



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

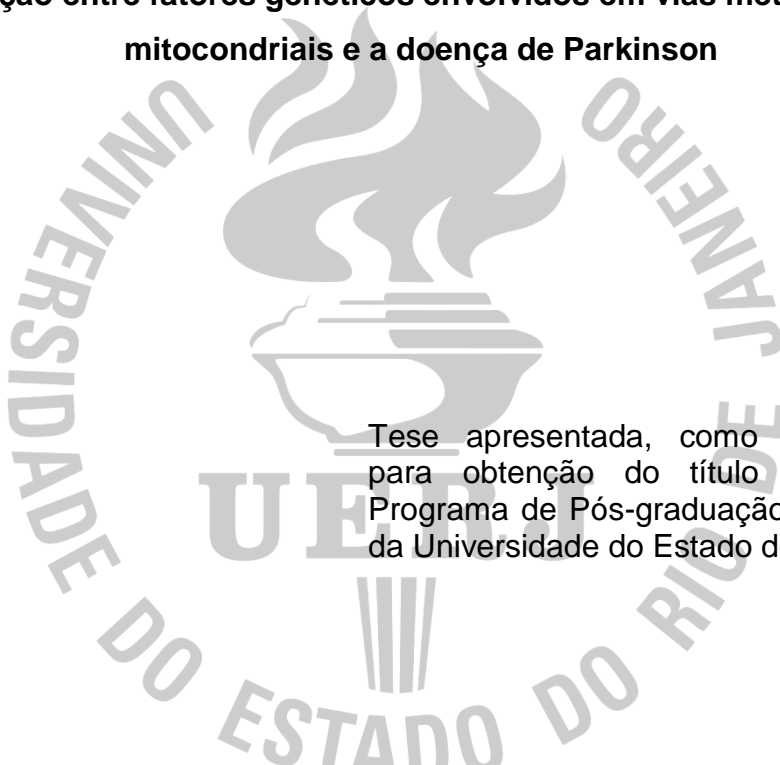
Karla Cristina Vasconcelos Moura

**Relação entre fatores genéticos envolvidos em vias metabólicas
mitocondriais e a doença de Parkinson**

Rio de Janeiro
2013

Karla Cristina Vasconcelos Moura

**Relação entre fatores genéticos envolvidos em vias metabólicas
mitocondriais e a doença de Parkinson**



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.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças

Rio de Janeiro

2013

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

M929 Moura, Karla Cristina Vasconcelos.
Relação entre fatores genéticos envolvidos em vias metabólicas mitocondriais e a doença de Parkinson / Karla Cristina Vasconcelos Moura. – 2013.
145 f.

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, Pós-Graduação em Biociências.

1. Parkinson, Doença de. – Aspectos genéticos – Teses. 2. Mutação – Teses. 3. Parkinson, Doença de. – Teses. 4. 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

Karla Cristina Vasconcelos Moura

**Relação entre fatores genéticos envolvidos em vias metabólicas mitocondriais
e a doença de Parkinson**

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 26 de fevereiro de 2013.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Instituto Nacional de Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar força e saúde para poder concluir este doutorado com êxito. Obrigada meu senhor por mais esta conquista!

À Prof^a Dr^a Márcia Mattos Gonçalves Pimentel por ter me dado a grandiosa oportunidade de ingressar no doutorado e por ter acreditado no meu potencial como pesquisadora desde a iniciação científica.

À Prof^a Dr^a Cíntia Barros Santos-Rebouças pela coorientação nos momentos de dúvida e por todo auxílio na execução e no desenvolvimento desta tese

Aos meus pais, por serem meus amores incondicionais e verdadeiros, e por sempre me incentivarem a continuar os meus estudos.

Ao meu irmão Rodrigo, por compreender meus momentos de estresse e de “monopólio” do nosso computador, além de me ajudar com as figuras desta tese.

À Ricardo, por ter sido meu porto seguro e por entender a minha ausência durante meus frequentes momentos de estudo e pesquisa. Além de namorado, é meu grande amigo e companheiro que esteve tão presente durante estes 4 anos de doutorado, me dando força e apoio nos momentos de angústia. Te amo muito!

A todos os médicos que participaram da pesquisa, pela grandiosa colaboração e pelo convívio durante estes anos.

Ao Mário, por estar sempre disposto a ajudar e a colaborar com qualquer coisa. Mesmo não fazendo mais parte do nosso laboratório, queria agradecê-lo por toda ajuda com os papers e com os experimentos da tese. Tenho certeza que seu futuro será brilhante onde quer que esteja trabalhando.

A “florzinha” Flávia, por ter sido uma grande amiga e estar sempre presente com uma palavra de consolo e carinho nos momentos mais difíceis. Agradeço também por toda ajuda na bancada.

À Jussara, por ser uma pessoa prestativa e sempre disposta a ajudar. E por toda ajuda técnica indispensável ao laboratório.

À Andressa, por ter se tornado uma grande amiga nestes últimos tempos e por toda ajuda com a análise de MLPA.

À Gabi e Thainá, por serem ótimas colegas de trabalho, pela companhia e conversas nos momentos de descanso. À Fabíola por toda ajuda com as PCRs no início deste doutorado.

Aos mais novos alunos do SERVGEN, Aline, André, Camila, Luciana e Thaís, por proporcionarem um convívio agradável no laboratório.

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

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, sem o qual seria inviável realizar esta tese.

