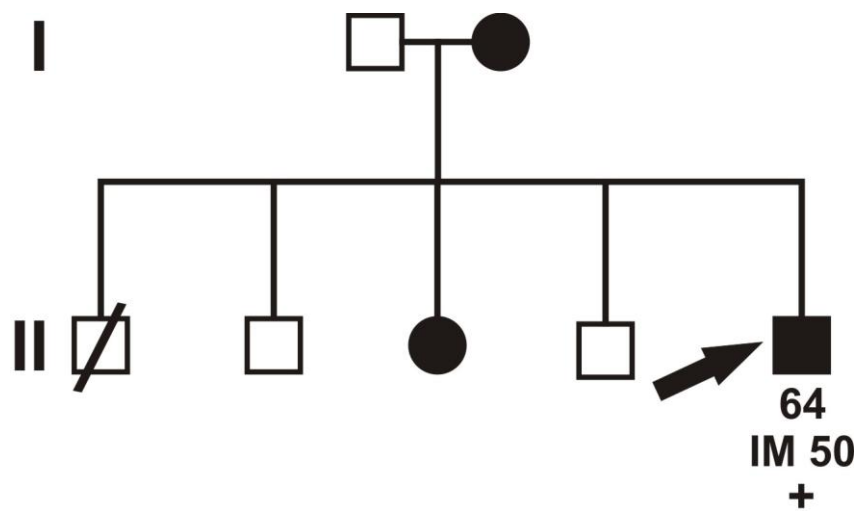
**Figura 45** - Heredograma da família do paciente PAR2043 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a mutação c.6415T>A (p.C2139S).

A variante de sentido trocado c.6566A>G está localizada no exon 44 e resulta na troca de uma tirosina por uma cisteína na posição 2189 da proteína LRRK2 (**figura 46**), localizando-se no domínio WD40, em uma posição não conservada entre as espécies de vertebrados (**figura 9**). Esta alteração foi identificada em heterozigose em dois pacientes (PAR1319 e PAR1493) (**anexo G**). O paciente PAR1319, de 64 anos, é um caso de DP familiar e manifestou a doença aos 50 anos. Sua mãe e irmã também apresentam DP (**figura 47**). O paciente PAR1493 possui 74 anos e não apresenta história familiar de DP, tendo manifestado a doença aos 62 anos (**figura 48**). A análise molecular de seus dois irmãos saudáveis mostrou que um irmão de 70 anos também é portador heterozigoto da mesma alteração e o seu outro irmão de 79 anos não apresenta a variante. O estudo da amostra controle mostrou que 2 mulheres controles, uma de 53 e outra de 81 anos, são portadoras heterozigotas da variante c.6566A>G (p.Y2189C) (**anexo H**). As análises *in silico* mostraram que somente o programa Pmut apontou esta alteração como patogênica e os programas PolyPhen e SIFT avaliaram como não patogênica.

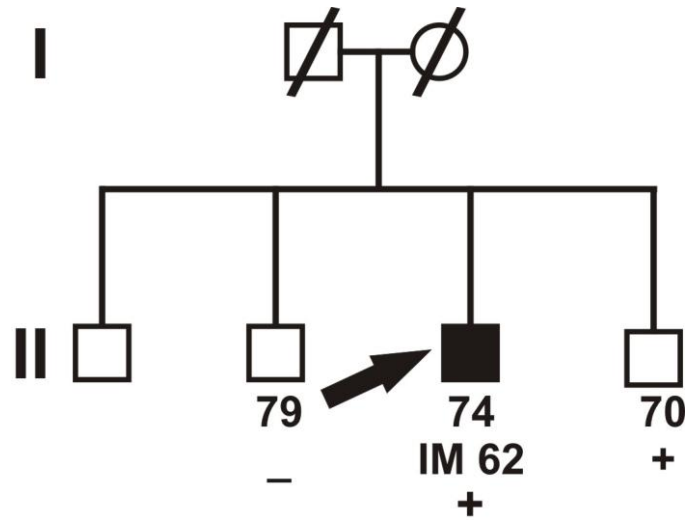




**Figura 46** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *LRRK2*. **B)** Alteração c.6566A>G (p.Y2189C).

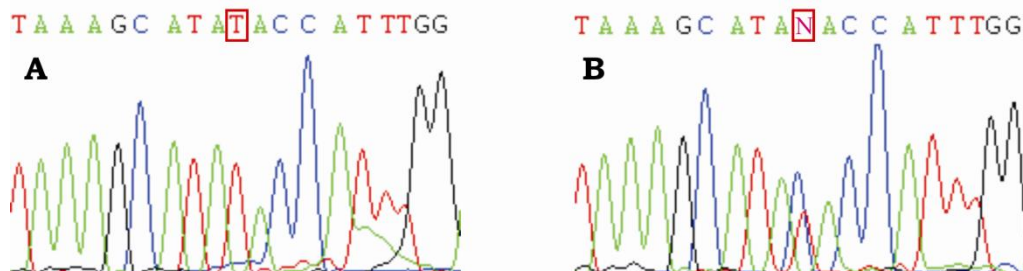


**Figura 47** - Heredograma da família do paciente PAR1319 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a alteração c.6566A>G (p.Y2189C).



**Figura 48** - Heredograma da família do paciente PAR1493 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a alteração c.6566A>G (p.Y2189C); -, indivíduo negativo para a alteração c.6566A>G (p.Y2189C).

O paciente PAR1420, sem história familiar da DP, apresenta a alteração intrônica c.6576+44T>C em heterozigose (**figura 49, anexo G**).



**Figura 49** - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR mostrando em (A) a sequência selvagem do gene *LRRK2* e em (B) a alteração c.6576+44T>C.

Parte da amostra de pacientes que participou deste estudo (154 pacientes) foi analisada para os exons 31 e 41 e os resultados correspondentes foram publicados na revista *Neuroscience Letters* (**anexo D**). Posteriormente, os resultados obtidos nesta tese referentes às análises moleculares dos domínios ROC e MAPKKK deram origem a um outro artigo científico publicado da revista *European Journal of Neurology* (**anexo E**). A publicação destes artigos permitiu que as alterações exônicas descritas, fossem depositadas no *Parkinson Disease Mutation Database* (PDMutDB).

## 4 DISCUSSÃO

Através do sequenciamento de 14 exons do gene *LRRK2*, responsáveis por codificarem os principais domínios da proteína, ROC, COR e MAPKKK, foram identificadas 31 alterações causadas por substituições de nucleotídeos. Nenhuma deleção ou inserção foi identificada, corroborando os dados da literatura que indicam que estes tipos de mutações não são frequentes no gene *LRRK2* em pacientes com DP (Nichols *et al.*, 2007; Paisán-Ruiz *et al.*, 2008).

Tendo em vista a identificação de inúmeras variantes neste trabalho, a definição do valor patogênico destas alterações foi conduzida de forma cuidadosa, a fim de que a frequência de alterações patogênicas em *LRRK2* fosse corretamente estimada e pudéssemos compreender se estas alterações contribuem para o desenvolvimento da doença ou se elas constituem polimorfismos.

De acordo com o banco de dados PMutDB (Nuytemans *et al.*, 2010), cerca de 60 variantes exônicas foram descritas no gene *LRRK2* e somente 11% foram consideradas definitivamente patogênicas. O restante das alterações foram classificadas como sendo de natureza patogênica não clara (PMutDB). Para que uma variante seja considerada definitivamente patogênica, vários aspectos devem ser avaliados como a sua cosegregação em membros da família, a sua baixa frequência em amostras controles e a verificação de sua patogenicidade através de estudos funcionais (Bonifati, 2007; Healy *et al.*, 2008; Greggio & Cookson, 2009; Kumari & Tan, 2009).

Considerando os resultados obtidos neste estudo e os dados descritos na literatura, as alterações encontradas neste trabalho foram classificadas em três tipos: alterações potencialmente patogênicas, alterações potencialmente não patogênicas e alterações não patogênicas (polimorfismos). Abaixo, discutiremos cada uma das variantes encontradas.

### **Alterações potencialmente patogênicas**

As alterações identificadas consideradas potencialmente patogênicas são as mutações exônicas c.5308T>C (p.C1770R) e c.6415T>A (p.C2139S).

A mutação c.5308T>C (p.C1770R) nunca foi descrita na literatura, tendo sido encontrada em um paciente e ausente na amostra controle. As análises *in silico* através de duas ferramentas (PolyPhen e Pmut) indicaram que esta alteração pode afetar a proteína e apenas a ferramenta SIFT classificou-a como tolerável. A mutação p.C1770R está situada no domínio COR, em um aminoácido conservado na maioria das espécies, diferenciando-se apenas em dois organismos analisados (*Papio anubis* e *Tetraodon nigroviridis*). O domínio COR está envolvido na função quinase da proteína LRRK2. A partir da descrição da estrutura cristalográfica do domínio ROC por Deng e colaboradores (2008) foi proposto um modelo de regulação da proteína LRRK2 que envolve a dimerização do domínio COR, mostrando sua importância. Quando o domínio ROC se liga ao GTP, ocorre a dimerização de COR, o que induz à autointeração do domínio MAPKKK, resultando em sua atividade de fosforilação. Com a conversão do GTP ao GDP, mudanças de conformação em ROC interrompem o dímero COR e MAPKKK, inativando a atividade quinase (Deng *et al.*, 2008).

Até o momento, apenas uma alteração definitivamente patogênica foi descrita no domínio COR, p.Y1699C (Paisán-ruíz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004; West *et al.*, 2005; Jaleel *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2007; Luzón-Toro *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010). Esta alteração é responsável por aumentar a atividade quinase da LRRK2 e por aumentar a ligação da proteína ao GTP, *in vitro*, indicando que o domínio COR é um potencial mediador da atividade quinase e GTPase (West *et al.*, 2007). *In vivo*, a alteração p.Y1699C também foi responsável por diminuir a atividade GTPase em células de *Saccharomyces cerevisiae*, induzindo a toxicidade nestas células (Xiong *et al.*, 2010). Além disso, a expressão da LRRK2 mutante p.Y1699C causa toxicidade e a formação de inclusões citoplasmáticas em células de linhagem neuronal (Greggio *et al.*, 2006). Outra variante localizada no domínio COR, p.R1628P, não é considerada uma mutação, mas constitui um fator de risco para a DP em populações asiáticas. Esta variante possui maior frequência em pacientes com DP, quando comparada à população controle (Lu *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008; Pulkes *et al.*, 2010). Em células de rim HEK-293T, a presença desta alteração foi associada a um alto grau de apoptose, quando sujeita ao estresse oxidativo, em comparação a células expressando a proteína selvagem, o que indica que a p.R1628P pode ser um fator de risco associado com a diminuição da habilidade das células em atuar contra o estresse oxidativo (Zhao *et al.*, 2009).

Além disso, o domínio COR pode interagir com outras proteínas, como as da família DVL (Sancho *et al.*, 2009). Proteínas desta família estão envolvidas na orientação axônica, na formação sináptica e na manutenção neuronal, além de interagirem e mediar a ativação de pequenas GTPases com similaridades estruturais ao domínio ROC (Sancho *et al.*, 2009). As

proteínas DVL1, DVL2 e DVL3 podem interagir com o domínio ROC-COR da LRRK2 e a mutação patogênica p.Y1699C é responsável por enfraquecer a interação do domínio ROC-COR com estas proteínas (Sancho *et al.*, 2009).

Tendo em vista a importância do domínio COR e o fato de alterações previamente descritas neste domínio estarem fortemente associadas ao desenvolvimento da DP, a variante p.C1770R pode ser patogênica. Além disso, esta mutação estava ausente em indivíduos saudáveis de nossa população e duas ferramentas indicaram que ela pode alterar a estrutura ou a função da proteína. Portanto, a soma das evidências sinaliza que a variante p.C1770R possui uma alta probabilidade de ser patogênica. Contudo, as análises funcionais são importantes para comprovar se esta alteração está definitivamente associada ao desenvolvimento da DP.

A mutação c.6415T>A (p.C2139S) foi descrita pela primeira vez por nosso grupo e está localizada um aminoácido distal ao domínio MAPKKK. Na literatura, apenas outra alteração, p.T2141M, foi descrita entre os domínios MAPKKK e WD40 (Paisán-Ruiz *et al.*, 2008). Entretanto, seu papel patogênico permanece indefinido, já que esta alteração não é conservada e não foi possível analisar membros da família do probando (Paisán-Ruiz *et al.*, 2008). Em nossa amostra, a alteração p.C2139S foi detectada em um indivíduo com história familiar da DP. Esta variante afeta um aminoácido altamente conservado e as análises *in silico* através das ferramentas PolyPhen e Pmut mostraram que a p.C2139S pode afetar estrutura da proteína LRRK2. Esta alteração não foi observada em 420 cromossomos controles da população brasileira. Apesar de sua patogenicidade não ter sido confirmada por estudos funcionais, nossos resultados suportam a hipótese de que a mutação p.C2139S pode estar associada à DP.

### **Alterações potencialmente não patogênicas**

Das alterações exônicas, c.4194T>G (p.R1398R), c.4229C>T (p.T1410M) e c.6566A>G (p.Y2189C) são potencialmente não patogênicas. Entre as variantes intrônicas, consideramos c.4317+16C>T, c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+52T>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T, c.6382-36G>A, c.6382-37C>T e c.6576+44T>C potencialmente não patogênicas.

A variante c.4194T>G (p.R1398R) é silenciosa, não ocasionando troca de aminoácido na proteína LRRK2. Esta alteração nunca tinha sido descrita na literatura, embora uma outra

alteração *missense* na mesma localização da proteína, p.R1398H, tenha sido identificada neste trabalho e em outros estudos e classificada como não patogênica (Mata *et al.*, 2005; Paisán-Ruiz *et al.*, 2005; Di Fonzo *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2009; Nuytemans *et al.*, 2009; Jasinska-Myga *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010). Entretanto, não se pode excluir a possibilidade da alteração silenciosa p.R1398R afetar a expressão do RNA. Contudo, as análises *in silico* utilizando os programas SpliceView e NNSPLICE não mostraram alterações significativas relacionadas aos sítios doador e receptor de encadeamento selvagens.

Outro fator que favorece a classificação da p.R1398R como provavelmente não patogênica é a raridade de alterações silenciosas no *LRRK2* que foram associadas à DP. Das 25 variantes silenciosas descritas até o momento (PDMutDB), apenas a p.L1114L pode estar associada à DP, devido à sua cosegregação em um irmão com DP e à sua ausência em um irmão saudável e na amostra controle (Zimprinch *et al.*, 2004). O restante das variantes silenciosas não foram associadas ao desenvolvimento da doença. Tendo em vista o caráter silencioso da alteração p.R1398R, o fato das ferramentas eletrônicas não terem identificado alterações nos sítios de encadeamento selvagens e de outra mutação de sentido trocado no mesmo aminoácido ser considerada um polimorfismo, consideramos a p.R1398R potencialmente não patogênica.

A alteração c.4229C>T (p.T1410M) foi identificada em 1,9% dos pacientes e em 0,5% dos controles, sendo esta diferença estatisticamente não significativa. Dos pacientes, o probando PAR1455 também é portador heterozigoto de outra mutação, p.G2019S, descrita em nosso artigo (Pimentel *et al.*, 2008) (**anexo D**). Entretanto, seu fenótipo foi similar ao de pacientes portadores de uma única alteração no gene *LRRK2*, sendo sua idade de manifestação (47 anos) menor do que a média encontrada em indivíduos com a mutação p.G2019S (57,5 anos) (Healy *et al.*, 2008). Até o momento, poucos estudos identificaram um mesmo paciente com duas variantes *missense* no gene *LRRK2*, embora o nosso estudo tenha sido o único que identificou duas alterações nos domínios funcionais ROC e MAPKKK. Lu e colaboradores (2008) descreveram um indivíduo com idade de manifestação de 65 anos portador de duas variantes em heterozigose no gene *LRRK2*, consideradas fatores de risco para a DP na população chinesa (p.R1628P e p.G2385R), não sendo seu fenótipo mais severo do que o de

indivíduos com apenas uma dessas variantes. Outros estudos detectaram pacientes com DP portadores de alterações em diferentes genes associados à doença (Dächsel *et al.*, 2006; Illarioshkin *et al.*, 2007) e, como em nosso paciente PAR1455, os sintomas foram similares aos de indivíduos com DP esporádica ou aos de pacientes com uma única mutação no *LRRK2*, apresentando variação apenas na idade de manifestação. Um indivíduo com duas mutações no *LRRK2* e em *PARKIN* manifestou a doença precocemente aos 39 anos (Illarioshkin *et al.*, 2007). Porém, três outros portadores de alterações no *LRRK2* e em *PARKIN* não manifestaram a DP antes dos 50 anos e não apresentaram diferenças significativas no grau de severidade da doença (Dächsel *et al.*, 2006). Estes dados mostram que mais de um fator genético pode contribuir para a manifestação da DP.

A transição c.4229C>T (p.T1410M) foi previamente descrita por Lesage e colaboradores (2009) em 9,3% dos pacientes das ilhas do Caribe e em 4,9% dos controles desta mesma população, sendo esta diferença estatisticamente não significativa. Esta alteração foi considerada um possível polimorfismo não patogênico. Entretanto, estes autores sugeriram que análises posteriores são necessárias para testar se esta variante é um fator de risco em populações caribenhas (Lesage *et al.*, 2009). Similar a estes estudos, nós acreditamos que a alteração p.T1410M é um provável polimorfismo, já que a mesma estava presente em uma mulher controle de 83 anos da população brasileira e em 4,9% dos controles caribenhos. Entretanto, devemos ter cautela na avaliação de sua patogenicidade. A p.T1410M afeta um aminoácido altamente conservado, localizado no domínio ROC e as análises *in silico* mostraram que esta variante pode ser patogênica. O domínio ROC é responsável pela atividade GTPase e a ligação ao GTP é essencial para a atividade quinase da proteína LRRK2 (Guo *et al.*, 2007, Ito *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* comprovam que mutações no domínio ROC, tais como p.R1441C e p.R1441G diminuem a hidrólise do GTP o que leva ao aumento da atividade quinase no domínio MAPKKK (Lewis *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008). Através do estudo da estrutura cristalográfica do dímero ROC (Deng *et al.*, 2008), foi verificado que o mecanismo pelo qual as alterações patogênicas previamente descritas no domínio ROC (p.R1441C e p.I1371V) diminuem a hidrólise do GTP é o fato delas enfraquecerem a estrutura do dímero, acarretando o prolongamento da ligação ao GTP e prejudicando sua hidrólise (Deng *et al.*, 2008). Estes dados mostram a importância de mutações localizadas no domínio ROC, uma vez que elas podem estar interferindo na hidrólise do GTP, prejudicando a função da proteína LRRK2. Além disso, estudos recentes têm investigado a atividade de autofosforilação da LRRK2, devido ao fato da fosforilação de uma ampla variedade de proteínas quinases ser um mecanismo importante para a regulação da



atividade quinase (Greggio *et al.*, 2009; Kamikawaji *et al.*, 2009; Gloeckner *et al.*, 2010). Três estudos *in vitro* detectaram que a proteína LRRK2 autofosforila vários resíduos de serina e treonina de seu próprio domínio ROC (cerca de 8 resíduos), incluindo o resíduo p.T1410, mostrando que este aminoácido pode ser importante para a regulação da LRRK2 (Greggio *et al.*, 2009; Kamikawaji *et al.*, 2009; Gloeckner *et al.*, 2010).