RESUMO

MOURA, Karla Cristina Vasconcelos. *Relação entre fatores genéticos envolvidos em vias metabólicas mitocondriais e a Doença de Parkinson*. 2013. 145 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A doença de Parkinson (DP) é uma das desordens neurodegenerativas mais comuns associada ao envelhecimento, alcançando 2% aos 70 anos. É uma doença caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos nigrais nos gânglios basais e pela presença de inclusões proteicas citoplasmáticas denominadas corpúsculos e neuritos de Lewy nos neurônios sobreviventes. A etiologia da DP é pouco conhecida, sendo considerada, na maioria dos casos, idiopática. Conhecimentos alcançados nos últimos 15 anos sobre a base genética da DP demonstram, claramente, que os fatores genéticos desempenham um importante papel na etiologia desta desordem. Neste trabalho, rastreamos mutações nos genes que codificam proteínas participantes de vias metabólicas mitocondriais (*Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*) em 136 pacientes brasileiros com manifestação precoce da DP, através do sequenciamento automático e da técnica de MLPA. Avaliamos a presença de variantes de sequência por meio do sequenciamento dos exons 1 a 12 do gene *Parkin* e dos exons 1 a 8 do gene *PINK1*. Em *Parkin* foram identificadas três mutações patogênicas ou potencialmente patogênicas, ambas em heterozigose: p.T240M, p.437L e p.S145N. Em *PINK1* não encontramos variantes de ponto patogênicas. Através da técnica de MLPA investigamos alterações de dosagem nos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*. Identificamos cinco alterações no gene *Parkin* em quatro pacientes: uma duplicação heterozigota do exon 4 no paciente PAR2256, uma deleção heterozigota do exon 4 no probando PAR2099, uma deleção homozigota do exon 4 na paciente PAR3380 e um probando heterozigoto composto (PAR2396) com duas alterações, uma duplicação do exon 3 e uma deleção dos exons 5 e 6. No gene *PINK1* identificamos uma deleção heterozigota do exon 1, que nunca foi descrita na literatura, em um paciente (PAR2083). Não encontramos alteração quantitativa no gene *DJ-1*. Neste estudo obtivemos uma frequência total de mutações patogênicas (pontuais e de dosagem) nos genes estudados de 7,3%, sendo 6,6% no gene *Parkin* e 0,7% no gene *PINK1*.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Mutações gênicas. MLPA.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders associated with aging, reaching 2% at age 70. It is a disease characterized by progressive degeneration of nigra dopaminergic neurons in the basal ganglia and the presence of cytoplasmic protein inclusions known as Lewy bodies and neurites in surviving neurons. The etiology of PD is poorly understood, being considered, in most cases, idiopathic. Knowledge achieved in the last 15 years about the genetic basis of PD clearly shows that genetic factors play an important role in the etiology of this disorder. In this study, we screened mutations in genes that encode proteins participating in mitochondrial metabolic pathways (*Parkin*, *PINK1* and *DJ-1*) in 136 Brazilian patients with early onset PD, through automatic sequencing and MLPA technique. We evaluated the presence of sequence variants by means of sequencing of exons 1 to 12 of *Parkin* gene and exons 1 to 8 of *PINK1* gene. In *Parkin* gene were identified three pathogenic or potentially pathogenic mutations, both in heterozygous state: p.T240M, p.437L e p.S145N. In *PINK1* gene we did not find pathogenic point mutations. Through the MLPA technique we investigated dosage changes in *Parkin*, *PINK1* and *DJ-1* genes. We identified five exon rearrangements in *Parkin* gene in four patients: a heterozygous duplication of exon 4 in patient PAR2256, a heterozygous deletion of exon 4 in proband PAR2099, a homozygous deletion of exon 4 in patient PAR3380 and a compound heterozygote (PAR2396) with two changes, a duplication of exon 3 and a deletion of exons 5 and 6. In *PINK1* gene we identified a heterozygous deletion of exon 1, which has never been described in literature, in one patient (PAR2083). We found no quantitative change in *DJ-1* gene. In this study, we obtained an overall frequency of pathogenic mutations (sequence and dosage) in the genes studied of 7.3%, being 6.6% in *Parkin* gene and 0.7% in *PINK1* gene.

Keywords: Parkinson's disease. Gene mutations. MLPA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A) Representação das fases pré-sintomática e sintomática da DP. A fase pré-sintomática é marcada pelo surgimento dos corpúsculos e neuritos de Lewy no cérebro de indivíduos assintomáticos. Na fase sintomática, o limiar neuropatológico é excedido (seta preta). O aumento da inclinação e da intensidade das áreas coloridas abaixo da diagonal indicam a gravidade crescente da patologia nas distintas regiões cerebrais. B) Diagrama mostrando o processo patológico ascendente (setas brancas). A intensidade do sombreamento das áreas coloridas corresponde à da figura 1A.....	19
Figura 2 -	Principais categorias onde estão enquadrados os fatores de risco genéticos associados à DP.....	23
Figura 3 -	Vias metabólicas comprometidas e envolvidas na patogênese da DP.....	24
Figura 4 -	A) Representação esquemática de <i>DJ-1</i> no nível transcrito; B) Único domínio funcional da proteína DJ-1 que possui 189 aminoácidos e é membro da família ThiJ/Pfp1 de moléculas chaperonas que são induzidas durante o estresse oxidativo; Os números abaixo da proteína indicam os limites do domínio; As mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho na sua posição aproximada ao longo da proteína.....	27
Figura 5 -	A) Representação esquemática de <i>PINK1</i> no nível transcrito; B) Domínios funcionais da proteína PINK1 que possui 581 aminoácidos; MTS – domínio de ligação à mitocôndria; TM – provável domínio transmembrana; Kinase – domínio Kinase serina/treonina; Números abaixo da proteína indicam os limites dos domínios; Mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho em sua posição aproximada ao longo da proteína...	31
Figura 6 -	A) Representação esquemática de <i>Parkin</i> no nível transcrito; B) Domínios funcionais da proteína Parkin que possui 465 aminoácidos; UBL – domínio ubiquitina; RING1 e RING2 - domínios RING <i>finger</i> separados por um domínio IBR (entre RING); Números abaixo da proteína indicam os limites dos domínios; Mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho em suas posições aproximadas ao longo da proteína.....	36
Figura 7 -	Esquema das etapas necessárias para a realização da técnica de MLPA.....	58

Figura 8 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.500G>A.....	65
Figura 9 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.1138G>C. C) Alteração c.1138G>C em homozigose.....	66
Figura 10 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.783A>G.....	66
Figura 11 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.1180G>A.....	67
Figura 12 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.111G>A.....	68
Figura 13 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.245C>A.....	68
Figura 14 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.659A>G.....	69
Figura 15 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.1016C>T.....	70
Figura 16 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.1021C>T.....	70
Figura 17 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.719C>T.....	71
Figura 18 -	Heredograma da família da paciente PAR1308 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a mutação c.719C>T (p.T240M); -, indivíduo negativo para a mutação c.719C>T (p.T240M).....	72
Figura 19 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.434G>A.....	73