Com o objetivo de verificar se a variante p.T1410M pode alterar o comportamento da proteína, a análise de bioinformática foi iniciada. A estrutura cristalográfica do dímero ROC foi obtida a partir do banco de dados RCSB, entretanto, alguns aminoácidos do dímero estavam ausentes. Para completar esta estrutura a modelagem molecular foi realizada através de dois programas e os dois modelos foram construídos com sucesso. Estes modelos serão utilizados no estudo de dinâmica molecular que se encontra em andamento. Tendo em vista que a alteração p.T1410M foi identificada em amostras controles, brasileira e caribenha, e o fato de Lesage e colaboradores (2009) terem classificado esta variante como um polimorfismo, consideramos a mesma como potencialmente não patogênica. Apesar disso, devido à importância do domínio ROC, análises funcionais são necessárias para determinar se a alteração p.T1410M constitui um fator de risco para a DP ao invés de um polimorfismo não patogênico.

A última variante exônica, potencialmente não patogênica, a ser discutida é c.6566A>G (p.Y2189C). Esta alteração foi identificada em 1% dos pacientes e 1% dos controles. Através da análise de segregação desta variante na família de um dos probandos, esta variante também foi encontrada em um irmão saudável de 70 anos. Na literatura, dois estudos relataram esta alteração. O estudo realizado por Nuytemans e colaboradores (2008) identificou a p.Y2189C em um homem belga com história familiar da DP. Os autores mostraram que esta alteração possui um papel potencial na etiologia da DP, pois apesar do resíduo não ser conservado entre as espécies, a natureza aromática do aminoácido foi conservada ao longo da evolução. Além disso, a alteração p.Y2189C não foi encontrada em 278 indivíduos controles da Bélgica e sua análise *in silico* mostrou que ela é deletéria para a função da proteína (Nuytemans *et al.*, 2008). Outro estudo realizado em 92 casos familiares de DP oriundos da Tunísia (Jasinska-Myga *et al.*, 2010) detectou a p.Y2189C em dois pacientes. A alteração também estava presente em 6 membros da família não afetados, com idade variando de 29 a 71 anos, tendo sido ausente em um membro afetado. Análises posteriores aumentando a amostra de pacientes com DP detectaram a p.Y2189C em 4,8% dos casos e em 1,1% de controles, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Os autores

sugeriram que a p.Y2189C pode estar associada ao risco de desenvolver a DP (Jasinska-Myga *et al.*, 2010).

A variante p.Y2189C está localizada em uma posição não conservada entre as espécies de vertebrados analisadas, no domínio WD40. A função deste domínio na proteína LRRK2 ainda é desconhecida, no entanto, dados recentes sinalizam um possível papel para o WD40. Através de um ensaio de autofosforilação *in vitro*, formas truncadas da proteína LRRK2, com deleção do domínio WD40, exibiram diminuição na autofosforilação, indicando que este domínio também é crucial para a atividade de fosforilação (Greggio *et al.*, 2008). Outro trabalho *in vitro* mostrou que a remoção do domínio WD40 na proteína LRRK2 não só diminui a sua atividade autofosforilação como também impede a formação do complexo dimérico (Jorgensen *et al.*, 2009). *In vivo*, a deleção do WD40 na proteína LRRK2 de *Zebrafish* causa perda de neurônios e déficit de locomoção (Sheng *et al.*, 2010). Contudo, até o momento, nenhuma alteração definitivamente patogênica foi descrita neste domínio. Somente o polimorfismo p.G2385R está fortemente associado à DP, sendo considerado um fator de risco em populações asiáticas (Di Fonzo *et al.*, 2006b; Fung *et al.*, 2006; Farrer *et al.*, 2007; Funayama *et al.*, 2007; Tan, 2007; Tan *et al.*, 2007).

Nossos dados sinalizam que a variante p.Y2189C é potencialmente não patogênica. A alteração não é conservada e as análises *in silico* utilizando duas ferramentas eletrônicas indicam que a c.6566A>G não afeta a estrutura da proteína e somente o programa Pmut apontou esta alteração como patogênica. Em nosso estudo, ela foi identificada com uma frequência similar em pacientes e em controles e também um irmão normal, com idade de 70 anos, foi portador da variante. Além disso, apesar dos dois estudos descritos da literatura afirmarem que a p.Y2189C pode estar associada à DP (Nuytemans *et al.*, 2008; Jasinska-Myga *et al.*, 2010), os dados de Jasinska-Myga e colaboradores (2010) mostram que a variante não segrega com a doença nas famílias dos probandos, indicando que a alteração p.Y2189C é um provável polimorfismo não associado à DP.

As variantes intrônicas consideradas potencialmente não patogênicas são c.4317+16C>T, c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+52T>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T, c.6382-36G>A, c.6382-37C>T e c.6576+44T>C. Destas, somente a alteração c.6382-37C>T foi descrita previamente através da análise molecular em pacientes com DP, tendo sido identificada em um paciente (Paisán-Ruíz *et al.*, 2008). Entretanto, seu valor patogênico não foi discutido (Paisán-Ruíz *et al.*, 2008). As variantes c.5317+59A>C, c.5509+20A>C, c.5509+122A>G, c.5657-46C>T e c.6576+44T>C estão descritas no banco de SNPs e foram identificadas através de consórcios responsáveis por investigar variações genéticas em

diferentes grupos étnicos, como o projeto HapMap (<http://www.hapmap.org>). Entretanto, estas variantes não foram associadas a nenhum tipo de doença. As alterações c.4317+16C>T, c.5509+52T>C e c.6382-36G>A são novas. Considerando que todas estas variantes intrônicas parecem não afetar o reconhecimento dos sítios de encadeamento selvagens, segundo as análises realizadas utilizando as ferramentas SpliceView e NNSPLICE, acreditamos que estas alterações não são patogênicas.

### **Alterações não patogênicas (polimorfismos)**

Estão classificadas neste grupo, as alterações já descritas na literatura que apresentaram frequências similares entre pacientes com DP e controles da mesma população, tendo sido consideradas polimorfismos. As alterações não patogênicas identificadas neste estudo, relatadas também em diferentes populações mundiais, foram c.4193G>A (p.R1398H), c.4269G>A (p.K1423K), c.4541G>A (p.R1514Q), c.4624C>T (p.P1542S), c.4828-31T>C, c.4872C>A (p.G1624G), c.4911A>G (p.K1637K), c.4937T>C (p.M1646T), c.4939T>A (p.S1647T), c.5015+32A>G, c.5170+23T>A, c.5317+32C>T, c.5457T>C (p.G1819G), c.5948+48C>T, c.6241A>G (p.N2081D), c.6324G>A (p.E2108E) e c.6381+30A>G.

Uma descoberta interessante é o fato de uma dessas alterações, c.4193G>A (p.R1398H), ter sido associada à diminuição do risco para o desenvolvimento da DP na população chinesa, indicando que variações polimórficas no gene podem modular o risco para o desenvolvimento da DP (Tan *et al.*, 2010). O risco de indivíduos portadores das alterações p.G2385R e p.R1628P desenvolverem a doença é reduzido em aproximadamente 1,5 vezes se o indivíduo também é portador do polimorfismo p.R1398H. O estudo *in vitro* da p.R1398H comprovou que a presença desta alteração na proteína LRRK2 diminui significativamente sua atividade quinase, quando comparada à proteína selvagem, indicando que esta variante pode conferir uma função protetora para o desenvolvimento da DP (Tan *et al.*, 2010).

A **tabela 8** aponta todas as alterações identificadas neste estudo, suas classificações e as respectivas referências na literatura, mostrando os estudos em que estas alterações já foram relatadas.

**Tabela 8** - Alterações identificadas neste estudo e sua classificação.

<b>Alteração</b>	<b>Classificação</b>	<b>Referências bibliográficas<sup>a</sup></b>
c.4193G>A (p.R1398H)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Ross <i>et al.</i> , 2010; Tan <i>et al.</i> , 2010.
c.4194T>G (p.R1398R)	Potencialmente não patogênica	–
c.4229C>T (p.T1410M)	Potencialmente não patogênica	Lesage <i>et al.</i> , 2009.
c.4269G>A (p.K1423K)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Ross <i>et al.</i> , 2010; Tan <i>et al.</i> , 2010.
c.4317+16C>T	Potencialmente não patogênica	–
c.4541G>A (p.R1514Q)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Ross <i>et al.</i> , 2010; Tan <i>et al.</i> , 2010.
c.4624C>T (p.P1542S)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009.
c.4828-31T>C	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Lu <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009.
c.4872C>A (p.G1624G)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Schlitter <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Shojaee <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Ross <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010.
c.4911A>G (p.K1637K)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Schlitter <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Shojaiee <i>et al.</i> , 2009b; Wang <i>et al.</i> , 2008.
c.4937T>C (p.M1646T)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010.
c.4939T>A (p.S1647T)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Schlitter <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009; Shojaiee <i>et al.</i> , 2009b; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Tan <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010.
c.5015+32A>G	Não patogênica	Lesage <i>et al.</i> , 2009; Shojaiee <i>et al.</i> , 2009b; Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2010.
c.5170+23T>A	Não patogênica	Lu <i>et al.</i> , 2008; Shojaiee <i>et al.</i> , 2009b; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2009.

Alteração	Classificação	Referências bibliográficas <sup>a</sup>
c.5308T>C (p.C1770R)	Potencialmente patogênica	–
c.5317+32C>T	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2010.
c.5317+59A>C	Potencialmente não patogênica	–
c.5457T>C (p.G1819G)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2009.
c.5509+20A>C	Potencialmente não patogênica	–
c.5509+52T>C	Potencialmente não patogênica	–
c.5509+122A>G	Potencialmente não patogênica	–
c.5657-46C>T	Potencialmente não patogênica	–
c.5948+48C>T	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Lesage <i>et al.</i> , 2009.
c.6241A>G (p.N2081D)	Não patogênica	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Nuytemans <i>et al.</i> , 2009; Jasinska <i>et al.</i> , 2010.
c.6324G>A (p.E2108E)	Não patogênica	Mata <i>et al.</i> , 2005; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007; Nichols <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2009; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2009.
c.6381+30A>G	Não patogênica	Lesage <i>et al.</i> , 2009.
c.6382-36G>A	Potencialmente não patogênica	–
c.6382-37C>T	Potencialmente não patogênica	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008.
c.6415T>A (p.C2139S)	Potencialmente patogênica	–
c.6566A>G (p.Y2189C)	Potencialmente não patogênica	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008; Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010.
c.6576+44T>C	Potencialmente não patogênica	–

<sup>a</sup> Referências bibliográficas de estudos que identificaram as respectivas variantes em pacientes com DP e/ou indivíduos controles.

Até o momento, apenas sete mutações *missense* identificadas no gene *LRRK2* foram associadas definitivamente à DP, o que constitui apenas 11% do total das alterações exônicas identificadas neste gene (Healy *et al.*, 2008; Aasly *et al.*, 2010; Nuytemans *et al.*, 2010). Em muitos casos, uma das dificuldades em se classificar uma variante ocorre devido à falta de dados de segregação familiar, ou porque as famílias são relativamente pequenas ou devido à falta de acesso a estes familiares (Greggio & Cookson, 2009; Kumari & Tan, 2009). Do mesmo modo, na maioria das vezes, as análises funcionais da proteína mutante, *in vitro* e em modelos animais, têm sido realizadas apenas para as mutações mais frequentes e para a grande parte das alterações estes dados funcionais são ausentes.

O gene *LRRK2* é um gene grande, constituído por 51 exons. Devido a este fato, a grande maioria dos estudos restringe o teste genético aos exons 31 e 41, onde são detectadas as mutações mais frequentes (Healy *et al.*, 2008). A **tabela 9** resume os dados das principais referências que sequenciaram todo o gene ou parte do gene *LRRK2*, além dos exons 31 e 41. Como pode ser observado, estes estudos são muito diversificados quanto à seleção de pacientes, domínios de interesse ou exons de interesse. Por exemplo, alguns estudos sequenciaram 51 exons do gene em pequenas amostras formadas por apenas casos familiares, outros sequenciaram todo o gene, excluindo pacientes que já tinham a mutação p.G2019S, outros ainda, selecionaram somente os exons nos quais já tinham sido identificadas alterações patogênicas ou potencialmente patogênicas (**tabela 9**). Similar ao nosso estudo, apenas um trabalho analisou os exons relacionados aos principais domínios das proteínas (Nuytemans *et al.*, 2008) (**tabela 9**). A heterogeneidade dos estudos torna difícil a comparação das frequências de mutações identificadas em outros exons, além dos 31 e 41, entre grupos de pacientes de diferentes populações mundiais.

**Tabela 9** - Resumo de estudos que rastream alterações no gene *LRRK2* através do sequenciamento de vários exons.

Referência <sup>a</sup>	População	Regiões analisadas	Tamanho da amostra (casos: familiares e/ou esporádicos)	Número de indivíduos com variantes potencialmente patogênicas + patogênicas Total: N (%) <sup>b</sup>
Berg <i>et al.</i> , 2005	alemã	Gene inteiro	53 (familiares)	7 Total: 7 (13,2%)
Khan <i>et al.</i> , 2005	inglesa	Gene inteiro	117 (familiares)	2 + 3 (p.G2019S) Total: 5 (4,3%)
Mata <i>et al.</i> , 2005	europeus, norte americanos e asiáticos	Gene inteiro	100 (familiares)	4 + 12 (R1441C/G/H) + 3 (p.G2019S) + 1 (p.G2385R) Total: 20 (20%)
Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2005	canadense	Gene inteiro	23 (familiares)	1 + 2 (p.G2019S) Total: 3 (13%)
Skipper <i>et al.</i> , 2005	Cingapura	Exons 23-41	160 (familiares e esporádicos sem a mutação p.G2019S)	2 Total: 2 (1,3%)
Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006b	chinesa	Gene inteiro	15 (familiares e esporádicos)	2 + 2 (p.G2385R) Total: 4 (26,6%)
Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006a	50 italianos, 9 brasileiros e 1 português	Gene inteiro	60 (familiares)	1 + 4 (p.G2019S) + 2 (p.R1441C) Total: 7 (11,6%)
Schlitter <i>et al.</i> , 2006	alemã	Exons 19, 24, 25, 29, 31, 34, 35, 38 e 41	120 (familiares e esporádicos)	1 + 3 (p.G2019S) Total: 4 (3,3%)
Johnson <i>et al.</i> , 2007	norte americana	Gene inteiro	79 (familiares e esporádicos)	2 + 2 (p.G2019S) Total: 4 (5,1%)
Nichols <i>et al.</i> , 2007	norte americana	Gene inteiro	88 (familiares e esporádicos sem a mutação p.G2019S)	5 Total: 5 (5,7%)

Referência <sup>a</sup>	População	Regiões analisadas	Tamanho da amostra (casos: familiares e/ou esporádicos)	Número de indivíduos com variantes potencialmente patogênicas + patogênicas Total: N (%) <sup>b</sup>
Nuytemans <i>et al.</i> , 2008	belga	Domínios ROC e MAPKKK	304 (familiares e esporádicos)	1 + 6 (p.R1441G) Total: 7 (2,3%)
Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2008	norte americana	Gene inteiro	275 (familiares e esporádicos)	5 + 4 (p.G2019S) Total: 9 (3,3%)
Camargos <i>et al.</i> , 2009	brasileira	Gene inteiro	8 (familiares)	1 Total: 1 (12,5%)
Lesage <i>et al.</i> , 2009	francesa e norte africana	Gene inteiro	226 (familiares)	5 + 4 (p.R1441H) + 13 (p.G2019S) Total: 22 (9,7%)
Shojaee <i>et al.</i> , 2009a	iraniana	Exons 3, 7, 12, 14, 15, 16, 19, 21-25, 27, 29, 30, 32, 36, 37, 38, 40, 42, 44, 49, 50	60 (familiares e esporádicos)	4 Total: 4 (6,6%)
Shojaee <i>et al.</i> , 2009b	iraniana	Exons 31, 34, 35, 41 e 48	205 (familiares e esporádicos)	1 + 1 (p.R1441C) Total: 2 (1%)
Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010	norte africana	Gene inteiro	92 (familiares)	4 + 27 (p.G2109S) Total: 31 (33,6%)
Nuytemans <i>et al.</i> , 2010	belga	Gene inteiro (exceto os domínios ROC e MAPKKK)	310 (familiares e esporádicos)	3 Total: 3 (1%)
Wang <i>et al.</i> , 2010	chinesa	Gene inteiro	9 (familiares)	1 Total: 1 (11,1%)
Este estudo, 2010; Pimentel <i>et al.</i> , 2008, Abdalla-Carvalho <i>et al.</i> , 2010	brasileira	Domínios ROC, COR e MAPKKK	204 (familiares e esporádicos)	2 + 5 (p.G2019S) Total: 7 (3,4%) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Referências de estudos que sequenciaram vários ou todos os exons do gene *LRRK2*. <sup>b</sup>As alterações mais comumente encontradas no gene estão especificadas na linha acima entre parênteses, sendo o total das alterações colocado em vermelho na última linha de cada célula, com a respectiva frequência entre parênteses. <sup>c</sup>Os 5 pacientes de nossa amostra com a mutação p.G2109S foram relatados em dois artigos publicados por nosso grupo (**anexos D e E**).



Nesta tese, os exons 31 e 41 não foram incluídos. Entretanto, a análise destes exons em nossa amostra está relatada em dois artigos publicados por nosso grupo e a mutação p.G2019S foi identificada em um total de 5 probandos (2 casos familiares e 3 esporádicos) (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010 - **anexos D e E**). Além destas, foi possível detectar neste estudo duas alterações potencialmente patogênicas em dois casos familiares (p.C1770R e p.C2130S). Estes resultados somam uma frequência total de alterações patogênicas ou potencialmente patogênicas de 3,4%, sendo estas alterações mais prevalentes em casos familiares (11,1%) do que esporádicos (1,8%). Contudo, esta frequência pode ser ainda maior, pois não podemos excluir a possibilidade de encontrarmos mutações nos outros exons do gene e em regiões 5' e 3' não traduzidas. O estudo mais similar ao nosso (Nuytemans *et al.*, 2008), analisou os domínios ROC e MAPKKK, tendo encontrado uma frequência de 2,3% de indivíduos com mutações patogênicas ou potencialmente patogênicas (**tabela 9**).