Figura 20 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>Parkin</i> . B) Alteração c.1310C>T.....	74
Figura 21 -	Heredograma da família da paciente PAR2285 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduos positivos para a mutação c.1310C>T (p.P437L); - , indivíduos negativos para a mutação c.1310C>T (p.P437L).....	74
Figura 22 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>PINK1</i> . B) Alteração c.1018G>A.....	76
Figura 23 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>PINK1</i> . B) Alteração c.1173T>C.....	76
Figura 24 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>PINK1</i> . B) Alteração c.1426G>A.....	77
Figura 25 -	Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene <i>PINK1</i> . B) Alteração c.1562A>C.....	77
Figura 26 -	Gráfico referente ao paciente PAR2083, portador de uma deleção em heterozigose no exon 1 do gene <i>PINK1</i> (seta azul), gerado pelo programa <i>Coffalyser</i>	79
Figura 27 -	Heredograma da família do paciente PAR2083 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção do exon 1 no gene <i>PINK1</i> ; - , indivíduos não-portadores da deleção do exon 1 no gene <i>PINK1</i>	80
Figura 28 -	Gráfico referente ao paciente PAR2099, portador de uma deleção em heterozigose no exon 4 do gene <i>Parkin</i> (seta azul), gerado pelo programa <i>Coffalyser</i>	81
Figura 29 -	Heredograma da família do paciente PAR2099 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção em heterozigose no exon 4 do gene <i>Parkin</i> ; - , indivíduos não-portadores da deleção do exon 4 no gene <i>Parkin</i>	81
Figura 30 -	Gráfico referente à paciente PAR2256, portadora de uma duplicação em heterozigose no exon 4 do gene <i>Parkin</i> (seta azul), gerado pelo programa <i>Coffalyser</i>	82

Figura 31 -	Gráfico referente à paciente PAR3380, portadora de uma deleção em homozigose no exon 4 do gene <i>Parkin</i> (seta azul), gerado pelo programa <i>Coffalyser</i>	83
Figura 32 -	Heredograma da família da paciente PAR3380 (seta). (IM), idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção em homozigose no exon 4 do gene <i>Parkin</i>	83
Figura 33 -	Heredograma da família do paciente PAR2396 (seta). (IM), idade de manifestação da DP; +, indivíduo portador de duplicação no exon 3 e de deleção dos exons 5 e 6 no gene <i>Parkin</i>	84
Figura 34 -	Gráfico referente ao paciente PAR2396, portador de uma duplicação no exon 3 e de uma deleção nos exons 5 e 6 do gene <i>Parkin</i> (setas azuis), gerado pelo programa <i>Coffalyser</i>	85
Figura 35 -	Sequência da proteína Parkin na região da alteração <i>missense</i> p.K220R, alinhada com ortólogos de <i>Pan troglodytes</i> , <i>Macaca mulatta</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Monodelphis domestica</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> e <i>Drosophila melanogaster</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Loci</i> e genes ligados à DP familiar.....	21
Tabela 2 -	Frequência de mutações no gene <i>DJ-1</i> em diferentes populações....	29
Tabela 3 -	Frequência de mutações no gene <i>PINK1</i> em diferentes populações.....	34
Tabela 4 -	Frequência de mutações no gene <i>Parkin</i> em diferentes populações..	40
Tabela 5 -	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons 1-12 do gene <i>Parkin</i>	48
Tabela 6 -	Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-12 do gene <i>Parkin</i>	49
Tabela 7 -	Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons 1-8 do gene <i>PINK1</i>	53
Tabela 8 -	Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-8 do gene <i>PINK1</i>	55
Tabela 9 -	Variantes de sequência encontradas no gene <i>Parkin</i> e suas características principais.....	64
Tabela 10 -	Variantes de sequência encontradas no gene <i>PINK1</i> e suas características principais.....	75
Tabela 11 -	Alterações de dosagem encontradas nos genes <i>Parkin</i> e <i>PINK1</i> através da técnica de MLPA em 129 pacientes brasileiros com DP precoce analisados.....	78
Tabela 12 -	Variantes genéticas patogênicas ou potencialmente patogênicas identificadas nos genes <i>Parkin</i> e <i>PINK1</i> em 136 pacientes brasileiros com DP precoce.....	86
Tabela 13 -	Frequência de mutações de ponto encontradas no gene <i>Parkin</i> em diferentes populações.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AD	Autossômica dominante
<i>ALB</i>	Gene <i>albumina</i>
AR	Autossômica recessiva
<i>ATP13A2</i>	Gene <i>ATPase type 13A2</i>
<i>BST1</i>	Gene <i>Bone marrow stromal cell antigen 1</i>
C	Citosina
°C	Grau Celsius
CNVs	<i>Copy number variations</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
C-terminal	Carboxiterminal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DP	Doença de Parkinson
<i>DJ-1</i>	Oncogene <i>DJ-1</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
<i>FBX07</i>	Gene <i>F-Box Only Protein 7</i>
G	Guanina
<i>GAK</i>	Gene <i>Cyclin G associated kinase</i>
<i>GBA</i>	Gene da glucocerebrosidase
<i>GIGYF2</i>	Gene <i>GRB10-Interacting GYF Protein</i>
<i>HLA</i>	Gene <i>Major histocompatibility complex</i>
<i>HTRA2</i>	Gene <i>HTRA serine peptidase 2</i>
IBR	Domínio entre domínios <i>ring</i>
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IINEURO	Instituto Integrado de Neurociências
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
<i>LRRK2</i>	Gene <i>leucin-rich repeat kinase 2</i>
<i>MAPT</i>	Gene <i>Microtubule-associated protein tau</i>

Mb	Megabase
mL	Militro
MLPA	<i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification</i>
mM	Milimolar
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
N-terminal	Amino-terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
p	Braço curto de um cromossomo
pb	Par de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>PINK1</i>	Gene <i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
<i>PLA2G6</i>	Gene <i>Group VI Phospholipase A2</i>
<i>PRKN</i>	Gene <i>Parkin</i>
q	Braço longo de um cromossomo
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rotações por minuto
<i>SAT1</i>	Gene <i>Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1</i>
<i>SNCA</i>	Gene da α -sinucleína
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOD	Superóxido desmutase 1
T	Timina
TBE	Tampão tris-ácido bórico-EDTA
TRAP1	Proteína associada ao receptor TNF-1
Tris	Trihidroximetil aminometano
U	Unidade
UBL	Domínio <i>ubiquitin-like</i>
<i>UCHL1</i>	Gene <i>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1</i>

UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UPS	<i>Ubiquitin Proteasome System</i>
V	Volt
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ng	Nanograma
pmol	Picomol

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	44
2	METODOLOGIA	45
2.1	Pacientes	45
2.2	Extração de DNA genômico	46
2.3	Estimativa da concentração e da integridade do DNA	46
2.4	Análise qualitativa	47
2.4.1	<u>Rastreamento de mutações no gene <i>Parkin</i></u>	47
2.4.1.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	47
2.4.1.2	Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação	49
2.4.1.3	Purificação dos produtos da PCR.....	50
2.4.1.4	Sequenciamento automático.....	50
2.4.1.5	Ferramentas eletrônicas.....	51
2.4.2	<u>Rastreamento de mutações no gene <i>PINK1</i></u>	52
2.4.2.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	52
2.5	Análise quantitativa	55
2.5.1	<u>MLPA</u>	55
2.5.2	<u>PCR quantitativo (qPCR)</u>	60
2.5.2.1	Teste de diluição de DNA.....	61
2.5.2.2	Análise dos dados obtidos.....	62
3	RESULTADOS	63
3.1	Análise qualitativa – Sequenciamento automático	63
3.2	Características das variantes encontradas no gene <i>Parkin</i>	65
3.3	Características das variantes encontradas no gene <i>PINK1</i>	75
3.4	Análise quantitativa – MLPA	78
4	DISCUSSÃO	86
5	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100

APÊNDICE A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i> , <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais.....	112
APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of <i>SNCA</i> , <i>PARKIN</i> , <i>PINK1</i> and <i>DJ-1</i> genes.....	118
APÊNDICE C - Genetic analysis of <i>PARKIN</i> and <i>PINK1</i> genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease.....	124
ANEXO A – Termo de consentimento dos pacientes.....	144
ANEXO B – Carta do Comitê de Ética em Pesquisa.....	145

INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) é uma das desordens neurodegenerativas mais comuns associada ao envelhecimento (de Lau & Breteler, 2006), sendo sua incidência semelhante nas diferentes populações (Bekris *et al.*, 2010) e alcançando cerca de 2% dos indivíduos aos 70 anos (Wood-Kaczmar *et al.*, 2006). É uma doença caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos nigrais nos gânglios basais (de Rijk *et al.*, 1997) e pela presença de inclusões proteicas citoplasmáticas denominadas corpúsculos e neuritos de Lewy nos neurônios sobreviventes (Forno, 1996). O curso da DP pode ser subdividido em duas fases, uma pré-sintomática e outra sintomática, e progride em seis estágios neuropatológicos (Braak *et al.*, 2004). A fase pré-sintomática, que compreende os estágios 1 e 2, é marcada pelo surgimento dos corpúsculos e neuritos de Lewy no cérebro de indivíduos assintomáticos, especificamente no tronco cerebral inferior, no núcleo motor dorsal do nervo vago e no núcleo olfativo anterior. A partir do estágio 3 (fase sintomática), estas inclusões proteicas são encontradas na substância negra, sendo este o estágio no qual se iniciam os primeiros sintomas motores clássicos, e nos estágios mais avançados da doença elas são visualizadas também no córtex cerebral (Braak *et al.*, 2003; 2004) (**Figura 1**).

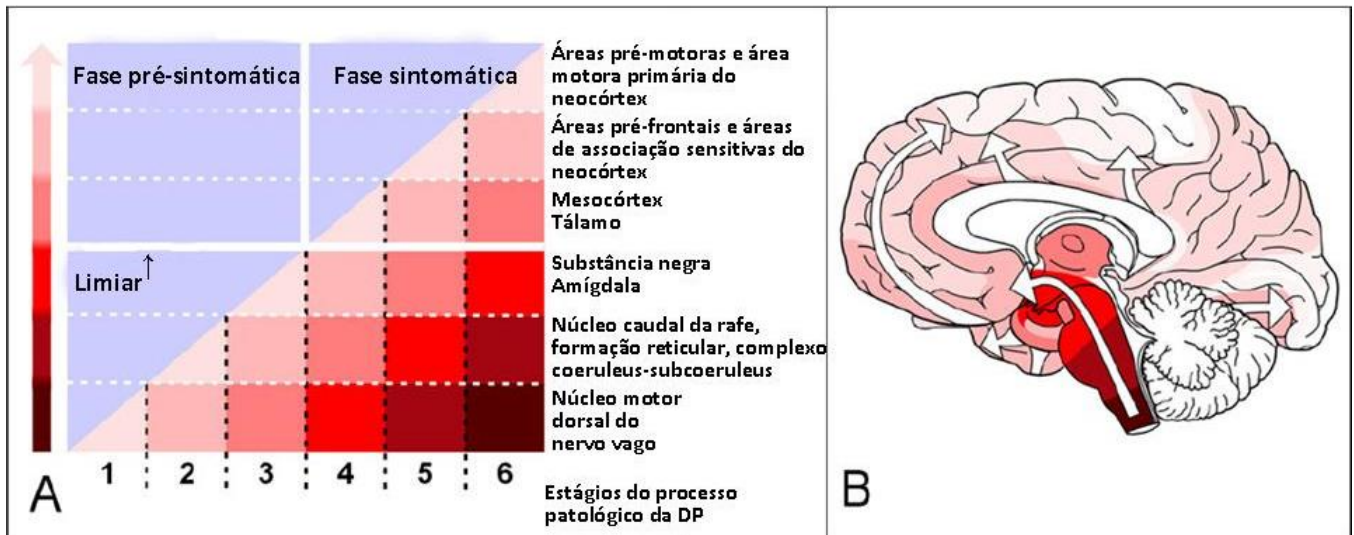


Figura 1: A) Representação das fases pré-sintomática e sintomática da DP. A fase pré-sintomática é marcada pelo surgimento dos corpúsculos e neuritos de Lewy no cérebro de indivíduos assintomáticos. Na fase sintomática, o limiar neuropatológico é excedido (seta preta). O aumento da inclinação e da intensidade das áreas coloridas abaixo da diagonal indicam a gravidade crescente da patologia nas distintas regiões cerebrais. **B)** Diagrama mostrando o processo patológico ascendente (setas brancas). A intensidade do sombreado das áreas coloridas corresponde à da figura 1A (**Fonte:** Braak *et al.*, 2004).