No Brasil, poucos estudos do gene *LRRK2* foram realizados até o momento. Camargos e colaboradores (2009) sequenciaram o gene inteiro em 8 casos familiares de DP e identificaram uma mutação provavelmente patogênica (p.Q923H). Barsottini e colaboradores (2009) analisaram 119 brasileiros com DP familiar ou esporádica apenas para algumas alterações no gene (p.L1114L, p.I1122V, p.R1441C, p.Y1699C e p.G2019S), tendo encontrado ~2% dos pacientes com a mutação p.G2019S. Outro estudo selecionou pacientes com DP precoce, tendo detectado a alteração p.G2019S em 3,6% dos pacientes (Munhoz *et al.*, 2008).

Similar aos nossos dados, a maioria dos estudos (**tabela 9**) indica que as mutações p.G2019S ou p.R1441C/G/H são mais frequentes em relação aos outros tipos de alterações encontradas, reforçando a importância de se rastrear prioritariamente os exons 31 e 41, antes do restante do gene. Da mesma forma, os estudos de triagem mutacional devem ser estendidos para as análises dos principais domínios da proteína (ROC, COR e MAPKKK) onde todas as mutações definitivamente patogênicas foram identificadas (Di fonzo *et al.*, 2006; Paisán-Ruíz e colaboradores, 2008). Entretanto, como não há evidências de mutações definitivamente patogênicas na porção N-terminal da proteína, a análise desta região proteica não deve ser prioridade (Paisán-Ruíz *et al.*, 2008).

A **tabela 10** compara a frequência de mutações nos principais genes associados à DP. Dos 16 *loci* conhecidos associados à DP, amplas evidências de associação com a DP são consideradas para 5 genes principais (Nuytemans *et al.*, 2010) (**tabela 10**). Destes, o gene *LRRK2* é o mais frequentemente mutado em casos de DP esporádica e familiar de

manifestação tardia, constituindo a forma mais comum da DP (Nuytemans *et al.*, 2010). Nossos resultados revelam uma frequência muito similar (11,1% de mutações nos casos familiares e 1,8% nos casos esporádicos) à frequência média identificada na população mundial (>10% de mutações nos casos familiares e 2% nos casos esporádicos) (**tabela 10**), excluindo indivíduos com DP judeus Ashkenasi e árabes africanos, onde esta frequência é muito maior.

Os resultados detectados no presente estudo revelam que mutações no gene *LRRK2* desempenham um papel significativo como fator genético para o desenvolvimento da DP em pacientes brasileiros.

**Tabela 10** - Frequência de mutações nos principais genes associados à DP.

Genes*	Modo de herança	Idade de manifestação da DP	Frequência
<i>SNCA</i>	Autossômica dominante	Precoce 38-65 anos 24-48 anos	2% (casos familiares)
<i>PRKN</i>	Autossômica recessiva	Precoce ~30 anos	10-20%
<i>PINK1</i>	Autossômica recessiva	Precoce 20-40 anos	1-7%
<i>DJI</i>	Autossômica recessiva	Precoce 20-40 anos	<1%
<i>LRRK2</i>	Autossômica dominante	Tardia	>10% (casos familiares) e 2% (casos esporádicos)  30% (casos familiares) e 10-40% (casos esporádicos) em árabes africanos e judeus Ashkenasi

\**SNCA*,  $\alpha$ -synuclein; *PRKN*, Parkin; *PINK1*, *PTEN*-induced putative kinase 1; *DJI*, oncogene *DJI*; *LRRK2*, leucine-rich repeat kinase 2 (Belin & Westerlund, 2008; Lesage & Brice, 2009; Wider *et al.*, 2010 - com modificações).

As pesquisas genéticas em indivíduos com DP são importantes, pois possibilitam um diagnóstico mais eficiente em pacientes com DP, aumentam o entendimento dos mecanismos patogênicos associados à doença e permitem a identificação de potenciais genes moduladores da doença através de estudos de ligação dentro das famílias. Além disso, a identificação de indivíduos portadores pré-sintomáticos possibilita pesquisas relacionadas a intervenções que poderiam diminuir o progresso da doença e identificar biomarcadores de neurodegeneração (Thaler *et al.*, 2009).

Embora não exista ainda uma terapia neuroprotetora para pacientes com mutações no gene *LRRK2*, uma perspectiva de intervenção terapêutica para estes indivíduos seria a modulação farmacológica da atividade quinase da *LRRK2* (Bonifati, 2007). Um recente estudo *in vitro*, verificou a atividade de fosforilação da *LRRK2* na presença de 84 inibidores da atividade quinase, tendo sido possível identificar 8 inibidores potencialmente eficazes (Lee *et al.*, 2010). Experimentos *in vivo* mostraram que os mesmos inibidores foram capazes de atenuar a perda de neurônios em camundongos mutados para a p.G2019S. Estes resultados comprovam que a degeneração causada pela *LRRK2 in vivo* é dependente do aumento da atividade de fosforilação e mostram que a inibição farmacológica da atividade quinase da *LRRK2* providencia um potencial alvo terapêutico para o tratamento da neurodegeneração em pacientes com DP (Lee *et al.*, 2010).

Com isso, a identificação de alterações no gene *LRRK2* e a distinção entre variantes benignas, mutações patogênicas ou fatores de risco são essenciais para estimar corretamente a frequência de mutações associadas à DP e melhorar nosso entendimento sobre o papel patológico de mutações no *LRRK2*, crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ A análise molecular dos exons que codificam os domínios ROC, COR, MAPKKK e a parte inicial do WD40 (exceto os exons 31 e 41) da proteína LRRK2 revelou duas alterações potencialmente patogênicas, nunca descritas na literatura, identificadas em dois pacientes. A mutação c.5308T>C (p.C1770R) está localizada no domínio COR e a alteração c.6415T>A (p.C2139S) está localizada entre os domínios MAPKKK e WD40.
  
- ✓ A mutação patogênica p.G2019S que foi descrita previamente em 5 pacientes de nossa amostra (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010), somada as duas variantes potencialmente patogênicas identificadas neste estudo, totaliza uma frequência de 3,4% de alterações potencialmente patogênicas ou patogênicas no gene *LRRK2* encontradas em pacientes com DP brasileiros. A frequência nos casos familiares (11,1%) foi cerca de seis vezes maior do que a encontrada nos casos isolados da DP (1,8%).
  
- ✓ Os resultados detectados neste estudo revelam que mutações no gene *LRRK2* desempenham um papel significativo como fator genético para o desenvolvimento da DP em pacientes brasileiros.

## REFERÊNCIAS

- Aasly JO, Toft M, Fernandez-Mata I, *et al.* Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway. **Ann Neurol** 2005; 57: 762-765.
- Aasly JO, Vilariño-Güell C, Dachsel JC, *et al.* Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. **Mov Disord** 2010; 25: 2156-2163.
- Abdalla-Carvalho CB, Santos-Rebouças CB, Guimarães BC, *et al.* Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease. **Eur J Neurol** 2010; 17: 1479-1481.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods** 2010; 7: 248-249.
- Alegre-Abarrategui J, Ansorge O, Esiri M, *et al.* LRRK2 is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2008; 34: 272-283.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, *et al.* **J Neurol** 2008; 255 Suppl 5: 18-32.
- Andrade LAF, Barbosa ER, Cardoso F, Teive HAG. Doença de Parkinson, estratégias atuais de tratamento. 1ª ed. São Paulo: Omnifarma; 2010.
- Autere JM, Moilanen JS, Myllylä VV, *et al.* Familial aggregation of Parkinson's disease in a Finnish population. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2000; 69:107-109.
- Bardien S, Marsberg A, Keyser R, *et al.* LRRK2 G2019S mutation: frequency and haplotype data in South African Parkinson's disease patients. **J Neural Transm** 2010; 117: 847-853.
- Barsottini OG, Felício AC, Aguiar Pde C, *et al.* Clinical and molecular neuroimaging characteristics of Brazilian patients with Parkinson's disease and mutations in PARK2 or PARK8 genes. **Arq Neuropsiquiatr** 2009; 67: 7-11
- Belin AC, Westerlund M. Parkinson's disease: a genetic perspective. **FEBS J** 2008; 275: 1377-1383.
- Berg D, Schweitzer K, Leitner P, *et al.* Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. **Brain** 2005; 128: 3000-3011.
- Berger Z, Smith KA, Lavoie MJ. Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. **Biochemistry** 2010;49: 5511-5523.
- Bialecka M, Hui S, Klodowska-Duda G, *et al.* Analysis of LRRK 2 G 2019 S and I 2020 T mutations in Parkinson's disease. **Neurosci Lett** 2005; 390: 1-3.

Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, *et al.* Genes associated with Parkinson syndrome. **J Neurol** 2008; 255 Suppl 5:8-17.

Biskup S, West AB. Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1792: 625-633..

BLAST. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.expasy.org/tools/blast/>.

BLASTP. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>.

Bonifati V. LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-linking familial and sporadic Parkinson's disease. **Neurochem Res** 2007; 32: 1700-1708.

Bras JM, Guerreiro RJ, Ribeiro MH, *et al.* G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort. **Mov Disord** 2005; 20: 1653-1655.

Camargos ST, Dornas LO, Momeni P, *et al.* Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: phenotypic characterization and frequency of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations. **Mov Disord** 2009; 24: 662-666.

Carmine BA, Westerlund M, Sydow O, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) mutations in a Swedish Parkinson cohort and a healthy nonagenarian. **Mov Disord** 2006; 21: 1731-1734.

Chen-Plotkin AS, Yuan W, Anderson C, *et al.* Corticobasal syndrome and primary progressive aphasia as manifestations of LRRK2 gene mutations. **Neurology** 2008; 70: 521-527.

Civitelli D, Tarantino P, Nicoletti G, *et al.* LRRK2 G6055A mutation in Italian patients with familial or sporadic Parkinson's disease. **Clin Genet** 2007; 71: 367-370.

Clarimón J, Pagonabarraga J, Paisán-Ruiz C, *et al.* Tremor dominant parkinsonism: Clinical description and LRRK2 mutation screening. **Mov Disord** 2008; 23: 518-523.

ClustalW. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>.

Chang TY, Kuo HC, Lu CS, *et al.* Analysis of the LRRK2 Gly2385Arg variant in Alzheimer's disease in Taiwan. **Parkinsonism Relat Disord** 2010; 16: 28-30.

Dächsel JC, Farrer MJ. LRRK2 and Parkinson disease. **Arch Neurol** 2010a; 67: 542-547.

Dächsel JC, Mata IF, Ross OA, *et al.* Digenic parkinsonism: investigation of the synergistic effects of PRKN and LRRK2. **Neurosci Lett** 2006; 410: 80-84.

Dächsel JC, Nishioka K, Vilariño-Güell C, *et al.* Heterodimerization of Lrrk1-Lrrk2: Implications for LRRK2-associated Parkinson disease. **Mech Ageing Dev** 2010b; 131: 210-214.

Dauer W, Ho CC. The biology and pathology of the familial Parkinson's disease protein LRRK2. **Mov Disord** 2010; 25 Suppl 1:S40-43.

Deng H, Le W, Guo Y, *et al.* Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with LRRK2 G2019S mutation. **Ann Neurol** 2005; 57: 933-934.

Deng J, Lewis PA, Greggio E, *et al.* Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105: 1499-1504.

Di Fonzo A, Roché CF, Ferreira J, *et al.* A frequent *LRRK2* gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. **Lancet** 2005; 365: 410-412.

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

Di Fonzo A, Wu-Chou YH, Lu CS, *et al.* A common missense variant in the *LRRK2* gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. **Neurogenetics** 2006b; 7: 133-138.

Dodson MW, Guo M. Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Curr Opin Neurobiol** 2007; 17: 331-337.

Duvoisin RC. Role of genetics in the cause of Parkinson's disease. **Mov Disord** 1998; 13 Suppl 1: 7-12.

Ensembl Genome Browser. [Acesso em setembro de 2010]. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>.

ExPASy Proteomics Server. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.expasy.ch/>.

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

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

Farrer MJ, Stone JT, Lin CH, *et al.* *Lrrk2* G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia. **Parkinsonism Relat Disord** 2007; 13: 89-92.

Farrer M, Stone J, Mata IF, *et al.* *LRRK2* mutations in Parkinson disease. **Neurology** 2005; 65: 738-740.

Ferreira JJ, Guedes LC, Rosa MM, *et al.* High prevalence of *LRRK2* mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal. **Mov Disord** 2007; 22: 1194-1201.

Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, *et al.* PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. **Bioinformatics** 2005; 21: 3176-3178.

- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 1996; 55: 259-272.
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, *et al.* A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. **Ann Neurol** 2002; 51: 296-301.
- Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, *et al.* An *LRRK2* mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. **Ann Neurol** 2005; 57: 918-921.
- Funayama M, Li Y, Tomiyama H, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. **Neuroreport** 2007; 18: 273-275.
- Fung HC, Chen CM, Hardy J, *et al.* A common genetic factor for Parkinson disease in ethnic Chinese population in Taiwan. **BMC Neurol** 2006; 6: 47.
- Gaig C, Ezquerra M, Martí MJ, *et al.* LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. **Arch Neurol** 2006; 63: 377-382.
- Gaig C, Martí MJ, Ezquerra M, *et al.* G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2007; 78: 626-8.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, *et al.* PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. **Mol Cell** 2009; 13: 627-638.
- Gandhi PN, Wang X, Zhu X, *et al.* The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules. **J Neurosci Res** 2008; 86: 1711-1720.
- Garber K. Parkinson's disease and cancer: the unexplored connection. **J Natl Cancer Inst** 2010; 102: 371-374.
- Giasson BI, Van Deerlin VM. Mutations in LRRK2 as a cause of Parkinson's disease. **Neurosignals** 2008; 16: 99-105.
- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, *et al.* A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. **Lancet** 2005; 365: 415-416.
- Gloeckner CJ, Boldt K, von Zweyendorf F, *et al.* Phosphopeptide analysis reveals two discrete clusters of phosphorylation in the N-terminus and the Roc domain of the Parkinson-disease associated protein kinase LRRK2. **J Proteome Res** 2010; 9: 1738-1745.
- Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, *et al.* The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. **Hum Mol Genet** 2006; 15: 223-232.
- Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ, *et al.* The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. **J Med Genet** 2005; 42: e65.



Goldwurm S, Zini M, Di Fonzo A, *et al.* LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: a clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample. **Parkinsonism Relat Disord** 2006; 12: 410-419.

Goldwurm S, Zini M, Mariani L, *et al.* Evaluation of LRRK2 G2019S penetrance: relevance for genetic counseling in Parkinson disease. **Neurology** 2007; 68: 1141-1143.

Gomez A, Ferrer I. Involvement of the cerebral cortex in Parkinson disease linked with G2019S LRRK2 mutation without cognitive impairment. **Acta Neuropathol** 2010; 120: 155-167.

Greggio E, Cookson MR. Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions. **ASN Neuro** 2009; 1. pii: e00002.

Greggio E, Jain S, Kingsbury A, *et al.* Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. **Neurobiol Dis** 2006; 23: 329-341.

Greggio E, Taymans JM, Zhen EY, *et al.* The Parkinson's disease kinase LRRK2 autophosphorylates its GTPase domain at multiple sites. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 389: 449-454.

Greggio E, Zambrano I, Kaganovich A, *et al.* The Parkinson's disease associated Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intra-molecular autophosphorylation. **J Biol Chem** 2008; 283:16906-16914.

GROMACS. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.gromacs.org/>.

Guo L, Gandhi PN, Wang W, *et al.* The Parkinson's disease-associated protein, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), is an authentic GTPase that stimulates kinase activity. **Exp Cell Res** 2007; 313: 3658-3670.

Guo L, Wang W, Chen SG. Leucine-rich repeat kinase 2: relevance to Parkinson's disease. **Int J Biochem Cell Biol** 2006; 38: 1469-1475.

Häbig K, Walter M, Poths S, *et al.* RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. **Neurogenetics** 2008; 9: 83-94.

Hardy J. No definitive evidence for a rule for environment in the etiology of Parkinson's disease. **Mov Disord** 2006; 21:1790-1791.

Hassin-Baer S, Laitman Y, Azizi E, *et al.* The leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) G2019S substitution mutation. Association with Parkinson disease, malignant melanoma and prevalence in ethnic groups in Israel. **J Neurol** 2009; 256: 483-487.

Hatano T, Kubo S, Imai S, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. **Hum Mol Genet** 2007; 16: 678-690.

Haubenberger D, Bonelli S, Hotzy C, *et al.* A novel LRRK2 mutation in an Austrian cohort of patients with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2007; 22: 1640-1643.

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

Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nat Clin Pract Neurol** 2008; 4: 600-609.

Hernandez D, Paisan Ruiz C, Crawley A, *et al.* The dardarin G 2019 S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative diseases. **Neurosci Lett** 2005; 389: 137-139.

Hernandez DG, Paisán-Ruíz C, McInerney-Leo A, *et al.* Clinical and positron emission tomography of Parkinson's disease caused by *LRRK2*. **Ann Neurol** 2005; 57: 453-456.

Huang Y, Halliday GM, Vandebona H, *et al.* Prevalence and clinical features of common LRRK2 mutations in Australians with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2007; 22: 982-989.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. **Annu Rev Biochem** 2000; 69: 373-398.

Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, *et al.* What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. **Neurology** 2001; 57: 34-38.

IBGE. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>.

Illarioshkin SN, Shadrina MI, Slominsky PA *et al.* A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. **Eur J Neurol** 2007; 14: 413-417.

Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, *et al.* Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. **EMBO J** 2008; 27: 2432-2443.

Infante J, Rodríguez E, Combarros O, *et al.* LRRK2 G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. **Neurosci Lett** 2006; 395: 224-226.

Ishihara L, Warren L, Gibson R, *et al.* Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. **Arch Neurol** 2006; 63: 1250-1254

Ito G, Okai T, Fujino G, *et al.* GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. **Biochemistry** 2007; 46:1380-1388.

Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, *et al.* LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. **Biochem J** 2007; 405: 307-317.

Jasinska-Myga B, Kachergus J, Vilariño-Güell C, *et al.* Comprehensive sequencing of the LRRK2 gene in patients with familial Parkinson's disease from North Africa. **Mov Disord** 2010; 25: 2052-2058.

Johnson J, Paisán-Ruíz C, Lopez G, *et al.* Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for LRRK2 mutation. **Neurodegener Dis** 2007; 4: 386-391.

Jorgensen ND, Peng Y, Ho CC, *et al.* The WD40 domain is required for LRRK2 neurotoxicity. **PLoS One** 2009; 4: e8463

Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, *et al.* Identification of a novel *LRRK2* mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: Evidence of a common founder across European populations. **Am J Hum Genet** 2005; 76: 672-680.

Kamikawaji S, Ito G, Iwatsubo T. Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2. **Biochemistry** 2009; 48: 10963-10975.

Kay DM, Zabetian CP, Factor SA, *et al.* Parkinson's disease and LRRK2: frequency of a common mutation in U.S. movement disorder clinics. **Mov Disord** 2006; 21: 519-523.

Khan NL, Jain S, Lynch JM, *et al.* Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. **Brain** 2005; 128: 2786-2796.