A DP é tipicamente uma desordem de início tardio de maior incidência no sexo masculino, com idade média de manifestação aos 55 anos (Dauer & Przedborski, 2003), embora 4% dos pacientes a desenvolvam antes dos 50 anos de idade (Van Den Eeden *et al.*, 2003). Clinicamente, pacientes com DP são reconhecidos por exibir sintomas motores clássicos como tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural, além de apresentarem também sintomas não motores (ex: constipação, perda do olfato, distúrbios do sono) que precedem as manifestações motoras. A etiologia da DP é pouco conhecida, sendo considerada, na maioria dos casos, idiopática. Entretanto, existem evidências que sugerem que tanto fatores hereditários como ambientais exerçam uma função no desenvolvimento da DP. Conhecimentos alcançados nos últimos 15 anos sobre a base genética da DP demonstram, claramente, que os fatores genéticos desempenham um importante papel na etiologia desta desordem, evidenciados pela agregação familiar, por estudos de associação genética e pela identificação de famílias com uma clara herança mendeliana da doença (Duvoisin, 1998). Estas evidências surgiram a partir de 1997, com a descoberta de mutações *missense* patogênicas no gene *SNCA* (*α-synuclein*), que segregavam de forma autossômica

dominante em algumas famílias com DP (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Embora a maioria dos casos de DP seja esporádico, pelo menos 16 diferentes *loci* cromossômicos (PARK1 a PARK16) têm sido identificados e neles mapeiam, dentre outros, cinco genes conclusivamente reconhecidos como causas autossômicas dominantes ou recessivas da doença: *SNCA*, *LRRK2*, *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Bonifati *et al.*, 2003; Zimprich *et al.*, 2004; Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004a) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Loci e genes ligados à DP familiar.

Locus gênico (posição cromossômica)	Gene *	Modo de herança **	Manifestação da DP	OMIM® ***
PARK1 (=PARK4) (4q21)	<i>SNCA</i>	AD	precoce/tardia	168601
PARK2 (6q25-q27)	<i>Parkin</i>	AR	juvenil/precoce	600116
PARK3 (2p13)	-	AD	tardia	602404
PARK5 (4p14)	<i>UCHL1</i>	AD	tardia	191342
PARK6 (1p35-p36)	<i>PINK1</i>	AR	precoce	608309
PARK7 (1p36)	<i>DJ-1</i>	AR	precoce	602533
PARK8 (12q12)	<i>LRRK2</i>	AD	tardia	607060
PARK9 (1p36)	<i>ATP13A2</i>	AR	precoce	606693
PARK10 (1p32)	-	-	tardia	606852
PARK11 (2q36-q37)	<i>GIGYF2</i>	AD	tardia	607688
PARK12 (Xq21-q25)	<i>SAT1</i>	Ligada ao X	tardia	300557
PARK13 (2p12)	<i>HTRA2</i>	AD	tardia	606441
PARK14 (22q13)	<i>PLA2G6</i>	AR	precoce	612953
PARK15 (22q12-q13)	<i>FBX07</i>	AR	precoce	260300
PARK16 (1q32)	-	-	-	613164

* *SNCA*, α -Synuclein; *PINK1*, *PTEN-Induced Putative Kinase 1*; *DJ-1*, oncogene *DJ-1*; *LRRK2*, *Leucin-Rich Repeat Kinase 2*; *ATP13A2*, *ATPase type 13A2*; *UCHL1*, *Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1*; *GIGYF2*, *GRB10-Interacting GYF Protein*; *HTRA2*, *HTRA Serine Peptidase 2*; *PLA2G6*, *Group VI Phospholipase A2*; *FBX07*, *F-Box Only Protein 7*; *SAT1*, *spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1*.

** AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva.

*** OMIM®, *Online Mendelian Inheritance in Man*®.

Fonte: Adaptado de Schulte & Gasser, 2011 e Crosiers *et al.*, 2011.

Além dos fatores genéticos monogênicos, existe uma hipótese que propõe que doenças neurológicas mais frequentes, como a DP, podem ser determinadas pelo efeito de variantes genéticas comuns na população (Bonifati, 2010). Essas variantes genéticas comuns (SNPs) podem representar fatores de suscetibilidade ou modificadores da enfermidade, afetando a penetrância, a idade de manifestação, a severidade e a progressão da doença. Recentemente, variantes genéticas comuns na população foram identificadas como sendo fatores de risco genético para o desenvolvimento da DP. Análises de alta densidade de SNPs permitiram a identificação de fatores de suscetibilidade em amplos estudos de associação genômica, onde as frequências de alelos de risco candidatos foram comparadas em pacientes e indivíduos controles saudáveis. Três importantes estudos de associação genômica (Satake *et al.*, 2009; Simón-Sánchez *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010), realizados em populações asiáticas, européias e norte-americanas, encontraram uma forte associação de SNPs localizados nos genes *LRRK2* e *SNCA*, além do novo *locus* PARK16, com a DP. Para isso, esses estudos genotiparam mais de 500.000 SNPs e detectaram a região cromossômica contendo o gene *SNCA* como sendo o principal *locus* de suscetibilidade para a DP entre as populações estudadas. Além desses, os estudos de associação já identificaram outros fatores de risco para a DP em *locus* como *GBA*, *MAPT*, *BST1*, *GAK* e *HLA*.

As variantes genéticas associadas com a DP podem ser agrupadas em três categorias principais: 1) alelos raros que conferem alto risco e correspondem às formas mendelianas da DP; 2) alelos de baixa frequência que conferem risco intermediário para a DP; e 3) alelos comuns que isoladamente conferem risco baixo de predisposição à DP (**Figura 2**).

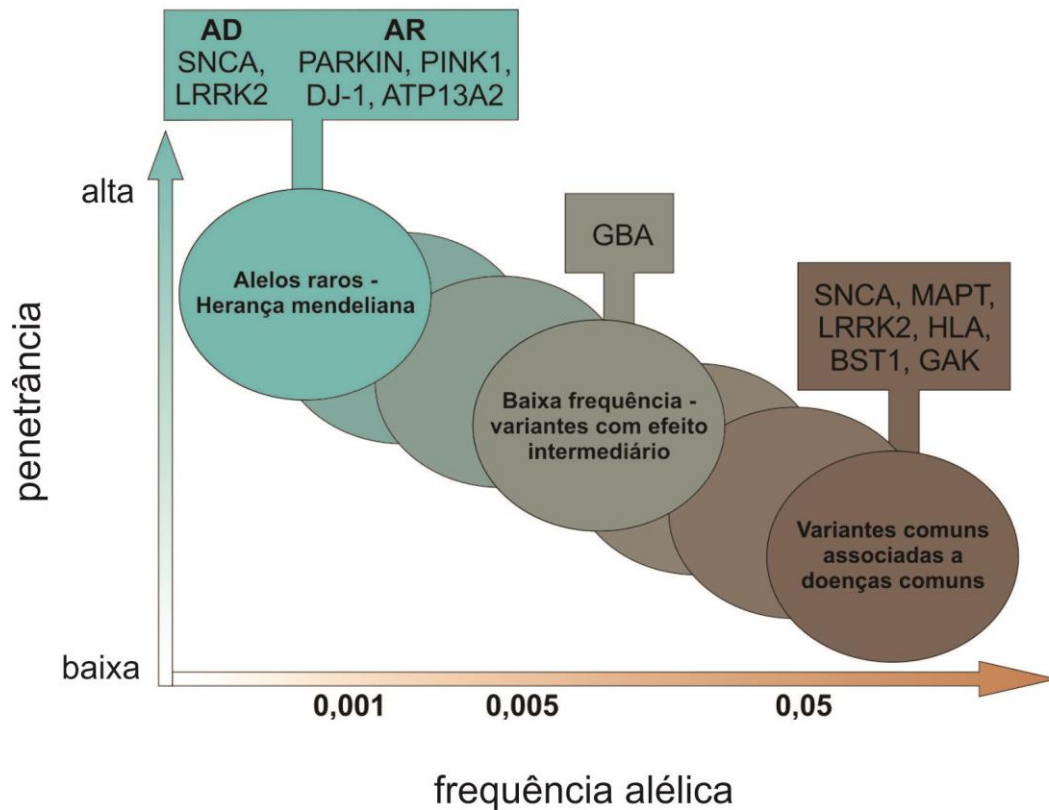


Figura 2: Principais categorias onde estão enquadrados os fatores de risco genéticos associados à DP.

Vias metabólicas e genes envolvidos na DP

Algumas vias metabólicas estão comprometidas na DP e levam ao quadro clínico característico da doença. Dados da literatura sinalizam que mutações nos genes associados a formas monogênicas da DP comprometem algumas dessas vias, como a dinâmica de vesículas e agregação de proteínas (α -sinucleína), o sistema ubiquitina-proteossomo (*Parkin*, *DJ-1* e *UCHL1*), a via de sinalização celular e fosforilação proteica (*LRRK2*), o estresse oxidativo e a função mitocondrial (*DJ-1*, *PINK1*, *Parkin* e *HTRA2*) e a via lisossômica (*GBA* e *ATP13A2*) (Farrer, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006). De alguma forma, estes mecanismos distintos acabam se sobrepondo, pois todos levam à disfunção associada à idade e a morte dos neurônios dopaminérgicos que caracterizam a DP (**Figura 3**).

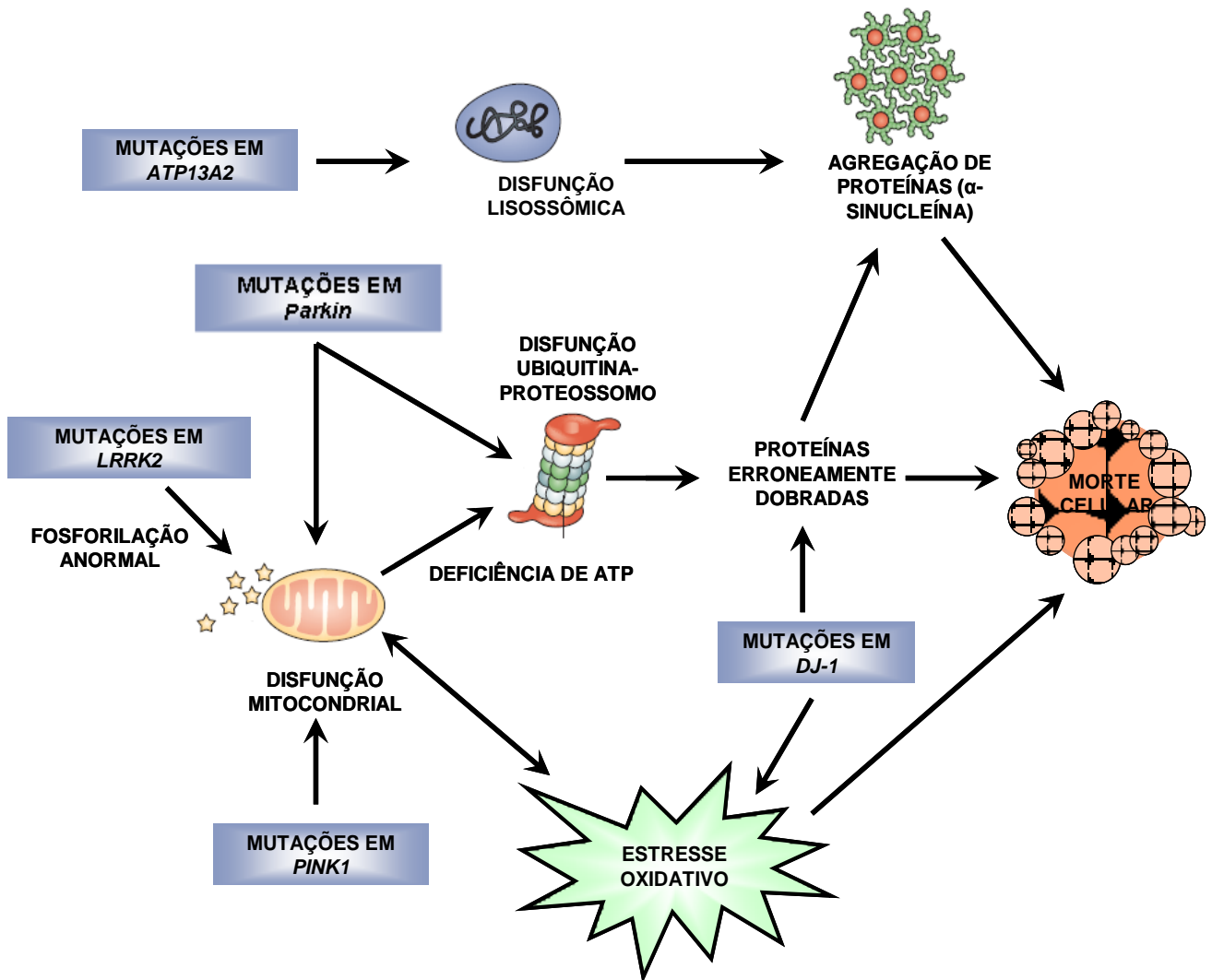


Figura 3: Vias metabólicas comprometidas e envolvidas na patogênese da DP (Fonte: Adaptado de Farrer, 2006; Wood-Kaczmar *et al.*, 2006; Thomas & Beal, 2007).