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Curr Opin Struct Biol** 2001; 11: 725-732.

Krüger R, Eberhardt O, Riess O, *et al.* Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? **Trends Mol Med** 2002; 8: 236-240.

Kumari U, Tan EK. LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. **FEBS J** 2009; 276: 6455-6463.

Lee E, Hui S, Ho G, *et al.* LRRK2 G2019S and I2020T mutations are not common in Alzheimer's disease and vascular dementia. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 2006; 141B: 549-550.

Lee BD, Shin JH, VanKampen J, *et al.* Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease. **Nat Med** 2010; 16: 998-1000.

Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Hum Mol Genet** 2009; 18: R48-59.

Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, *et al.* Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. **J Med Genet** 2009; 46: 458-464.

Lesage S, Dürr A, Brice A. LRRK2: a link between familial and sporadic Parkinson's disease? **Pathol Biol** 2007a; 55: 107-110.

Lesage S, Dürr A, Brice A. LRRK2 is a major gene in North African parkinsonism. **Med Sci (Paris)** 2006; 22: 470-471.

- Lesage S, Ibanez P, Lohmann E, *et al.* G2019S *LRRK2* mutation in French and North African families with Parkinson's disease. **Ann Neurol** 2005; 58: 784-787.
- Lesage S, Janin S, Lohmann E, *et al.* *LRRK2* exon 41 mutations in sporadic Parkinson disease in Europeans. **Arch Neurol** 2007b; 64: 425-430.
- Lewis PA, Greggio E, Beilina A, *et al.* The R1441C mutation of *LRRK2* disrupts GTP hydrolysis. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 357: 668-671.
- Li X, Tan YC, Poulouse S, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*)/*PARK8* possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. **J Neurochem** 2007; 103: 238-247.
- Lin TK, Liou CW, Chen SD, *et al.* Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Chang Gung Med J** 2009; 32: 589-599.
- Liu Z, Wang X, Yu Y, *et al.* A *Drosophila* model for *LRRK2*-linked parkinsonism. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105: 2693-2698.
- Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, *et al.* The *LRRK2* I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 2005; 11: 521-522.
- Lu CS, Wu-Chou YH, Van Doeselaar M, *et al.* The *LRRK2* Arg1628Pro variant is a risk factor for Parkinson's disease in the Chinese population. **Neurogenetics** 2008; 9: 271-276.
- Lu YW, Tan EK. Molecular biology changes associated with *LRRK2* mutations in Parkinson's disease. **J Neurosci Res** 2008; 86: 1895-1901.
- Luzón-Toro B, Rubio de la Torre E, Delgado A, *et al.* Mechanistic insight into the dominant mode of the Parkinson's disease-associated G2019S *LRRK2* mutation. **Hum Mol Genet** 2007; 16: 2031-2039.
- Macedo MG, Verbaan D, Fang Y, *et al.* Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease. **Mov Disord** 2009; 24: 196-203.
- MacLeod D, Dowman J, Hammond R, *et al.* The familial Parkinsonism gene *LRRK2* regulates neurite process morphology. **Neuron** 2006; 52: 587-593.
- Marongiu R, Ghezzi D, Ialongo T, *et al.* Frequency and phenotypes of *LRRK2* G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2006; 21: 1232-1235.
- Mata IF, Cosentino C, Marca V, *et al.* *LRRK2* mutations in patients with Parkinson's disease from Peru and Uruguay. **Parkinsonism Relat Disord** 2009; 15: 370-373.
- Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, *et al.* *Lrrk2* pathogenic substitutions in Parkinson's disease. **Neurogenetics** 2005; 6: 171-177.
- Mata IF, Ross OA, Kachergus J, *et al.* *LRRK2* mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. **Eur J Neurol** 2006a; 13: 391-394.

Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, *et al.* LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. **Trends Neurosci** 2006b; 25: 286-93.

Miklossy J, Arai T, Guo JP, *et al.* LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65: 953-963.

Modeller 9v7. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://salilab.org/modeller/>.

Moore DJ. The biology and pathobiology of LRRK2: implications for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 2008; 14 Suppl 2:S92-8.

Munhoz RP, Wakutani Y, Marras C, *et al.* The G2019S LRRK2 mutation in Brazilian patients with Parkinson's disease: phenotype in monozygotic twins. **Mov Disord** 2008; 23: 290-294

Mutez E, Larvor L, Leprêtre F, *et al.* Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation. **Neurobiol Aging** 2010; 21. [Epub ahead of print]

Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acids Research** 2003;31: 3812-3814.

Nichols WC, Elsaesser VE, Pankratz N, *et al.* LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8. **Neurology** 2007; 69: 1737-1744.

Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, *et al.* Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. **Lancet** 2005; 365: 410-412.

NNSPLICE. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, *et al.* Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. **Hum Mutat** 2009; 30: 1054-1061.

Nuytemans K, Rademakers R, Theuns J, *et al.* Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. **Eur J Hum Genet** 2008; 16: 471-479.

Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. **Hum Mutat** 2010; 31: 763-780.

Okubadejo N, Britton A, Crews C, *et al.* Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3. **PLoS One** 2008; 3: e3421.

Olsen JH, Friis S, Frederiksen K, *et al.* Atypical cancer pattern in patients with Parkinson's disease. **Br J Cancer** 2005; 92: 201-205.

Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. **N Engl J Med** 2006; 354: 424-425.

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

Paisán-Ruíz C, Lang AE, Kawarai T, *et al.* LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. **Neurology** 2005; 65: 696-700.

Paisán-Ruíz C, Nath P, Washecka N, *et al.* Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. **Hum Mutat** 2008; 29: 485-490.

PDmutDB. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB/>.

Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, *et al.* Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. **JAMA** 1997; 278: 1237-1241.

Pchelina SN, Yakimovskii AF, Emelyanov AK, *et al.* Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. **Eur J Neurol** 2008; 15: 692-696.

Pchelina SN, Yakimovskii AF, Ivanova ON, *et al.* G2019S LRRK2 mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. **Mov Disord** 2006; 21: 2234-2236.

Perez-Pastene C, Cobb SA, Díaz-Grez F, *et al.* Lrrk2 mutations in South America: A study of Chilean Parkinson's disease. **Neurosci Lett** 2007; 422: 193-197.

Pimentel MM, Moura KC, Abdalla CB, *et al.* A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. **Neurosci Lett** 2008; 433: 17-21.

Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu YJ, *et al.* Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. **J Neurochem** 2008; 105: 1048-1056.

PMut. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>.

PolyPhen-2. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

Pulkes T, Papsing C, Mahasirimongkol S, *et al.* Frequencies of LRRK2 variants in Thai patients with Parkinson's disease: evidence for an R1628P founder. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2010; 22. [Epub ahead of print].

Punia S, Behari M, Govindappa ST, *et al.* Absence/rarity of commonly reported LRRK2 mutations in Indian Parkinson's disease patients. **Neurosci Lett** 2006; 409: 83-88.

Qing H, Wong W, McGeer EG, *et al.* Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 387: 149-52.

Ross OA, Wilhoite GJ, Bacon JA, *et al.* LRRK2 variation and Parkinson's disease in African Americans. **Mov Disord** 2010; 25: 1973-1976.

Ross OA, Wu YR, Lee MC, *et al.* Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. **Ann Neurol** 2008; 64: 88-92.

Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Ibañez B, *et al.* Penetrance in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). **Mov Disord** 2010 30; 25: 2340-2345.

Saunders-Pullman R, Barrett MJ, Stanley KM, *et al.* LRRK2 G2019S mutations are associated with an increased cancer risk in Parkinson disease. **Mov Disord** 2010; 25: 2536-2541.

Sancho RM, Law BM, Harvey K. Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signalling pathways. **Hum Mol Genet** 2009; 18: 3955-3968.

Santos-Rebouças CB, Abdalla CB, Baldi FJ, *et al.* Co-occurrence of sporadic parkinsonism and late-onset Alzheimer's disease in a Brazilian male with the LRRK2 p.G2019S mutation. **Genet Test** 2008; 12: 471-473.

Santos-Rebouças CB, Abdalla CB, Martins PA, *et al.* LRRK2 p.G2019S mutation is not common among Alzheimer's disease patients in Brazil. **Dis Markers** 2009; 27: 13-16.

Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, *et al.* Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. **Nat Genet** 2009; 41: 1303-1307.

Seol W. Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. **BMB Rep** 2010; 43: 233-244.

Schlitter AM, Woitalla D, Mueller T, *et al.* The LRRK2 gene in Parkinson's disease: mutation screening in patients from Germany. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2006; 77: 891-892.

Schulz JB. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurol** 2008; 255 Suppl 5:3-7.

Sheng D, Qu D, Kwok KH, *et al.* Deletion of the WD40 domain of LRRK2 in Zebrafish causes Parkinsonism-like loss of neurons and locomotive defect. **PLoS Genet** 2010; 6: e1000914.

Shin N, Jeong H, Kwon J, *et al.* LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. **Exp Cell Res** 2008; 314: 2055-2065.

Shojaee S, Fazlali Z, Ghazavi F, *et al.* Identification of four novel potentially Parkinson's disease associated LRRK2 variations among Iranian patients. **Neurosci Lett** 2009a; 467: 53-57.

Shojaee S, Sina F, Farboodi N, *et al.* A clinic-based screening of mutations in exons 31, 34, 35, 41, and 48 of LRRK2 in Iranian Parkinson's disease patients. **Mov Disord** 2009b; 24: 1023-1027.

SIFT. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.

- Simón-Sánchez J, Martí-Massó JF, Sánchez-Mut JV, *et al.* Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. **Mov Disord** 2006; 21: 1954-1959.
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, *et al.* Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. **Nat Genet** 2009; 41: 1308-1312.
- Skipper L, Shen H, Chua E, Bonnard C, *et al.* Analysis of LRRK2 functional domains in nondominant Parkinson disease. **Neurology** 2005; 65: 1319-1321.
- Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. **Annu Rev Pathol** 2006; 1: 151-170.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends Biochem Sci** 1999; 24: 181-185.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102: 18676-18681.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, *et al.* Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. **Nat Neurosci** 2006; 9:1231-1233.
- SNP database. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
- SpliceView. [Acesso em novembro de 2010]. Disponível em: “<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>”.
- Squillaro T, Cambi F, Ciacci G, *et al.* Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in Italian patients affected by Parkinson's disease. **J Hum Genet** 2007; 52: 201-204.
- Structural Analysis and Verification Server. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>.
- SWISS-MODEL. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://swissmodel.expasy.org/>.
- Swiss-Pdb Viewer 4.0.1. [Acesso em setembro de 2010]. Disponível em: <http://spdbv.vital-it.ch/>.
- Tan EK. The role of common genetic risk variants in Parkinson disease. **Clin Genet** 2007; 72: 387-393.
- Tan EK, Lee J, Chen CP, *et al.* Case control analysis of LRRK2 Gly2385Arg in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2009; 30: 501-502
- Tan EK, Peng R, Teo YY, *et al.* Multiple LRRK2 variants modulate risk of Parkinson disease: a Chinese multicenter study. **Hum Mutat** 2010; 31: 561-568.



Tan EK, Shen H, Tan LC, *et al.* The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. **Neurosci Lett** 2005; 384: 327-329.

Tan EK, Tan LC, Lim HQ, *et al.* LRRK2 R1628P increases risk of Parkinson's disease: replication evidence. **Hum Genet** 2008; 124: 287-288.

Tan EK, Zhao Y, Skipper L, *et al.* The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. **Hum Genet** 2007; 120: 857-863.

Tanner CM, Aston DA. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. **Curr Opin Neurol** 2000; 13: 427-420.

Tedde A, Bagnoli S, Cellini E, *et al.* No association between the LRRK2 G2019S mutation and Alzheimer's disease in Italy. **Cell Mol Neurobiol** 2007; 27: 877-881.

Tewari R, Bailes E, Bunting KA, *et al.* Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. **Trends Cell Biol** 2010; 20: 470-481.

Thaler A, Ash E, Gan-Or Z, *et al.* The LRRK2 G2019S mutation as the cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. **J Neural Transm** 2009; 116: 1473-1482.

Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. **Hum Mol Genet** 2007; 16: R183-R194.

Toft M, Sando SB, Melquist S, Ross OA, *et al.* LRRK2 mutations are not common in Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev** 2005; 126: 1201-1205

Tong Y, Pisani A, Martella G, *et al.* R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106: 14622-14627.

Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, *et al.* Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107: 9879-9884.

UniProtKB. [Acesso em agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>.

Venderova K, Kabbach G, Abdel-Messih E, *et al.* Leucine-Rich Repeat Kinase 2 interacts with Parkin, DJ-1 and PINK-1 in a Drosophila melanogaster model of Parkinson's disease. **Hum Mol Genet** 2009; 18: 4390-4404.

Wang L, Guo JF, Nie LL, *et al.* A novel LRRK2 mutation in a mainland Chinese patient with familial Parkinson's disease. **Neurosci Lett** 2010; 468: 198-201.

Wang L, Xie C, Greggio E, *et al.* The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine-rich repeat kinase 2. **J Neurosci** 2008; 28: 3384-3391.

West AB, Moore DJ, Biskup S, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102: 16842-16847.

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

Wider C, Foroud T, Wszolek ZK. Clinical implications of gene discovery in Parkinson's disease and parkinsonism. **Mov Disord** 2010; 25 Suppl 1:S15-20.

Williams-Gray CH, Goris A, Foltynie T, *et al.* Prevalence of the LRRK2 G2019S mutation in a UK community based idiopathic Parkinson's disease cohort. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2006; 77: 665-667.

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

Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Gourbali V, *et al.* Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants. **Eur J Neurol** 2007; 14: 7-11.

Xiong Y, Coombes CE, Kilaru A, *et al.* GTPase activity plays a key role in the pathobiology of LRRK2. **PLoS Genet** 2010; 6: e1000902.

Yescas P, López M, Monroy N, *et al.* Low frequency of common LRRK2 mutations in Mexican patients with Parkinson's disease. **Neurosci Lett** 2010; 485: 79-82.

Zabetian CP, Lauricella CJ, Tsuang DW, *et al.* Analysis of the LRRK2 G2019S mutation in Alzheimer Disease. **Arch Neurol** 2006; 63: 156-157.

Zabetian CP, Morino H, Ujike H, *et al.* Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. **Neurology** 2006; 67: 697-699.

Zabetian CP, Samii A, Mosley AD, *et al.* A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. **Neurology** 2005; 65: 741-744.

Zhao Y, Ho P, Yih Y, *et al.* LRRK2 variant associated with Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 2009; 15. [Epub ahead of print]

Zhu X, Siedlak SL, Smith MA, *et al.* LRRK2 protein is a component of Lewy bodies. **Ann Neurol** 2006; 60: 617-618.

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

## ANEXO A – Termo de consentimento dos pacientes



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Departamento de Biologia Celular e Genética  
Serviço de Genética Humana

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do Projeto: O papel do gene *LRRK2* na etiologia da Doença de Parkinson

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisadores: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (coordenador); Cíntia Barros Santos-Rebouças; João Santos Pereira; Ana Lúcia Zuma de Rosso; José Marcelo Ferreira Bezerra; Denise Hack Nicaretta; Izabel Cristina Constantino Bastos.

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_ PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "O papel do gene *LRRK2* na etiologia da Doença de Parkinson", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações neste gene em pacientes com doença de Parkinson e determinar a frequência dessas mutações que podem estar relacionadas à causa da doença.

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

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

Os exames para pesquisar defeitos no gene *LRRK2* serão gratuitos e serão realizados a partir de uma única amostra de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao paciente, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou hematomas. Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de Biólogos tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O DNA extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao paciente o direito de retirá-lo do banco de DNA, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

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

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

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do paciente \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:  
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 500  
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013  
Tel: (021) 2334-0039 / 2334-0499- Fax (021) 2334-0309  
Email: pimentel@uerj.br  
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas  
Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3020, bloco E, 3o andar, Maracanã - Rio de Janeiro, RJ, e-mail: etica@uerj.br

## ANEXO B – Termo de consentimento da amostra controle



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

## TERMO DE CONSENTIMENTO DA AMOSTRA CONTROLE

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

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

NOME DO PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_

REGISTRO SERGEN: \_\_\_\_\_ PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do participante \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

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

## ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UERJ


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

Página 1 de 1

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

**PARECER COEP 043/2008**

A Comissão de Ética em Pesquisa – COEP, em sua 2ª Reunião Ordinária realizada em 10 de março de 2007, analisou o adendo ao protocolo de pesquisa nº. **0004.1.2006**, segundo as normas éticas vigentes no país para pesquisa envolvendo sujeitos humanos e emite seu parecer.

**PROJETO DE PESQUISA:** “O papel do gene LRRK2 na etiologia da doença de Parkinson”.  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Márcia Mattos Gonçalves Pimentel.  
**INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL:** Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes - UERJ  
**Área Temática Especial:** Grupo I. 1 Genética Humana  
**Área do Conhecimento:** 2.02. Genética  
**Termos-chave:** Doença de Parkinson; LRRK2; dardarina.

A pesquisadora, conforme a solicitação de adendo apresentada à apreciação pretende, no presente, a extensão do projeto anteriormente aprovado no sentido de incluir a testagem de mais outros genes (mutação), que podem estar associados à patogênese de distúrbios neurodegenerativos. Para o estudo, será utilizado material já coletado e armazenado sob a guarda da pesquisadora responsável, após consentimento dos sujeitos de pesquisa (pacientes).

Após análise e discussão a COEP deliberou pela **aprovação** do adendo supracitado.

Faz-se necessário apresentar **Relatório Anual** - previsto para **setembro de 2009**, para cumprir o disposto no item *VII.13.d da Res.º 196/96/CNS*. Além disso, a COEP deverá ser informada de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.

**Situação: Adendo Aprovado**

Rio de Janeiro, 16 de Setembro de 2008.