Os genes *LRRK2* e *PINK1* codificam proteínas quinases, que são constituintes de uma cascata de segundos mensageiros que influenciam a fosforilação de outras proteínas que acumulam em um estágio final da DP. Alvos indiretos dessas proteínas têm sido propostos e incluem a α -sinucleína e a proteína tau, espécies fosforiladas que estão associadas com a toxicidade e a formação de corpúsculos de Lewy e emaranhados neurofibrilares (Farrer, 2006). O acúmulo de α -sinucleína na célula neuronal é um dos passos cruciais na patogênese da DP e o principal constituinte dos corpúsculos de Lewy (Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

PINK1 também está envolvida na função normal da mitocôndria, assim como DJ-1, e essas proteínas protegem a célula contra o estresse oxidativo (Shen & Cookson, 2004). Além disso, DJ-1 previne o dobramento incorreto de proteínas, função esta que é mediada por moléculas chaperonas (Wood-Kaczmar *et al.*, 2006).

Em outro mecanismo associado à DP, Parkin e UCHL1 estão intimamente relacionadas com a ubiquitinação e degradação proteica através do sistema ubiquitina-proteossomo (UPS). Um exemplo disso é o da α -sinucleína, que possui uma grande propensão a formar extensos agregados que podem ser metabolizados pelo UPS. Uma vez que a via de degradação lisossomal também pode remover agregados de α -sinucleína através da autofagia, a disfunção lisossômica, causada por mutações nos genes *ATP13A2* e/ou *GBA*, contribui para o acúmulo desta proteína na célula neuronal levando à patogênese da DP (Aharon-Peretz *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2008).

O Estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a DP

A idéia de uma disfunção mitocondrial como mecanismo patogênico na DP surgiu a partir da associação do composto químico 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) com parkinsonismo. No início dos anos 80, alguns usuários de drogas desenvolveram rapidamente uma síndrome parkinsoniana progressiva, quase que indistinguível à DP clássica (Langston *et al.*, 1983). Nestes indivíduos, até mesmo a resposta benéfica e o desenvolvimento de complicações motoras a longo prazo após a administração de levodopa foram virtualmente idênticos ao observado em pacientes com DP. Posteriormente, foi estabelecido que o 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺), metabólito neurotóxico ativo do composto MPTP, se acumula na matriz mitocondrial inibindo a fosforilação oxidativa (Przedborski *et al.*, 2004).

Achados produzidos através da neurotoxina parkinsoniana MPTP indicam que as perturbações celulares iniciais incluem a inibição da cadeia respiratória mitocondrial. De fato, logo após a administração sistêmica de MPTP em camundongos, o metabólito ativo MPP⁺ se concentra na matriz mitocondrial, onde se liga ao complexo I da cadeia de transporte de elétrons (Przedborski *et al.*, 2004). Com isso, acredita-se que, em resposta à ligação de MPP⁺ ao complexo I, o fluxo de

elétrons da cadeia respiratória é prejudicado, levando à crise energética e ao estresse oxidativo e, finalmente, à morte neuronal. A relação direta entre a disfunção mitocondrial e a DP veio através da descrição *post-mortem* da deficiência do complexo I na parte compacta da substância negra de pacientes com parkinsonismo (Schapira *et al.*, 1990).

Com exceção de alguns casos nos quais a clínica do parkinsonismo está associada com uma mutação no DNA mitocondrial, estudos pré-clínicos e clínicos não conseguiram identificar qualquer mutação genética nos genes que codificam proteínas da cadeia transportadora de elétrons em pacientes com DP (Vives-Bauza *et al.*, 2009). Em contrapartida, já foram descobertas diversas mutações nos genes nucleares *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*, responsáveis pelo parkinsonismo de herança recessiva, que estão associadas a formas familiares de DP precoce e com a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo.

PARK7: gene DJ-1

O gene *DJ-1* contém sete exons, distribuídos em 24 kb, e está localizado em 1p36 (Bonifati *et al.*, 2003) (**Figura 4A**). Ele é amplamente expresso em diversos tecidos, como fígado, músculo esquelético e rins, e no cérebro ocorre um alto nível de expressão nas regiões que são mais afetadas na DP (Bonifati *et al.*, 2003).

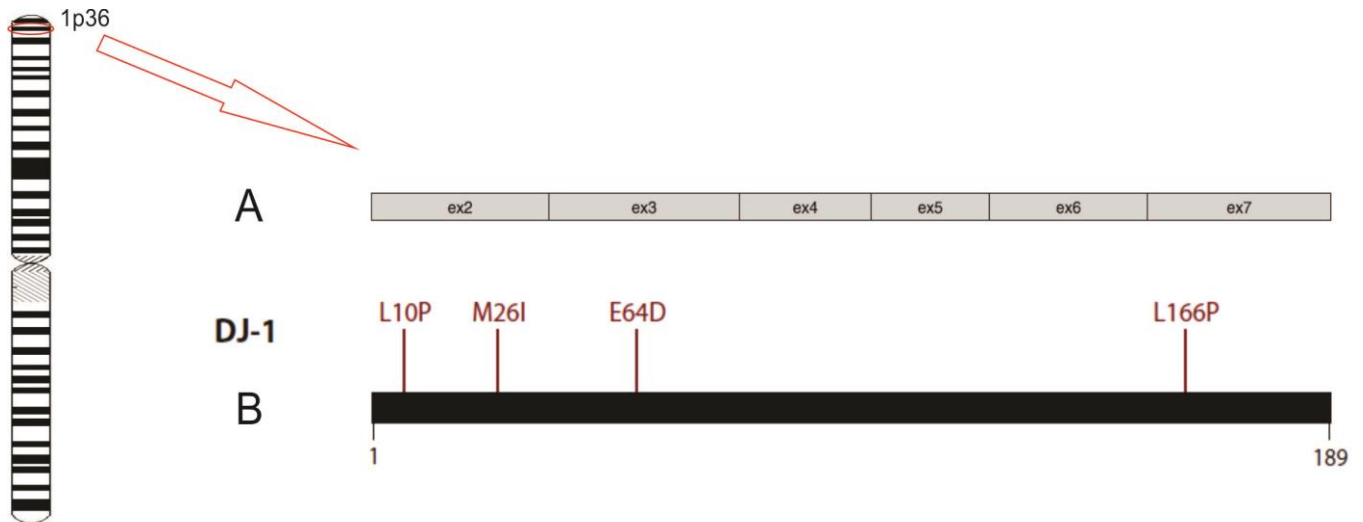


Figura 4: **A)** Representação esquemática de *DJ-1* no nível transcrito; **B)** Único domínio funcional da proteína *DJ-1* que possui 189 aminoácidos e é membro da família ThiJ/Pfp1 de moléculas chaperonas que são induzidas durante o estresse oxidativo; Os números abaixo da proteína indicam os limites do domínio; As mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho na sua posição aproximada ao longo da proteína (**Fonte:** Corti *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011).