  
 Prof. Dr. Olinto Pegoraro  
 Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa - UERJ

*Olinto Pegoraro*  
 Coordenador  
 Comissão de Ética em Pesquisa - UERJ



## ANEXO D – A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil

Author's personal copy

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Neuroscience Letters 433 (2008) 17–21

Neuroscience  
Letters[www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)A study of *LRRK2* mutations and Parkinson's disease in Brazil

Márcia Mattos Gonçalves Pimentel<sup>a,\*</sup>, Karla Cristina Vasconcelos Moura<sup>a</sup>,  
Cláudia Bueno Abdalla<sup>a</sup>, João Santos Pereira<sup>b</sup>, Ana Lúcia Zuma de Rosso<sup>c</sup>,  
Denise Hack Nicaretta<sup>b,d</sup>, Mário Campos Junior<sup>a</sup>, Richard Moraes de Almeida<sup>a</sup>,  
Jussara Mendonça dos Santos<sup>a</sup>, Izabel Cristina Constantino Bastos<sup>e</sup>,  
Maria Filomena Xavier Mendes<sup>e</sup>, Henryk Maultasch<sup>c</sup>, Flavio Henrique de Rezende Costa<sup>c</sup>,  
Antônio Luiz dos Santos Werneck<sup>c</sup>, Cíntia Barros Santos-Rebouças<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Genética Humana, Departamento de Biologia Celular e Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHC – sala 500, Maracanã 20550-013, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> Instituto de Neurologia Deslézelo Couto, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Received 22 October 2007; received in revised form 12 December 2007; accepted 14 December 2007

## Abstract

Mutations in the *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* gene are known as a common cause of Parkinson's disease (PD) among patients from different geographic origins. In this study, we evaluated the prevalence of *LRRK2* mutations in exons 31 and 41 in a cohort of 154 consecutive, unrelated Brazilian patients with familial or sporadic PD, including early and late onset patients. The *LRRK2* p.G2019S mutation was present in heterozygous state in three index cases (~2%), and in three additional relatives. No carriers of this mutation were found among 250 control chromosomes. Clinically, all mutation-positive patients presented a typical PD phenotype and a good response to levodopa. Mutation segregation analysis in a large sibship showed incomplete penetrance of the p.G2019S. Our findings suggest that the *LRRK2* p.G2019S mutation has a substantial contribution to PD susceptibility among Brazilian population and add new clues to current research of this disease.  
© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Parkinson's disease; Leucine-rich repeat kinase 2; *LRRK2*; p.G2019S mutation; Dardarin

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative movement disorder characterized by bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability [25]. Its pathological features include selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the presence of intracellular inclusions (Lewy bodies) in the surviving neurons [28].

Although the causes of PD remain mostly unknown, current evidences shows that mitochondrial dysfunction, oxidative stress and protein mishandling have a central role in PD pathogenesis, and also reinforce that important genetic factors are associated to pathological processes underlying the disease [1]. The study of monogenic forms of PD has given an

important contribution to the understanding of the molecular pathways associated to neurodegeneration, and has also provided novel therapeutic targets [2,9,26]. PD-related mutations were identified in *α-synuclein (SNCA)* [36], *parkin* [22], *DJ-1* [3], *PTEN-induced kinase 1 (PINK1)* [38] and *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* [32,41] genes. Dominant single mutations in the *LRRK2* gene are associated with parkinsonism that is clinically indistinguishable from typical, idiopathic late-onset PD [6,7,12,32,37,41].

*LRRK2* mutations as cause of PD are frequent and spread through different populations. However, the prevalence of *LRRK2* missense mutations identified in familial and sporadic cases varies greatly between distinct populations, and some of them (p.R1441C, p.R1441G, p.L2012T, p.G2019S, p.L2020T), encoded by exons 31 and 41, account for a number of PD cases [7,27,32,41]. Among these pathogenic amino-acid substitutions,

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 25673567; fax: +55 21 25673377.  
E-mail address: [pimentel@serj.br](mailto:pimentel@serj.br) (M.M.G. Pimentel).

## ANEXO D – A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil

18

M.M.G. Pinheiro et al. / *Neuroscience Letters* 433 (2008) 17–21

the p.G2019S, resulting from c.6055G>A transition, is particularly a common cause of the disease in patient cohorts of different ethnic origins [37]. The LRRK2 p.G2019S mutation is an important genetic determinant of PD among Arab patients from North Africa [23,24], Ashkenazi Jews [31], Europeans [6,12,15] and North Americans [21,29]. Current evidence indicates Iberian populations from Portugal [4,10] and Spain [19] among those with the highest prevalence of the p.G2019S mutation worldwide (overall prevalence 2.2–7.6%), after the North African Arabs (39%) [23,24] and Ashkenazi Jews (18.3%) [31]. An extensive study using genetic markers confirmed the founder event of p.G2019S mutation and showed that the genetic and demographic processes that have shaped the current distribution of p.G2019S across the world are more complex than previously recognized [39].

The LRRK2 gene encodes a complex protein with multiple domains, also known as dardarin [32,41], whose biological function is unknown, but there is evidence that it is cytoplasmic, associated with mitochondria, and capable of autophosphorylation [13]. It is not clear how mutations in dardarin lead to neurodegeneration, however, evidence demonstrates toxic effects of mutant protein when expressed within target cells, leading to formation of intraneuronal protein aggregations and cell death [17].

It is clearly established that LRRK2 mutations cause PD in many geographical areas and ethnic groups, and that their prevalence in familial and sporadic cases varies greatly across nations. In this sense, data about the frequency of LRRK2 mutations in Latin America countries are scarce [34], and in Brazil the prevalence of these mutations remained undefined until now. Brazilian population, as a whole, is formed by extensive admixture, resulting from interethnic crosses between Europeans, Amerindians and Africans, and, among European ancestry, Portugal remained by far the most important source, followed by Italy, Spain, and Germany [33,35]. In this study, we looked for mutations in exons 41 and 31 of LRRK2 gene among Brazilian PD patients.

We screened 154 consecutive, unrelated patients with PD (100 males and 54 females), ranging from 33 to 86 years (mean  $62.6 \pm 11.1$  years). Sixty-six percent of them had typical late onset PD ( $\geq 50$  years) and the remaining expressed the disease before 50 years (early onset); the mean age at onset was  $54.0 \pm 11.7$  years (range 14–83). Excepted for seven Portuguese index cases (4.5%), all patients were Brazilian. All probands live in the urban area of Rio de Janeiro, located in Southeastern Brazil, and were recruited from the movement disorders clinics of four major institutions of Rio de Janeiro State (Pedro Ernesto University Hospital, Clementino Fraga Filho University Hospital, Deolindo Couto Neurology Institute and Santa Casa de Misericórdia). The patients were examined by neurologists specialized in movement disorders, through the use of a standard protocol, and fulfilled criteria established for the clinical diagnosis of PD [18]. Cases of secondary and atypical parkinsonism were excluded from the study. Family history and ethnic background data were collected. Amongst patients, 23 (15%) self-reported a family history of PD (mean age:  $62.9 \pm 10.0$  years/mean age onset:  $54.5 \pm 10.2$ , range 37–73 years) and 131 (85%) were sporadic cases (mean age:  $62.6 \pm 11.3$  years/mean

age onset:  $54.0 \pm 12.0$ , range 14–83 years). The proband's families were mostly of mixed ancestry ( $n=136$ ), Portuguese ( $n=12$ ), Italian ( $n=3$ ), Spanish ( $n=1$ ), Polish ( $n=1$ ) and Swiss descent ( $n=1$ ). The research protocol was approved by the institutional ethics committees, and written informed consent was obtained from all subjects.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using standard procedures, and exons 31 and 41 of the LRRK2 gene were amplified by PCR according to Di Fonzo et al. [6]. Purified amplicons were sequenced in both directions using Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) and resolved on an ABI 3730 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions.

Among the studied PD probands (male to female ratio 1.9:1.0), we identified three heterozygous carriers (PD1306, PD1398 and PD1455) of the p.G2019S mutation (1.95%), including 2 familial and 1 sporadic case. Homozygous-p.G2019S individuals were not detected. For comparative purposes, this mutation was screened and not found between 250 control chromosomes from healthy Brazilian volunteers from the same population (25 males and 100 females), aged from 51 to 84 years (mean  $64.0 \pm 7.9$  years), without PD signs or any other neurodegenerative disorder, and no family history of parkinsonism among first- and second-degree relatives. No mutations along LRRK2 exon 31 were seen.

The clinical features of the three p.G2019S-positive index cases are summarized in the table (Table 1). All are Brazilian and exhibited typical signs of PD classical form, with onset ages ranging from 47 to 55 years. The symptoms at onset were asymmetrical in all cases, and, in two of them, bradykinesia was the first symptom at onset, whereas rigidity was seen in the third. Autonomic dysfunction and cognitive or psychiatric disturbances were not observed, and all presented a good therapeutic response to levodopa. Their clinical symptoms were indistinguishable from the remaining LRRK2 mutations-

Table 1  
Clinical features summary of the three Brazilian PD index cases with heterozygous LRRK2 p.G2019S mutation

Features	Patient		
	PD1306	PD1398	PD1455
Family history for PD	+	–	+
Consanguinity	–	–	–
Sex	M	F	M
Ethnic origin	Brazilian	Brazilian	Brazilian
Ancestry	Mixed	Mixed	Mixed
Age at examination (years)	65	67	57
Age at onset (years)	55	53	47
Bradykinesia	+	First symptom	First symptom
Resting tremor	+	+	+
Rigidity	First symptom	+	+
Postural instability	+	+	+
Asymmetry at onset	+	+	+
Dystonia	–	–	–
Behavioral abnormalities	–	–	–
Levodopa response	+	+	+
Cognitive decline	–	–	–

Sex is specified as male (M) or female (F).

## ANEXO D – A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil

M.M.G. Plimmet et al. / *Neuroscience Letters* 433 (2008) 17–21

19

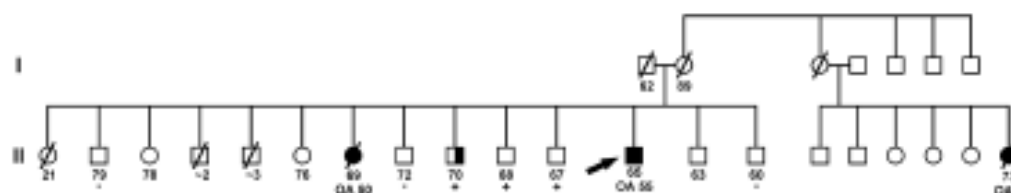


Fig. 1. Pedigree of family PD1306 with p.G2019S mutation. Full black symbols: individuals affected by Parkinson's disease. Half solid square: individual with signs of parkinsonism. Numbers below symbols denote age at examination or age of death (years); OA, onset age (years); (+) carriers of p.G2019S mutation; (–) individuals without p.G2019S mutation.

negative group, as observed in other studies [10,12,15,20,21]. The patient PD1398 is a sporadic case. Her father died at age of 71 years and her mother has 83 years, both without signs of parkinsonism. All five proband's siblings are healthy individuals. Two patients (PD1455 and PD1306) have a positive family history for PD. The individual PD1455 expressed the early-onset form of the disease and his died mother also had PD, but detailed information is unavailable. Concerning family PD1306 (see Fig. 1), relatives reports revealed that proband's parents (I.1 and I.2) died at ages of 62 and 89 years without any symptoms of the disease and that one proband's sister (subject II.7) exhibited symptoms consistent with PD during 19 years before her death at 69 years. Segregation analysis of p.G2019S was performed in six available proband's siblings (II.2, II.8, II.9, II.10, II.11, II.14) and the mutation was found in a heterozygous state in three of them (II.9, II.10 and II.11). On clinical evaluation, the subject II.9 (70 years) showed signs of parkinsonism (resting tremor and bradykinesia, both with asymmetrical onset) and subjects II.10 and II.11 (68 and 67 years) remain asymptomatic, even having 13 and 12 years beyond the proband's age at onset. Based on these findings, it is likely that the sister of patient PD1306 (subject II.7) also carried the p.G2019S mutation, although phenocopies have previously been detected in families with *LRRK2* mutations [7,29,41].

Two mutation carriers of family PD1306 (subjects II.10 and II.11, aged 68 and 67 years) have not manifested clinical signs of parkinsonism, but they are still at risk of developing PD, considering that none of them had reached the maximum age of onset. The presence of p.G2019S in asymptomatic at-risk persons should be interpreted with caution and the PD risk assessment for mutation carriers is currently difficult, because of incomplete penetrance of *LRRK2* mutations and variability of onset ages, both within and between families [11]. Several studies report p.G2019S carriers over 73 years of age with no sign of parkinsonism [16,20,23]. Kachergus et al. [20] found two *LRRK2* G2019S carriers in a same family who presented PD initial symptoms at 39 and 78 years. Reduced age-associated penetrance and phenotype variability are characteristics of several PD susceptibility genes, including *LRRK2* mutations [2,6,20,23], which suggest the existence of a complex interaction between genetic and/or environmental factors in the disease manifestation. Recent estimates of the lifetime penetrance of the p.G2019S mutation yielded values between 24 and 33% [5,16,31]. In the present study, molecular investigation of some at-risk members from family PD1306 suggests a penetrance of 60% (3/5), but this esti-

mative should be refined based on the analysis of other members in the pedigrees.

Our findings represent significant data about *LRRK2* mutations screening conducted in a representative series of Brazilian PD patients and increase the knowledge of *LRRK2* p.G2019S mutation prevalence in Latin American population [34]. We have shown that this mutation is present in an overall frequency of ~2%, being more prevalent amongst PD familial than sporadic cases (8.7% vs. 0.76%). This prevalence is three times lower than that found among Portuguese PD patients (~6%) [4,10]. Therefore, despite Brazilian population has a hallmark Portuguese ancestry, our findings are more consistent with those reported in large patient series from Italy (1.7% overall; 4.2% familial; 1% sporadic) [15] and United States (1.3% overall; 3% familial; 0.7% sporadic) [21]. Our results are also similar to those found in Chilean population (3%) [34].

Brazil is a populous nation of Latin America and one of the most heterogeneous populations in the world, as supported by studies using ancestry-informative markers [35]. It is expected that the number of Brazilian individuals with PD will double over the next 25 years [8]. Using a screening strategy focused on two hot spots for *LRRK2* mutations, we have identified the p.G2019S mutation in a significant proportion of unrelated PD patients from Southeastern Brazil. The absence of other mutations in exons 31 and 41 of the *LRRK2* gene indicates that these mutations are not so prevalent than p.G2019S in our sample, which corroborates data from other studies [14,41]. However, we could not completely exclude the possibility that the patients carry other mutations, because molecular analysis was not carried out in whole *LRRK2* gene. Recently, Nichols et al. [30] performed a comprehensive study in a cohort of 430 PD families without the p.G2019S mutation and identified novel, potentially pathogenic variants in *LRRK2*, including two in the N-terminal region of gene, where no pathogenic substitutions have been reported.

It must be emphasized that, in countries of continental size, such as Brazil, the population genetic background differ among distinct regions [33,40], being the most pronounced levels of admixture observed in the Southeastern region [33]. By this way, additional studies of the entire gene on larger patient series from other regions of our country are needed to verify the geographical dispersion of p.G2019S and other tendencies. In conclusion, our data point that *LRRK2* p.G2019S has a substantial contribution to PD susceptibility among Brazilian population, and add news clues to PD current research.



## ANEXO D – A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil

20

M.M.G. Ponsedel et al. / Neuroscience Letters 433 (2008) 17–21

## Acknowledgments

We thank the patients, their families and healthy volunteers. We also thank Dr. Vincenzo Bonifati for helpful communication concerning the PCR procedures and Débora Torres Valença for technical assistance. We are also grateful to the "Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA/PDTS-FIOCRUZ" for the aid with the automatic sequencing system. This study was supported by grants from PPSUS-MS/CNPq/FAPERJ (E-26/171.560/2006), CAPES and CEPUEJ.

## References

- [1] P.M. Abou-Sleiman, M.M. Muqit, N.W. Wood, Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *Mol. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 207–219.
- [2] V. Bonifati, LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)—Linking familial and sporadic Parkinson's disease, *Neurochem. Res.* 32 (2007) 1700–1708.
- [3] V. Bonifati, P. Rizzi, M.J. van Baren, G. Schap, G.J. Brosveldt, E. Krüger, M.C.J. Dekker, F. Squitieri, P. Baner, M. Jansen, J.W. van Dongen, N. Vanacore, J.C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C.M. van Duijn, H.A. Oostra, P. Huzarlik, Mutation in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, *Science* 299 (2002) 256–259.
- [4] J.M. Bica, R.J. Guerreiro, M.H. Ribeiro, C. Januario, A. Morgadinho, C.R. Oliveira, L. Chatur, J. Hardy, A. Singleton, G2019S dantarin substitution in a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort, *Mov. Disord.* 20 (2005) 1653–1655.
- [5] L.N. Clark, Y. Wang, H. Karlinz, L. Naito, H. Mehta-Santana, J. Harris, H.D. Louis, L.J. Cole, H. Andrews, S. Iida, C. Walker, H. Ford, S. Frucht, R. Ottman, K. Marler, Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease, *Neurology* 67 (2006) 1796–1791.
- [6] A. Di Fonzo, C.F. Rohe, J. Ferreira, H.P. Chien, L. Vacca, P. Stocchi, L. Gasio, H. Fabrizio, M. Manfredi, N. Vanacore, S. Goldsworn, G. Brosveldt, C. Sampaio, G. Meco, H. Barbosa, H.A. Oostra, V. Bonifati, Italian Parkinson genetics network, a frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease, *Lancet* 365 (2005) 410–412.
- [7] A. Di Fonzo, C. Tassorelli, M. De Mari, H.P. Chien, J. Ferreira, C.F. Rohe, G. Bisoldiani, A. Antonini, G. Albani, A. Mauro, R. Marconi, G. Abbuzese, L. Lopiano, H. Piccini, M. Galati, P. Marini, P. Stocchi, M. Onofri, V. Tosi, M. Tizabi, G. Fabrizio, P. Lamberti, N. Vanacore, G. Meco, P. Laitner, R.J. Inft, Z.K. Wozniak, T. Gasser, E.J. Simons, G.J. Brosveldt, S. Goldsworn, G. Pizzoli, C. Sampaio, H. Barbosa, H. Mar-Higson, H.A. Oostra, V. Bonifati, Italian Parkinson's genetics network, comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease, *Hum. J. Hum. Genet.* 14 (2006) 322–331.
- [8] R.R. Dorsey, R. Constantinescu, J.P. Thompson, K.M. Higgins, R.G. Holloway, K. Kieburtz, P.J. Marshall, B.M. Ravina, G. Schiavo, A. Siderowf, C.M. Tanner, Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, *Neurology* 68 (2007) 384–386.
- [9] M.J. Farrer, Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects, *Mol. Rev. Genet.* 7 (2006) 306–318.
- [10] J.J. Ferreira, L.C. Gasio, M.M. Rosa, M. Cositto, M. van Doornhuysen, D. Schweiger, A. Di Fonzo, H.A. Oostra, C. Sampaio, V. Bonifati, High prevalence of LRRK2 mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal, *Mov. Disord.* 22 (2007) 1194–1201.
- [11] T. Ponsedel, LRRK2: both a cause and a risk factor for Parkinson disease? *Neurology* 65 (2005) 664–665.
- [12] W.P. Gilks, P.M. Abou-Sleiman, S. Gaudin, S. Jain, A. Singleton, A.J. Lees, K. Shaw, K.P. Bhalla, V. Bonifati, N.P. Quinn, J. Lynch, D.G. Healy, J.L. Holton, T. Revez, N.W. Wood, A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease, *Lancet* 365 (2005) 415–416.
- [13] C.J. Glessner, N. Kinki, A. Schumacher, R.J. Beans, E. O'Neil, T. Meitinger, W. Kolch, H. Prokisch, M. Ueffing, The Parkinson disease causing LRRK2 mutation G2031T is associated with increased kinase activity, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 229–232.
- [14] S. Goldsworn, A. Di Fonzo, E.J. Simons, C.F. Rohe, M. Zini, M. Casati, S. Tosi, A. Zecchinelli, A. Antonini, C. Mariani, N. Menecci, G. Sacchetto, P. Sironi, G. Salani, J. Ferreira, H.P. Chien, E. Fabrizio, N. Vanacore, A. Dalla Libera, P. Stocchi, C. Diroma, P. Lamberti, C. Sampaio, G. Meco, H. Barbosa, A.M. Bortoli-Avella, G.J. Brosveldt, H.A. Oostra, G. Pizzoli, V. Bonifati, The G6095A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor, *J. Mol. Genet.* 42 (2005) of5.
- [15] S. Goldsworn, M. Zini, A. Di Fonzo, D. De Gaspari, C. Siri, E.J. Simons, M. van Doornhuysen, S. Tosi, A. Antonini, M. Casati, A. Zecchinelli, C. Mariani, N. Menecci, G. Sacchetto, E. Chiu, L.U. Iannicelli, A. Borselli, P. Sironi, S. Ricca, H.A. Oostra, V. Bonifati, G. Pizzoli, LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: a clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample, Parkinsonism and Related Disorders, Parkinsonism Relat. Disord. 12 (2006) 410–419.
- [16] S. Goldsworn, M. Zini, L. Mariani, S. Tosi, R. Miceli, P. Sironi, M. Clementi, V. Bonifati, G. Pizzoli, Evaluation of LRRK2 G2019S penetrance: relevance of genetic counseling in Parkinson disease, *Neurology* 14 (2007) 1141–1143.
- [17] E. Greggio, S. Jain, A. Kingsbury, R. Handpathy, P. Lewis, A. Kaganovich, M.P. van der Brug, A. Bellina, J. Hackmitson, K.J. Thomas, R. Ahmad, D.W. Miller, S. Koushappany, A. Singleton, A. Lees, R.J. Harvey, K. Harvey, M.R. Cookson, Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/midactin, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 329–341.
- [18] A.J. Hughes, Y. Ben-Shlomo, S.H. Daniel, A.J. Lees, What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study, 1992, *Neurology* 57 (2001) 534–538.
- [19] J. Infante, R. Rodriguez, O. Combarros, I. Mateo, A. Postalua, J. Pascual, A. Ocharin, J.M. Polo, C. Laine, J. Hernandez, LRRK2 G2019S in a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 395 (2006) 224–226.
- [20] J. Kachergus, J.P. Mata, M. Hallinan, J.P. Taylor, S. Lincoln, J. Aasly, J.M. Gibson, G.A. Ross, T. Lynch, J. Wiley, H. Payant, J. Nutt, D.M. Mangano, K. Croyewski, M. Styczynska, Z.K. Wozniak, M.J. Farrer, M. Toff, Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 672–680.
- [21] D.M. Kay, C.P. Zabetian, S.A. Factor, J.G. Nutt, A. Sardi, A. Griffith, T.D. Bird, P. Kramer, D.S. Higgins, H. Payant, Parkinson's disease and LRRK2: frequency of a common mutation in U.S. movement disorder clinics, *Mov. Disord.* 21 (2006) 319–323.
- [22] T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Mizushima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature* 392 (1998) 605–608.
- [23] S. Lesage, P. Hannez, E. Lohmann, P. Pollak, F. Tauxe, M. Thir, A.L. Leutenegger, J. Guimaraes, A.M. Bonnet, Y. Agid, A. Dart, A. Brice, French Parkinson's Disease Genetics Study Group, G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 58 (2005) 764–767.
- [24] S. Lesage, A. Dart, M. Thir, E. Lohmann, A.L. Leutenegger, S. Janin, P. Pollak, A. Brice, LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 422–423.
- [25] I. Litvan, K.P. Bhalla, D.J. Burn, C.G. Goetz, A.H. Lang, I. McKeith, N. Quinn, K.D. Sethi, C. Shults, G.K. Wenning, Movement Disorders Society Scientific Issues Committee, Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders, *Mov. Disord.* 18 (2003) 467–486.
- [26] J.P. Mata, J.M. Kachergus, J.P. Taylor, S. Lincoln, J. Aasly, T. Lynch, M.M. Hallinan, S.A. Cobb, R.M. Wu, C.S. Lu, C. Latzer, Z.K. Wozniak, M.J. Farrer, Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease, *Neurogenetics* 6 (2005) 171–177.
- [27] J.P. Mata, J.P. Taylor, J. Kachergus, H. Hallinan, C. Huzria, C. Latzer, M. Hanzquez, L.M. Galanosa, C. Salvador, E. Ribacoba, C. Marini, M. Farrer, V. Alvarez, LRRK2 R1441G in Spanish patients with Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 392 (2005) 309–311.

## ANEXO D – A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil

M.M.G. Pinheiro et al. / *Neuroscience Letters* 433 (2008) 17–21

21

- [28] D.J. Moore, A.B. West, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Molecular pathophysiology of Parkinson's disease, *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 57–87.
- [29] W.C. Nichols, N. Pankratz, D. Hernandez, C. Paisan-Ruiz, S. Jain, C.A. Haiker, V.E. Michaels, T. Reed, A. Radolph, C.W. Shults, A. Singleton, T. Foroud, Parkinson Study Group—PGENE Investigators, Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease, *Lancet* 365 (2005) 410–412.
- [30] W.C. Nichols, V.H. Hsuangser, N. Pankratz, M.W. Pasichis, D.K. Marek, C.A. Haiker, A. Radolph, C.W. Shults, T. Foroud, Parkinson Study Group—PGENE Investigators, LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK3, *Neurology* (2007) (Epub ahead of print).
- [31] L.J. Ozelius, G. Senthil, R. Saunders-Pullman, E. Obermann, A. Deligdisch, M. Tagliai, A.L. Hsui, C. Klein, B. Henick, S.M. Haltiwanger, R.H. Lipton, J. Solo-Valencia, N. Risch, S.B. Hrossman, LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 424–425.
- [32] C. Paisan-Ruiz, S. Jain, H.W. Ivan, W.P. Gilks, J. Simon, M. van der Brug, A. Lopez de Munain, S. Aparicio, A.M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J.R. Martinez, D. Nichol, I.M. Carrera, A.S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J.P. Marti-Masso, J. Perez-Tur, N.W. Wood, A.B. Singleton, Cloning of the gene containing mutations that cause PARK3-linked Parkinson's disease, *Neuron* 44 (2004) 595–600.
- [33] F.C. Pena, R.C. Amado, J.R. Lamberti, J. Rocha, C.M. Antunes, S.D. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 177–182.
- [34] C. Perez-Pardue, S.A. Cobb, H. Diaz-Gerez, M.M. Hulihan, M. Miranda, P. Vasegas, O.T. Gooley, J.M. Kachergas, O.A. Ross, L. Layton, M.J. Farrer, J. Segura-Aguilar, Lrrk2 mutations in South America: a study of Chilean Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 422 (2007) 193–197.
- [35] J.R. Pinheiro, L.W. Zaccarato, A.A. Debon, L. Maselli, R.P. Soares, R.S. Moura-Nieto, J. Rocha, S.P. Bydlowski, S.D.J. Pena, Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites, *Hum. Hered.* 62 (2006) 190–195.
- [36] M.H. Polymenopoulos, C. Lawden, E. Lacey, S.H. Ide, A. Dehejia, A. Deira, H. Pike, H. Root, J. Rabenstein, R. Broyer, H.S. Shiroon, S. Chandrasekharappa, A. Athanaziadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvelain, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276 (1997) 2045–2047.
- [37] H. Taniyama, Y. Li, M. Panayama, K. Hasegawa, H. Yoshino, S. Kubo, K. Sato, T. Hattori, C.S. Lu, R. Israelberg, R. Djaldetti, H. Melamed, R. Aronov, N. Gouider-Khouja, P. Hentati, Y. Hatano, M. Wang, Y. Imamichi, K. Mizoguchi, H. Miyajima, P. Ohata, T. Toda, M.J. Farrer, Y. Mizuno, N. Hattori, Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries, *Mov. Disord.* 21 (2006) 1100–1108.
- [38] H.M. Valente, P.M. Abo-Seleman, V. Caputo, M.M. Magli, K. Harvey, S. Gilbert, Z. Ali, D. Del Turco, A.R. Bentivoglio, D.G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Sabat, P. Cortelli, W.P. Gilks, D.S. Leachman, R.J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger, N.W. Wood, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science* 304 (2004) 1158–1160.
- [39] C.P. Zabetian, C.M. Hutter, D. Youret, A.N. Lopez, S.A. Factor, A. Griffith, B.C. Loix, T.D. Bird, J.G. Nall, D.S. Higgins, J.W. Roberts, D.M. Kay, K.L. Edwards, A. Samii, H. Payant, LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the middle east: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 752–758.
- [40] V.M. Zembranski, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Haiz, Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population, *Ann. Hum. Genet.* 70 (2006) 822–828.
- [41] A. Zimprich, S. Biskup, P. Lichtner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergas, M. Hulihan, R.J. Uitti, D.B. Calne, A.J. Slesos, R.P. Woffler, N. Paige, L.C. Carhajal, P. Viregge, P. Auras, H. Muller-Meybach, D.W. Dickson, T. Meitinger, T.M. Strom, Z.K. Wozniak, T. Gasser, Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleocentric pathology, *Neuron* 44 (2004) 601–607.

## ANEXO E – Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease.

European Journal of Neurology 2010, 17: 1479–1481

doi:10.1111/j.1468-1331.2010.02628.x

### SHORT COMMUNICATION

## Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease

C. B. Abdalla-Carvalho<sup>a</sup>, C. B. Santos-Rebouças<sup>a</sup>, B. C. Guimarães<sup>a</sup>, M. Campos<sup>a</sup>, J. S. Pereira<sup>b</sup>, A. L. Zuma de Rosaf, D. H. Nicaretta<sup>b,c,d</sup>, M. Marinho e Silva<sup>a</sup>, J. Mendonça dos Santos<sup>a</sup> and M. M. G. Pimentel<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Serviço de Genética Humana, Departamento de Genética, IRRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; <sup>b</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; <sup>c</sup>Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; and <sup>d</sup>Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**Keywords:**  
LRRK2, MAPKKK,  
Parkinson's disease, ROC

Received 6 January 2010  
Accepted 9 March 2010

**Background and purpose:** Mutations in the *leucine-rich repeat kinase 2* gene (*LRRK2*) have been associated with Parkinson's disease (PD), and the majority of the pathogenic variants are located in the ROC and MAPKKK domains.

**Methods:** Exons 29–31 and 38–44 (ROC and MAPKKK domains) were sequenced in 204 patients with PD, mostly Brazilian.

**Results:** We identified four polymorphisms, a novel silent variant p.R1398R and four substitutions: p.T1410M, p.G2019S, p.Y2189C and the novel variant p.C2139S.

**Conclusions:** The most prevalent mutation was the p.G2019S (2.4%). We consider that the p.T1410M and the p.Y2189C variants are probably polymorphisms and that the p.C2139S mutation is potentially pathogenic.

### Introduction

The *leucine-rich repeat kinase 2* gene (*LRRK2*) has a recognized role in the etiology of Parkinson's disease (PD) [1]. This gene encodes a protein with GTPase and kinase activities (ROC and MAPKKK domains) and several protein-protein interaction motifs [1]. The majority of the pathogenic *LRRK2* mutations are most frequently observed in the ROC and MAPKKK domains [2].

In a previous report, we looked for mutations in exons 31 and 41 of *LRRK2* in 154 Brazilian patients with PD [3]. In this work, we screened the remaining exons that encode ROC and MAPKKK domains. Also, we studied 50 additional patients to provide new data about the contribution of the *LRRK2* mutations in the PD.

### Methods

We recruited 204 patients with PD (132 men and 72 women; 197 Brazilian and 7 Portuguese; mean age  $62.0 \pm 11.9$  years; mean age at onset  $53.4 \pm 12.5$  years) and 210 Brazilian controls (mean age  $65.4 \pm 8.9$  years).

Correspondence: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel, PhD, Serviço de Genética Humana, Departamento de Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC – sala 500, Maracanã, Rio de Janeiro 20550-013, Brazil (tel.: +55 21 23340039; fax: +55 21 23340309; e-mail: pimentel@uerj.br).

The Ethics Committee of State University of Rio de Janeiro approved this study, and a written informed consent was obtained from subjects.

Exons 29–31 (ROC domain) and 38–44 (MAPKKK and part of the WD40 domain) were sequenced using primers previously described [4]. The controls were screened using either sequencing (for the p.C2139S and p.Y2189C) or a restriction digest assay (*Hga*I) (for the p.T1410M substitution). The ClustalW software was used to align the homologous proteins. The effect of mutations in the protein was predicted using PolyPhen and Pmut programs (see details of the methodology in Data S1).

### Results

We identified seven intronic variants (Table S1) and four non-pathogenic polymorphisms (p.K1423K, p.E2108E, p.R1398H and p.N2081D) (Table 1). The novel silent variant (p.R1398R) was found in two patients, and four substitutions, p.T1410M, p.G2019S, p.Y2189C and the novel variant p.C2139S, were identified in nine heterozygous probands (Table 1). We identified a patient (PD1455) with two substitutions, the p.T1410M and the p.G2019S, as previously described [3]. However, his phenotype was indistinguishable from patients with idiopathic PD and was not more severe than that seen in patients with a single *LRRK2* mutation, previously reported [5].

## ANEXO E – Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease.

1480 C. B. Abdalla-Carvalho *et al.*

Table 1 Summary of *LRRK2* gene exonic variations detected in this study

Nucleotide change <sup>a</sup>	Protein change	Position	Domain	Accession number <sup>b</sup>	Frequency N (%) <sup>c</sup>	Reference
c.4193G > A	p.R1398H	Exon 30	ROC	nt133914	25 (12.2)	[6]
c.4194T > G	p.R1398R	Exon 30	ROC	nt188992967	2 (1.0)	Novel
c.4229C > T	p.T1410M	Exon 30	ROC	nt2546327	4 (1.9)/1 (0.5) <sup>d</sup>	[6]
c.4269G > A	p.K1423K	Exon 30	ROC	nt1175964	19 (9.3)	[6]
c.6055G > A	p.G2019S	Exon 41	MAPEKKK	nt4637584	5 (2.4) <sup>e</sup>	[6]
c.6241A > G	p.N2081D	Exon 42	MAPEKKK	nt3399583	3 (1.5)	[6]
c.6324G > A	p.E2108E	Exon 43	MAPEKKK	nt0879405	71 (34.8)	[6]
c.6415T > A	p.C2139S	Exon 44	–	nt83992955	1 (0.5)/0 (0) <sup>d</sup>	Novel
c.6566A > G	p.Y2189C	Exon 44	WD40	nt5658131	2 (1.0)/2 (1.0) <sup>d</sup>	[6]

<sup>a</sup>The nucleotide numbers are according to the *LRRK2* cDNA sequence deposited in Genbank (accession number AY792511); <sup>b</sup>Accession number is given for each known *LRRK2* polymorphism; <sup>c</sup>Frequency represents number of variants identified in PD cases; <sup>d</sup>Frequency in 210 healthy controls; <sup>e</sup>Three patients with the p.G2019S mutation were described in our previous paper [3].

Table 2 Clinical features of patients with *LRRK2* missense mutations

Features	Patients									
	PD1455	PD1728	PD1732	PD2038	PD1646	PD2101	PD2043	PD1319	PD1493	
Mutation	p.T1410M/p.G2019S	p.T1410M	p.T1410M	p.T1410M	p.G2019S	p.G2019S	p.C2139S	p.Y2189C	p.Y2189C	
Family history for PD	+	+	–	–	–	–	+	+	–	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	M	M	
Origin	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Brazilian	Portuguese	Brazilian	
Age at onset (years)	47	55	83	47	45	33	68	50	62	
Age at examination (years)	57	70	87	55	47	40	71	64	74	
First symptom	Bradykinesia	NA	NA	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	
Bradykinesia	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	
Resting tremor	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	
Rigidity	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	
Postural instability	+	NA	NA	–	–	–	–	–	+	
Asymmetry at onset	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	
Dystonia	–	NA	NA	–	–	–	–	–	–	
Levodopa response	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	
Cognitive decline	–	NA	NA	–	–	–	–	–	–	

M, male; F, female; NA, information not available; +, present; –, absent.

Clinical features of the patients are summarized in Table 2. In the PD1493 family, segregation analysis was performed in two unaffected brothers and the p.Y2189C mutation was found in a 70-year-old brother.

The analysis of controls showed that the p.T1410M substitution was found in an 83-year-old woman and that the p.Y2189C was present in two women (53 and 81 years). However, the p.C2139S variation was absent in controls. The p.T1410M and p.C2139S substitutions affect positions highly conserved, and the p.Y2189 residue exhibits medium conservation (Figure S1). The programs PolyPhen and Pmut predicted that the three *LRRK2* variants can affect the protein function or structure.

### Discussion

In our study, we identified four non-pathogenic polymorphisms, a silent variant p.R1398R and four

substitutions. The p.R1398R affects the same position of another non-pathogenic polymorphism (p.R1398H), suggesting that the p.R1398R variant is probably not pathogenic. However, we cannot exclude its possible effect at the mRNA expression.

The p.T1410M variant was identified in 1.9% of patients with PD and 0.5% of controls. This alteration was previously described in Caribbean patients (9.3%) and controls (4.9%) [6]. Although this variant has been considered non-pathogenic, the authors suggested that further studies are needed to test whether this variant is a risk factor [6]. Similar to the study in Caribbean patients, we believe that the p.T1410M is probably a polymorphism, as it was present in a Brazilian control. However, the evaluation of pathogenicity of this variant must be done with caution. This alteration is highly conserved, located within the ROC domain, and *in silico* analysis demonstrated that it is possibly pathogenic. The ROC domain has a dimeric structure, and



## ANEXO E – Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease.

some pathogenic mutations in this domain partially disrupt the tertiary structure at the dimer interface, resulting in a decrease in GTP hydrolysis [7]. Interestingly, the LRRK2 autophosphorylates several residues of its own ROC *in vitro*, including the p.T1410M residue [8]. Functional analyses are important to clarify if the p.T1410M is a risk factor for PD.

The novel substitution, p.C2139S, affects a highly conserved residue. *In silico* analysis showed that it can affect the protein and we did not observe this variant in 420 control chromosomes. Although the pathogenicity is not yet confirmed, we believe that the p.C2139S may be related to PD.

We also identified the p.Y2189C within the WD40 domain. This variant was recently identified in a Belgian man with PD and considered a potential pathogenic mutation, since it was absent in controls and *in silico* analyses provided evidence that p.Y2189C is deleterious for LRRK2 function [9]. On the other hand, we found this variant in a similar frequency in patients and in controls, and this alteration was identified in an asymptomatic brother of 70 years. Besides, this residue exhibits medium conservation. Our results suggest that the p.Y2189C exchange is not pathogenic.

The most prevalent mutation in our population was the p.G2019S (2.4%). In view of our findings, we consider that the p.T1410M and the p.Y2189C variants are probably polymorphisms and that the novel p.C2139S mutation is potentially pathogenic. However, we reinforce that the protein effects of missense variants with undefined pathogenic role remain to be determined until functional analyses are accomplished.

### Acknowledgements

We thank Dr. Ana Carolina Vicente and the 'Plataforma Genômica PDTIS-FIOCRUZ' for the sequencing system. We thank all the participants in this study. The authors declare that there are no conflicts of interest. This work was supported by funds from PPSUS-MS/CNPq/FAPERJ, CNPq, FAPERJ, CAPES and CEPUERJ.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Analysis of LRRK2 functional domains in PD cases 1481

Figure S1. Schematic representation of the LRRK2 protein and the human LRRK2 protein sequence in the regions of the p.T1410M, p.C2139S and p.Y2189C mutations aligned with orthologs from *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Pan troglodytes*, *Papio anubis*, *Equus caballus*, *Canis familiaris*, *Bos Taurus*, *Sus scrofa* and *Tetraodon nigrovittatus*.

Table S1. Summary of LRRK2 gene intronic variations detected in this study.

Data S1. Methodology.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

### References

- Mata IF, Wodemann WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006; **29**: 286–293.
- Gosal D, Ross OA, Toft M. Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol* 2006; **13**: 616–627.
- Pimentel MM, Moura KC, Abdalla CB, et al. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett* 2008; **433**: 17–21.
- Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, et al. Italian Parkinson Genetics Network. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005; **365**: 412–415.
- Scholz S, Mandel RJ, Fernandez HH, et al. LRRK2 mutations in a clinic-based cohort of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2006; **13**: 1298–1301.
- Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, et al. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North-African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet* 2009; **46**: 458–464.
- Deng J, Lewis PA, Greggio E, Skach E, Bellina A, Cookson MR. Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1499–1504.
- Kamikawaji S, Ito G, Iwatsubo T. Identification of the Autophosphorylation Sites of LRRK2. *Biochemistry* 2009; **48**: 10963–10975.
- Nuytemans K, Rademakers R, Thirum J, et al. Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 471–479.

**ANEXO F** - Pacientes analisados para alterações no gene *LRRK2* e suas características principais

<b>Nº</b>	<b>Registro do paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade de manifestação da DP (anos)</b>	<b>Sexo masculino (M) ou feminino (F)</b>	<b>Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP</b>
1	PAR1142	64	55	M	I
2	PAR1143	68	63	F	I
3	PAR1144	69	65	M	F
4	PAR1145	74	69	M	I
5	PAR1146	79	73	M	I
6	PAR1147	47	35	M	I
7	PAR1148	48	42	M	F
8	PAR1149	65	64	F	I
9	PAR1152	74	70	M	I
10	PAR1153	54	51	M	I
11	PAR1154	70	66	M	I
12	PAR1155	55	51	M	I
13	PAR1156	56	52	M	I
14	PAR1157	76	65	M	I
15	PAR1158	64	60	M	F
16	PAR1159	71	53	M	I
17	PAR1160	68	58	M	F
18	PAR1161	59	49	M	I
19	PAR1162	64	47	M	I
20	PAR1163	83	65	F	I
21	PAR1164	64	57	M	I
22	PAR1168	66	62	M	I
23	PAR1169	74	71	M	I
24	PAR1170	57	43	F	I
25	PAR1171	65	55	M	I
26	PAR1172	74	61	F	I
27	PAR1173	62	44	F	I
28	PAR1174	55	54	F	F
29	PAR1175	75	71	M	I
30	PAR1176	57	49	F	I
31	PAR1177	77	55	M	I
32	PAR1182	39	26	F	I
33	PAR1183	58	44	F	I
34	PAR1184	69	66	M	I
35	PAR1185	62	50	M	I
36	PAR1186	57	45	F	I
37	PAR1190	55	54	F	I
38	PAR1191	72	60	M	I
39	PAR1192	69	50	M	I
40	PAR1193	72	68	F	I
41	PAR1194	72	67	F	I
42	PAR1195	79	60	F	I

Continua

**ANEXO F** - Pacientes analisados para alterações no gene *LRRK2* e suas características principais

<b>Nº</b>	<b>Registro do paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade de manifestação da DP (anos)</b>	<b>Sexo masculino (M) ou feminino (F)</b>	<b>Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP</b>
43	PAR1196	47	40	F	I
44	PAR1203	74	73	M	F
45	PAR1208	63	52	F	I
46	PAR1209	55	51	F	F
47	PAR1210	62	57	M	I
48	PAR1211	57	58	F	I
49	PAR1218	55	45	F	I
50	PAR1219	74	64	M	I
51	PAR1220	85	73	M	I
52	PAR1221	55	46	M	I
53	PAR1223	78	74	M	I
54	PAR1224	65	55	M	I
55	PAR1229	56	43	M	I
56	PAR1230	71	65	M	I
57	PAR1231	66	56	M	I
58	PAR1232	54	43	M	I
59	PAR1247	48	46	F	I
60	PAR1248	70	58	F	I
61	PAR1263	67	66	M	I
62	PAR1270	73	60	F	F
63	PAR1280	67	59	M	I
64	PAR1287	56	40	M	I
65	PAR1288	66	59	F	I
66	PAR1292	66	54	M	F
67	PAR1293	53	48	F	I
68	PAR1294	61	45	F	I
69	PAR1295	77	68	M	I
70	PAR1296	58	42	F	I
71	PAR1297	57	43	M	I
72	PAR1304	65	63	F	I
73	PAR1305	38	36	F	I
74	PAR1306	65	55	M	F
75	PAR1307	54	44	M	I
76	PAR1308	56	50	F	I
77	PAR1314	72	69	F	I
78	PAR1315	63	58	M	F
79	PAR1319	64	50	M	F
80	PAR1320	54	51	F	I
81	PAR1321	50	40	F	F
82	PAR1322	54	48	M	I
83	PAR1323	54	47	F	I
84	PAR1324	64	63	M	I

Continua

**ANEXO F** - Pacientes analisados para alterações no gene *LRRK2* e suas características principais

<b>Nº</b>	<b>Registro do paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade de manifestação da DP (anos)</b>	<b>Sexo masculino (M) ou feminino (F)</b>	<b>Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP</b>
85	PAR1325	67	64	M	I
86	PAR1329	71	64	F	I
87	PAR1330	33	31	M	I
88	PAR1335	61	50	M	I
89	PAR1344	56	52	M	I
90	PAR1345	33	14	M	I
91	PAR1355	64	48	M	I
92	PAR1358	76	60	M	I
93	PAR1359	59	53	M	I
94	PAR1366	71	58	F	I
95	PAR1375	64	57	M	I
96	PAR1376	78	69	M	I
97	PAR1377	48	38	F	I
98	PAR1386	49	46	M	I
99	PAR1394	43	38	F	I
100	PAR1397	53	50	F	I
101	PAR1398	67	53	F	I
102	PAR1399	42	39	M	I
103	PAR1401	43	37	F	F
104	PAR1402	71	47	M	I
105	PAR1404	62	48	M	I
106	PAR1405	38	35	F	I
107	PAR1406	77	69	M	I
108	PAR1407	58	43	M	I
109	PAR1408	66	60	M	F
110	PAR1409	47	33	M	I
111	PAR1410	82	72	F	I
112	PAR1420	72	57	M	I
113	PAR1426	68	67	M	I
114	PAR1427	63	57	M	I
115	PAR1428	71	70	M	F
116	PAR1435	79	78	M	I
117	PAR1436	41	35	M	I
118	PAR1437	71	62	M	I
119	PAR1438	42	37	M	I
120	PAR1440	69	59	M	I
121	PAR1441	62	50	M	I
122	PAR1442	43	38	M	F
123	PAR1443	61	44	F	I
124	PAR1444	69	53	F	I
125	PAR1445	70	66	M	F
126	PAR1447	57	52	M	I

Continua



**ANEXO F** - Pacientes analisados para alterações no gene *LRRK2* e suas características principais

<b>Nº</b>	<b>Registro do paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade de manifestação da DP (anos)</b>	<b>Sexo masculino (M) ou feminino (F)</b>	<b>Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP</b>
127	PAR1448	58	52	M	I
128	PAR1449	74	70	F	I
129	PAR1450	34	26	F	I
130	PAR1451	68	55	F	I
131	PAR1452	64	47	M	I
132	PAR1453	48	36	M	I
133	PAR1454	61	57	M	I
134	PAR1455	57	47	M	F
135	PAR1456	70	43	F	F
136	PAR1457	80	50	M	F
137	PAR1458	59	45	F	I
138	PAR1459	46	42	M	I
139	PAR1460	60	42	M	I
140	PAR1461	71	59	M	I
141	PAR1462	59	53	M	I
142	PAR1463	53	46	F	I
143	PAR1464	74	67	M	I
144	PAR1493	74	62	M	I
145	PAR1494	64	63	M	I
146	PAR1495	61	52	F	I
147	PAR1499	77	68	M	I
148	PAR1503	76	72	M	I
149	PAR1504	70	60	F	I
150	PAR1510	73	71	M	I
151	PAR1511	71	65	F	F
152	PAR1512	54	50	M	I
153	PAR1602	61	59	M	F
154	PAR1613	86	83	M	I
155	PAR1636	47	44	M	I
156	PAR1645	80	64	F	I
157	PAR1646	47	45	M	I
158	PAR1647	71	68	F	I
159	PAR1648	61	56	M	F
160	PAR1649	57	49	F	I
161	PAR1650	53	42	M	I
162	PAR1660	67	57	F	I
163	PAR1661	49	27	M	I
164	PAR1662	54	51	M	I
165	PAR1666	87	78	F	F
166	PAR1667	38	35	M	F
167	PAR1695	61	44	M	I
168	PAR1696	68	58	M	I

Continua

**ANEXO F** - Pacientes analisados para alterações no gene *LRRK2* e suas características principais

<b>Nº</b>	<b>Registro do paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade de manifestação da DP (anos)</b>	<b>Sexo masculino (M) ou feminino (F)</b>	<b>Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP</b>
169	PAR1697	62	57	M	I
170	PAR1699	88	68	M	I
171	PAR1701	66	53	F	I
172	PAR1702	67	54	M	F
173	PAR1703	35	25	M	I
174	PAR1704	56	47	M	I
175	PAR1705	38	34	F	F
176	PAR1728	70	55	F	F
177	PAR1732	87	83	M	I
178	PAR1963	43	39	M	I
179	PAR1964	40	39	M	I
180	PAR1965	44	39	M	I
181	PAR1966	39	36	M	I
182	PAR1967	48	37	M	I
183	PAR1968	41	38	M	I
184	PAR1969	40	38	F	I
185	PAR2036	46	40	F	F
186	PAR2037	58	58	M	F
187	PAR2038	55	47	F	I
188	PAR2039	70	60	F	F
189	PAR2040	84	77	F	I
190	PAR2041	74	64	F	I
191	PAR2042	79	76	F	I
192	PAR2043	71	68	M	F
193	PAR2044	70	67	F	I
194	PAR2058	71	63	M	I
195	PAR2066	78	78	F	F
196	PAR2067	70	47	M	I
197	PAR2068	56	28	M	I
198	PAR2069	63	57	M	F
199	PAR2080	63	60	M	I
200	PAR2081	59	40	M	I
201	PAR2082	61	57	M	I
202	PAR2083	59	45	M	F
203	PAR2084	72	69	M	I
204	PAR2101	40	33	F	I

ANEXO G - Resultados das análises moleculares do gene *LRRK2* em pacientes com doença de Parkinson

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1142	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N
PAR1143	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1144	N	c.4193G>A homo/c.4269G>A homo	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	-	N	N	N	N	N
PAR1145	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1146	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A / c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1147	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1148	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1149	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4911A>G/ c.4872C>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1152	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1153	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4911A>G/ c.4872C>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1154	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C/ c.5509+122A>G	N	N	N	N	N	N
PAR1155	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1156	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1157	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1158	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1159	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1160	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1161	N	N	N	N	c.4828-31T>C / homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1162	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	-	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1163	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1164	N	N	N	N	c.4828-31T>C / homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59A>C	c.5457T>C homo/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1168	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1169	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T/ c.5317+59A>C	c.5457T>C/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1170	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1171	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	c.6382- 36G>A
PAR1172	N	N	N	N	N	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A/ c.6381+30A>G	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1173	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1174	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1175	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N		c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1176	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	N	c.5457T>C homo		N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1177	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1182	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1183	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1184	N	N	c.4541G>A	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	N
PAR1185	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1186	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo / c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N
PAR1190	N	N	N	N	c.4872C>A homo	N	c.5317+32C>T homo	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1191	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1192	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1193	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1194	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1195	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4937T>C/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1196	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1203	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1208	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1209	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5308T>C/ c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1210	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1211	N	N	N	N	c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1218	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N

Continua

**ANEXO G - Resultado das análises moleculares do gene *LRRK2* em pacientes com doença de Parkinson**

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1219	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1220	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	N	N	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1221	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1223	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A / c.4911A>G / c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1224	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.5015+32A>G	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1229	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1230	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A / c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1231	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua



## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1232	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1247	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo/ c.4911A>G / c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	c.5657-46C>T	N	N	c.6324G>A	c.6382-37C>T
PAR1248	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A / c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1263	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1270	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1280	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A / c.4911A>G / c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1287	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1288	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1292	N	N	N	N	c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1293	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1294	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1295	N	N	c.4624C>T	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1296	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.5957+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1297	N	c.4194T>G	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G /c.5957+32A> G	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N
PAR1304	N	N	N	N	N	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1306	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1307	N	c.4317+16C>T	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A / c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1308	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G / c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1314	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1315	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1319	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	c.6566 A>G
PAR1320	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	N	N	N	c.6382- 37C>T

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1321	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo / c.4911A>G homo / c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1322	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1323	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1324	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1325	N	N	c.4624C>T	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1329	N	N	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T/ c.5317+59A>C	c.5457T>C/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1330	N	N	N	N	N	N	N	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1335	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1344	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1345	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1355	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	N	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59A> C	c.5457T>C homo/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1358	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N
PAR1359	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1366	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T / c.5317+59A> C	c.5457T>C/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1375	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1376	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1377	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo / c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1386	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1394	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	c.6241 A>G	N	N
PAR1397	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1398	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1399	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1401	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	N	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1402	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T/ c.5317+59A>C	c.5457T>C/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR1404	N	N	N	N	c.4872C>A homo	N	c.5317+32C>T homo	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1405	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1406	N	N	c.4624C>T	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1407	N	N	N	N	c.4872C>A homo / c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1408	N	N	N	N	c.4872C>A homo / c.4911A>G	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1409	N	N	N	N	c.4872C>A homo	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T homo	N	N	N
PAR1410	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1420	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	c.6382- 37C>T c.6576+44 T>C
PAR1426	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1427	N	c.4193 G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1428	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1435	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo/ c.5509+52T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1436	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	-	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1437	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1438	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1440	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	N
PAR1441	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1442	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1443	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua



## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1444	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1445	N	N	c.4624C>T	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59A>C	c.5457T>C/ c.5509+20A>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1447	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1448	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1449	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	N	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1450	N	N	c.4541G>A	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	N	N	N	N	N	N	N
PAR1451	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1452	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1453	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1454	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A / c.4911A>G / c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1455	N	c.4229C>T	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1456	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1457	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T homo	N	N	N
PAR1458	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1459	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1460	N	N	N	N	c.4828-31T>C	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR1461	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1462	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1463	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	N	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1464	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1493	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	c.6566 A>G
PAR1494	N	c.4194T>G	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1495	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1499	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1503	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1504	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1510	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1511	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A homo	N	c.5457T>C homo	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1512	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1602	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1613	N	N	c.4541G>A	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1636	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1645	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1646	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T homo	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	c.6382-37C>T
PAR1647	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1648	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1649	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	c.6241 A>G	N	N
PAR1650	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	c.6241 A>G	c.6324G>A	N
PAR1660	N	N	c.4624C>T	N	c.4828-31T>C homo	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1661	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1662	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1666	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1667	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A / c.4911A>G/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1695	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	N	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1696	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1697	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1699	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1701	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4937T>C/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1702	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1703	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1704	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1705	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1728	N	c.4229C>T	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1732	N	c.4229C>T	N	N	c.4828-31T>C / c.4872C>A/ c.4911A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR1963	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR1964	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR1965	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1966	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR1967	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N

Continua



## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR1968	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR1969	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A homo	N
PAR2036	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR2037	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	N
PAR2038	N	c.4229C>T	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR2039	N	N	N	N	c.4872C>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR2040	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PAR2041	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR2042	N	N	N	N	c.4872C>A	N	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	N
PAR2043	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	N	N	N	N	N	N	c.6415 T>A
PAR2044	N	N	c.4624 C>T	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G / c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N
PAR2058	N	N	N	N	c.4872C>A homo	N	c.5317+32C>T homo	N	N	N	c.5948+48C>T	N	N	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR2066	N	c.4193G>A homo/ c.4269G>A homo	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR2067	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR2068	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR2069	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo	N	N	N	N	N	N
PAR2080	N	N	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo/ c.4939T>A/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T	c.5457T>C homo	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR2081	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G/ c.4939T>A	N	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C	N	N	c.5948+48C>T	N	c.6324G>A	N

Continua

## ANEXO G - Continuação

Pacientes	Exons*													
	E29	E30	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E42	E43	E44
PAR2082	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.5015+32A>G	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N
PAR2083	N	c.4193G>A/ c.4269G>A	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	N	N
PAR2084	N	c.4193G>A	N	N	c.4828-31T>C homo/ c.4872C>A homo/ c.4911A>G homo	c.5170+23T>A homo	c.5317+32C>T homo	c.5457T>C homo/ c.5509+20A>C	N	N	N	N	N	N
PAR2101	N	N	N	N	c.4828-31T>C/ c.4872C>A/ c.4911A>G/ c.4939T>A	c.5170+23T>A	c.5317+32C>T	c.5457T>C	N	N	N	N	c.6324G>A	N

\*As alterações identificadas através das análises de cada exon estão em suas respectivas colunas, escritas em vermelho. Quando o paciente é homocigoto, a palavra “homo” está escrita logo após a alteração.

N- Indivíduos sem alterações nos exons.

**ANEXO H - Resultados das análises moleculares do gene *LRRK2* em indivíduos saudáveis (amostra controle)**

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
1	PAR1439/07A	59	M	N	-	N
2	PAR1485/07A	74	F	N	c.5317+32C>T homo	N
3	PAR1486/07A	61	F	N	c.5317+32C>T	N
4	PAR1487/07A	84	F	N	N	N
5	PAR1488/07A	83	F	c.4229C>T (p.T1410M)	c.5317+32C>T	N
6	PAR1489/07A	74	F	N	c.5317+32C>T	N
7	PAR1490/07A	80	F	N	c.5317+32C>T homo	N
8	PAR1491/07A	77	M	N	-	N
9	PAR1492/07A	63	F	N	-	N
10	PAR1529/07A	61	F	N	-	N
11	PAR1530/07A	68	F	N	-	N
12	PAR1531/07A	74	F	N	c.5317+32C>T homo	N
13	PAR1532/07A	67	F	N	c.5317+32C>T homo	N
14	PAR1533/07A	65	F	N	c.5317+32C>T	N
15	PAR1534/07A	73	F	N	c.5317+32C>T	N
16	PAR1535/07A	72	M	N	c.5317+32C>T homo	N
17	PAR1536/07A	80	F	N	c.5317+32C>T	N
18	PAR1537/07A	71	F	N	c.5317+32C>T homo	N
19	PAR1538/07A	67	F	N	c.5317+32C>T	N
20	PAR1539/07A	77	F	N	c.5317+32C>T homo	N
21	PAR1590/07A	73	F	N	c.5317+32C>T homo	N
22	PAR1601/07A	58	F	N	c.5317+32C>T	N
23	PAR1611/07A	58	M	N	-	N
24	PAR1665/07A	58	F	N	c.5317+32C>T	N
25	PAR1686/07A	75	F	N	c.5317+32C>T homo	N
26	PAR1687/07A	62	M	N	c.5317+32C>T homo	N
27	PAR1688/07A	74	F	N	c.5317+32C>T	N
28	PAR1689/07A	78	F	N	c.5317+32C>T homo	N
29	PAR1690/07A	81	F	N	c.5317+32C>T homo	N
30	PAR1691/07A	59	F	N	c.5317+32C>T homo	N

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
31	PAR1692/07A	65	F	N	c.5317+32C>T homo	N
32	PAR1693/07A	69	F	N	c.5317+32C>T	N
33	PAR1694/07A	73	M	N	c.5317+32C>T	N
34	PAR1784/08A	65	F	N	N	N
35	PAR1785/08A	67	M	N	-	N
36	PAR1786/08A	71	F	N	c.5317+32C>T	N
37	PAR1787/08A	67	F	N	c.5317+32C>T	N
38	PAR1790/08A	64	F	N	c.5317+32C>T	N
39	PAR2050	58	M	N	c.5317+32C>T homo	N
40	PAR2051	61	M	N	c.5317+32C>T	N
41	PAR2052	54	M	N	c.5317+32C>T	N
42	PAR2053	60	M	N	c.5317+32C>T homo	N
43	PAR2054	50	M	N	c.5317+32C>T homo	N
44	PAR2055	53	M	N	c.5317+32C>T homo	N
45	PAR2059	60	M	N	-	N
46	PAR2060	58	M	N	c.5317+32C>T	N
47	PAR2061	58	M	N	c.5317+32C>T homo	N
48	PAR2062	53	M	N	c.5317+32C>T homo	N
49	PAR2070	55	M	N	c.5317+32C>T	N
50	PAR2071	59	M	N	c.5317+32C>T	N
51	PAR2073	55	M	N	c.5317+32C>T	N
52	PAR2074	63	M	N	c.5317+32C>T	N
53	PAR2075	57	M	N	c.5317+32C>T homo	N
54	PAR2076	56	M	N	c.5317+32C>T homo	N
55	PAR2077	54	M	N	N	N
56	PAR2078	51	M	N	c.5317+32C>T homo	N
57	PAR2093	59	M	N	c.5317+32C>T homo	N
58	PAR2094	63	M	N	c.5317+32C>T homo	N
59	PAR2095	56	M	N	-	N
60	PAR2102	51	M	N	c.5317+32C>T homo	N

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
61	PAR2103	54	M	N	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	N
62	PAR2104	53	M	N	N	N
63	PAR2105	56	M	N	c.5317+32C>T	N
64	PAR2106	61	M	N	c.5317+32C>T	N
65	PAR2107	53	M	N	-	N
66	PAR2109	54	M	N	c.5317+32C>T	N
67	PAR2110	56	M	N	c.5317+32C>T	N
68	PAR2111	60	M	N	c.5317+32C>T	N
69	PAR2124	59	M	N	c.5317+32C>T	N
70	PAR2125	54	M	N	c.5317+32C>T homo	N
71	PAR2132	63	M	N	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	N
72	PAR2135	55	M	N	c.5317+32C>T	N
73	PAR2144	55	M	N	c.5317+32C>T homo	N
74	PAR2146	63	M	N	c.5317+32C>T	N
75	PAR2147	58	M	N	c.5317+32C>T	N
76	PAR2148	63	M	N	c.5317+32C>T	N
77	PAR2159	52	F	N	c.5317+32C>T homo	N
78	PAR2160	56	M	N	c.5317+32C>T homo	N
79	PAR2161	57	M	N	c.5317+32C>T homo	N
80	PAR2166	63	M	N	-	N
81	PAR2167	80	F	N	-	N
82	PAR2168	71	F	N	-	N
83	PAR2169	74	F	N	c.5317+32C>T homo	N
84	PAR2170	72	M	N	c.5317+32C>T homo	N
85	PAR2171	60	M	N	c.5317+32C>T	N
86	PAR2173	67	M	N	-	N
87	PAR2174	66	M	N	c.5317+32C>T homo	N
88	PAR2175	68	F	N	c.5317+32C>T	N
89	PAR2176	51	F	N	c.5317+32C>T	N

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
90	PAR2177	66	F	N	c.5317+32C>T homo	N
91	PAR2178	56	M	N	-	N
92	PAR2179	61	F	N	c.5317+32C>T homo	N
93	PAR2180	50	F	N	c.5317+32C>T homo	N
94	PAR2181	57	M	N	c.5317+32C>T	N
95	PAR2182	82	F	N	c.5317+32C>T	N
96	PAR2183	54	M	N	c.5317+32C>T	N
97	PAR2184	52	M	N	c.5317+32C>T homo	N
98	PAR2186	51	M	N	c.5317+32C>T	N
99	PAR2187	57	M	N	c.5317+32C>T	N
100	PAR2188	51	M	N	c.5317+32C>T homo	N
101	PAR2189	56	M	N	c.5317+32C>T homo	N
102	PAR2193	54	M	N	c.5317+32C>T homo	N
103	PAR2194	85	M	N	c.5317+32C>T	N
104	PAR2195	53	F	N	c.5317+32C>T	c.6566A>G (p.Y2189C)
105	PAR2196	64	M	N	-	N
106	PAR2197	58	F	N	c.5317+32C>T	N
107	PAR2198	53	F	N	-	N
108	PAR2199	80	M	N	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	N
109	PAR2200	64	F	N	c.5317+32C>T homo	N
110	PAR2201	95	F	-	c.5317+32C>T	-
111	PAR2202	60	M	-	c.5317+32C>T homo	-
112	PAR2203	73	F	-	c.5317+32C>T homo	-
113	PAR2204	63	F	-	c.5317+32C>T homo	-
114	PAR2205	72	M	-	N	-
115	PAR2206	52	F	-	N	-
116	PAR2207	58	F	-	c.5317+32C>T homo	-
117	PAR2208	64	F	-	c.5317+32C>T homo	-
118	PAR2209	66	F	-	c.5317+32C>T homo	-

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
119	PAR2210	56	F	-	c.5317+32C>T	-
120	PAR2211	68	M	-	c.5317+32C>T homo	-
121	PAR2212	66	F	-	c.5317+32C>T homo	-
122	PAR2213	66	F	-	c.5317+32C>T	-
123	PAR2222	70	F	-	c.5317+32C>T homo	-
124	PAR2223	68	F	-	c.5317+32C>T	-
125	PAR2224	50	M	-	N	-
126	PAR2226	79	F	-	c.5317+32C>T	-
127	PAR2227	75	F	-	c.5317+32C>T	-
128	PAR2241	70	M	-	c.5317+32C>T homo	-
129	PAR2242	50	F	-	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	-
130	PAR2243	75	F	-	N	-
131	PAR2244	58	F	-	c.5317+32C>T homo	-
132	PAR2245	79	M	-	c.5317+32C>T homo	-
133	PAR2246	52	F	-	N	-
134	PAR2247	53	M	-	c.5317+32C>T homo	-
135	PAR2248	50	F	-	c.5317+32C>T homo	-
136	PAR2249	58	M	-	N	-
137	PAR2250	74	F	-	c.5317+32C>T homo	-
138	PAR2251	64	F	-	c.5317+32C>T	-
139	PAR2252	56	F	-	c.5317+32C>T	-
140	PAR2253	61	M	-	c.5317+32C>T	-
141	PAR2254	55	F	-	c.5317+32C>T	-
142	PAR2297	64	M	-	c.5317+32C>T	-
143	PAR2298	67	M	-	c.5317+32C>T	-
144	PAR2324	65	M	-	c.5317+32C>T	-
145	PAR2325	85	F	-	N	-
146	PAR2336	66	M	-	c.5317+32C>T	-
147	PAR2337	62	M	-	c.5317+32C>T	-
148	PAR2351	51	M	-	c.5317+32C>T homo	-

Continua



## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
149	PAR2361	59	M	-	c.5317+32C>T	-
150	PAR2363	63	M	-	c.5317+32C>T homo	-
151	PAR2409	52	M	-	c.5317+32C>T	-
152	PAR2410	64	M	-	c.5317+32C>T homo	-
153	PAR2411	63	F	-	c.5317+32C>T homo	-
154	PAR2412	64	M	-	c.5317+32C>T	-
155	PAR2413	65	F	-	c.5317+32C>T homo	-
156	PAR2414	52	F	-	c.5317+32C>T	-
157	PAR2415	60	M	-	c.5317+32C>T homo	-
158	PAR2416	77	F	-	N	-
159	PAR2417	71	F	-	c.5317+32C>T	-
160	PAR2418	57	M	-	c.5317+32C>T homo	-
161	PAR2419	67	F	-	c.5317+32C>T	-
162	PAR2420	59	F	-	c.5317+32C>T homo	-
163	PAR2421	71	F	-	c.5317+32C>T homo	-
164	PAR2422	51	F	-	c.5317+32C>T homo	-
165	PAR2423	61	F	-	c.5317+32C>T	-
166	PAR2424	71	F	-	c.5317+32C>T	-
167	PAR2425	60	M	-	c.5317+32C>T	-
168	PAR2426	63	M	-	c.5317+32C>T homo	-
169	PAR2427	71	M	-	c.5317+32C>T	-
170	PAR2428	75	F	-	c.5317+32C>T	-
171	PAR2429	68	F	-	c.5317+32C>T homo	-
172	PAR2430	50	F	-	c.5317+32C>T homo	-
173	PAR2431	57	F	-	c.5317+32C>T homo	-
174	PAR2432	71	M	-	N	-
175	PAR2433	78	M	-	N	-
176	PAR2434	52	F	-	c.5317+32C>T homo	-
177	PAR2435	68	M	-	c.5317+32C>T	-
178	PAR2436	63	F	-	c.5317+32C>T homo	-

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
179	PAR2437	57	M	-	c.5317+32C>T homo	-
180	PAR2438	58	M	-	c.5317+32C>T	-
181	PAR2439	64	F	-	c.5317+32C>T	-
182	PAR2441	55	F	-	c.5317+32C>T	-
183	PAR2442	68	F	-	c.5317+32C>T homo	-
184	PAR2443	74	F	-	c.5317+32C>T homo	-
185	PAR2444	68	F	-	c.5317+32C>T homo	-
186	PAR2448	55	M	-	c.5317+32C>T homo	-
187	PAR2449	51	M	-	c.5317+32C>T homo	-
188	PAR2450	51	F	-	c.5317+32C>T	-
189	PAR2451	52	M	-	c.5317+32C>T	-
190	PAR2452	64	M	-	N	-
191	PAR2453	50	M	-	c.5317+32C>T homo	-
192	PAR2454	52	F	-	c.5317+32C>T homo	-
193	PAR2455	79	M	-	c.5317+32C>T homo	-
194	PAR2456	61	F	-	c.5317+32C>T	-
195	PAR2457	51	M	-	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	-
196	PAR2458	51	F	-	N	-
197	PAR2459	66	F	-	c.5317+32C>T homo	-
198	PAR2460	53	F	-	c.5317+32C>T homo	-
199	PAR2461	50	M	-	c.5317+32C>T homo	-
200	PAR2462	59	M	-	c.5317+32C>T	-
201	PAR2463	69	F	-	c.5317+32C>T homo	-
202	PAR2464	64	F	-	c.5317+32C>T	-
203	PAR2465	56	F	-	c.5317+32C>T	-
204	PAR2466	52	F	-	c.5317+32C>T homo	-
205	PAR2467	71	F	-	N	-
206	PAR2468	72	F	-	c.5317+32C>T homo	-

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
207	PAR2469	79	F	-	c.5317+32C>T homo	-
208	PAR2470	60	F	-	c.5317+32C>T	-
209	PAR2471	65	F	-	c.5317+32C>T	-
210	PAR2472	64	F	-	c.5317+32C>T homo	-
211	PAR2473	65	F	-	c.5317+32C>T homo	-
212	PAR2474	63	M	-	c.5317+32C>T homo	-
213	PAR2475	63	M	-	c.5317+32C>T homo	-
214	PAR2476	84	F	-	c.5317+32C>T homo	-
215	PAR2477	56	M	-	c.5317+32C>T homo	-
216	PAR2478	60	F	-	c.5317+32C>T homo	-
217	PAR2479	54	F	-	N	-
218	PAR2480	74	F	-	c.5317+32C>T	-
219	PAR2481	57	F	-	c.5317+32C>T homo	-
220	PAR2482	60	F	-	c.5317+32C>T homo/ c.5317+59C>T	-
221	PAR2483	52	F	-	c.5317+32C>T	-
222	PAR2484	50	M	-	c.5317+32C>T homo	-
223	PAR2485	63	F	-	c.5317+32C>T	-
224	PAR2488	56	M	-	c.5317+32C>T homo	-
225	PAR2489	61	F	-	c.5317+32C>T homo	-
226	PAR2490	52	F	-	c.5317+32C>T homo	-
227	PAR2201	95	F	N	c.5317+32C>T	N
228	DA1360/07A	64	M	N	-	N
229	DA1361/07A	67	F	N	-	N
230	DA1362/07A	67	F	N	-	N
231	DA1363	64	M	N	-	N
232	DA1364/07A	68	F	N	-	N
233	DA1372/07A	75	M	N	-	N
234	DA1373/07A	54	F	N	-	N
235	DA1381/07A	74	M	N	-	N
236	DA1382/07A	80	M	N	-	N

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
237	DA1383/07A	75	M	N	-	N
238	DA1384/07A	65	F	N	-	N
239	DA1395/07A	66	F	N	-	N
240	DA1396/07A	72	F	N	-	N
241	DA1417/07A	79	M	N	-	N
242	DA1433/07A	68	F	N	-	N
243	DA1476/07A	67	F	N	-	N
244	DA1478/07A	73	F	N	-	N
245	DA1479/07A	64	F	N	-	N
246	DA1480/07A	70	F	N	-	N
247	DA1481/07A	80	F	N	-	N
248	DA1482/07A	69	F	N	-	N
249	DA1483/07A	72	F	N	-	N
250	DA1484/07A	71	F	N	-	N
251	DA1509/07A	69	F	N	-	N
252	DA1522/07A	62	F	N	-	N
253	DA1523/07A	67	F	N	-	N
254	DA1524/07A	65	F	N	-	N
255	DA1525/07A	61	F	N	-	N
256	DA1526/07A	67	F	N	-	N
257	DA1527/07A	67	M	N	-	N
258	DA1528/07A	70	F	N	-	N
259	DA1540/07A	68	F	N	-	N
260	DA1541/07A	66	F	N	-	N
261	DA1542/07A	68	F	N	-	N
262	DA1543/07A	67	F	N	-	N
263	DA1544/07A	68	F	N	-	N
264	DA1545/07A	64	F	N	-	N
265	DA1546/07A	60	F	N	-	N
266	DA1547/07A	68	F	N	-	N
267	DA1589/07A	76	F	N	-	N
268	DA1677/07A	81	F	N	-	c.6566A>G (p.Y2189C)
269	DA1678/07A	68	F	N	-	N
270	DA1679/07A	73	F	N	-	N
271	DA1680/07A	72	F	N	-	N
272	DA1681/07A	68	F	N	-	N
273	DA1682/07A	71	F	N	-	N
274	DA1683/07A	70	F	N	-	N
275	DA1684/07A	73	F	N	-	N
276	DA1685/07A	75	M	N	-	N
277	DA1719/08A	64	F	N	-	N
278	DA1768/08A	79	F	N	-	N
279	DA1770/08A	79	F	N	-	N
280	DA1773/08A	76	F	N	-	N

Continua

## ANEXO H - Continuação

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
281	DA1774/08A	66	F	N	-	N
282	DA1775/08A	62	M	N	-	N
283	DA1776/08A	71	F	N	-	N
284	DA1777/08A	64	F	N	-	N
285	DA1778/08A	68	F	N	-	N
286	DA1779/08A	71	F	N	-	N
287	DA1780/08A	79	M	N	-	N
288	DA1781/08A	78	F	N	-	N
289	DA1782/08A	71	F	N	-	N
290	DA1783/08A	74	F	N	-	N
291	DA1788/08A	69	F	N	-	N
292	DA1789/08A	65	F	N	-	N
293	DA1976	87	F	N	-	N
294	DA1977	63	F	N	-	N
295	DA1980	82	F	N	-	N
296	DA1981	71	F	N	-	N
297	DA1982	70	F	N	-	N
298	DA1983	64	F	N	-	N
299	DA1984	73	M	N	-	N
300	DA1985	64	F	N	-	N
301	DA1986	65	F	N	-	N
302	DA1987	63	F	N	-	N
303	DA2027	65	F	N	-	N
304	DA2028	69	F	N	-	N
305	DA2029	79	M	N	-	N
306	DA2030	78	F	N	-	N
307	DA2031	64	F	N	-	N
308	DA2032	72	M	N	-	N
309	DA2033	61	M	N	-	N
310	DA2034	64	F	N	-	N
311	13	63	F	N	-	N
312	15	60	F	N	-	N
313	18	61	F	N	-	N
314	30	55	F	N	-	N
315	32	56	F	N	-	N
316	36	58	F	N	-	N
317	46	53	F	N	-	N
318	49	62	F	N	-	N
319	54	58	F	N	-	N
320	59	72	F	N	-	N
321	60	74	F	N	-	N
322	68	61	F	N	-	N
323	69	61	M	N	-	N
324	85	71	F	N	-	N

Continua

**ANEXO H - Continuação**

Nº	Controles	Idade	Sexo <sup>a</sup>	Exon 30	Exon 36	Exon 44
325	87	64	F	N	-	N
326	88	69	M	N	-	N
327	183	58	M	N	-	N

<sup>a</sup> Sexo masculino: M; sexo feminino: F.

As alterações pesquisadas e identificadas no cDNA estão escritas em vermelho e suas respectivas mudanças na proteína estão entre parênteses.