O produto do gene *DJ-1* é uma proteína multifuncional, membro da família ThiJ/Pfp1 de moléculas chaperonas, composta de 189 aminoácidos (**Figura 4B**) que se apresenta na forma de um dímero (Bonifati *et al.*, 2003). Sob condições normais, a proteína *DJ-1* está localizada principalmente no citosol, e apenas uma parte está presente no núcleo, na matriz mitocondrial e no espaço intermembrana das mitocôndrias (Zhang *et al.*, 2005). No entanto, sob condições de estresse oxidativo, *DJ-1* é redistribuída e translocada para as mitocôndrias agindo como um sensor redox neuroprotetor ou como uma proteína antioxidante (Mitsumoto & Nakagawa, 2001; Canet-Avilés *et al.*, 2004). Outras funções também já foram atribuídas à *DJ-1* que envolvem regulação transcricional e transformação celular (Junn *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2011). Uma baixa regulação deste gene através de RNA de interferência em linhagens celulares neuronais aumentou a morte celular por estresse oxidativo (Yokota *et al.*, 2003). Com a inibição de *DJ-1 α* na *Drosophila*, um ortólogo do gene *DJ-1* humano, ocorreu o acúmulo celular de ROS, hipersensibilidade ao estresse oxidativo e disfunção e degeneração de neurônios dopaminérgicos (Yang *et al.*, 2005). A deleção ou silenciamento de *DJ-1* tem sido

relatada para sensibilizar as células ao estresse oxidativo e a superexpressão para protegê-las contra os radicais livres (Yokota *et al.*, 2003).

A proteína DJ-1 participa da regulação da dinâmica mitocondrial, de uma forma paralela à via das proteínas Parkin/PINK1, para manter a homeostase mitocondrial em um ambiente oxidativo (Moore *et al.*, 2005; Zhuge & Cederbaum, 2009; Irrcher *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011). Sendo assim, Parkin, PINK1 e DJ-1 devem cooperar em diferentes níveis para a manutenção da integridade e função mitocondrial.

O gene *DJ-1* foi inicialmente descrito em associação com oncogênese (Nagakubo *et al.*, 1997) e infertilidade em ratos machos (Cookson, 2003). Posteriormente, Bonifati e colaboradores (2003) identificaram duas alterações em *DJ-1*, uma deleção e uma mutação de ponto, em duas famílias consanguíneas da Holanda e da Itália, ambas com DP autossômica recessiva de início precoce. Os autores verificaram que os pacientes parkinsonianos com mutações em *DJ-1* possuíam uma progressão lenta da doença, respondiam bem ao tratamento com levodopa e desenvolviam distonia (Bonifati *et al.*, 2003), que é o congelamento dos movimentos devido a contrações musculares involuntárias, lentas e repetitivas.

Após o estudo de Bonifati e colaboradores (2003), mutações pontuais e de dosagem foram rastreadas em diferentes etnias por todo o mundo (Djarmati *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2009; Tomiyama *et al.*, 2009). Entretanto, essas mutações são eventos raros, sendo responsáveis por <1% do parkinsonismo de início precoce (Klein *et al.*, 2005; Pankratz *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008; Nuytemans *et al.*, 2009) (**Tabela 2**).

Até o momento, não existem dados sobre a frequência de mutações em *DJ-1* em populações latino-americanas, especialmente a brasileira. Segundo uma revisão sistemática realizada por Kilarski e colaboradores (2012), onde foram incluídos 15 diferentes estudos populacionais publicados entre 2000 e 2011 em 1.351 pacientes com DP, foi encontrada uma frequência mutacional global de 0,4% no gene *DJ-1*. Poucos trabalhos rastrearam mutações em *DJ-1* em grandes coortes de pacientes com DP familiar e esporádica e, por esse motivo, é possível que a frequência de alterações nesse gene seja subestimada.

Tabela 2: Frequência de mutações no gene *DJ-1* em diferentes populações.

População (referências)	Amostra (n)	Familiar (n)	Isolado (n)	Corte	Alterações encontradas n (%)
Sérvios (Djarmati <i>et al.</i> , 2004)	75	18	57	<45 a	0 (0)* 1 (1,3)**
Italianos (Klein <i>et al.</i> , 2005)	65	3	62	≤51 a	0 (0)* 0 (0)**
Norte-americanos (Pankratz <i>et al.</i> , 2006)	93	-	-	≤45 a	0 (0)* 0 (0)**
Taiwaneses (Lee <i>et al.</i> , 2009)	68	10	58	<50 a	0 (0)* 0 (0)**
Coreanos (Choi <i>et al.</i> , 2008)	72	12	60	≤50 a	0 (0)* 0 (0)**
Japoneses (Tomiyama <i>et al.</i> , 2009)	371	157	201	-	0 (0)*
Belgas (Nuytemans <i>et al.</i> , 2009)	310	-	-	-	2 (0,6)* 0 (0)**
Holandeses (Macedo <i>et al.</i> , 2009)	187	50	137	≤50 a	2 (1)* 1 (0,5)**
Ingleses (Kilarski <i>et al.</i> , 2012)	136	29	107	<45 a	0 (0)* 0 (0)**

(n), número de pacientes analisados; a, anos; *CNV, variação no nº de cópias; **VS, variantes de sequência

PARK6: gene PINK1

O gene *PINK1* (*protein-induced putative kinase 1*) está localizado em 1p35-p36 e contém 8 exons que compreendem, aproximadamente, 1,8 kb (Valente *et al.*, 2004a) (**Figura 5A**). Este gene codifica uma proteína de 581 aminoácidos com uma massa molecular de 62,8 kDa, que apresenta 95% de similaridade entre a forma humana e a do camundongo (Unoki & Nakamura, 2001; Nakajima *et al.*, 2003) (**Figura 5B**). Após a tradução, a proteína PINK1 é importada para a mitocôndria, onde será processada para sua forma ativa e se localizará nas membranas e na matriz mitocondrial (Gandhi *et al.*, 2006). PINK1 possui um domínio N-terminal mitocondrial, um domínio quinase, altamente conservado, que possui um elevado grau de homologia com as quinases serina/treonina da família Ca^{2+} /calmodulina e um domínio C-terminal auto-regulatório (Valente *et al.*, 2004a; Silvestri *et al.*, 2005; Schiesling *et al.*, 2008). A proteína PINK1 selvagem tem um efeito neuroprotetor por fosforilar proteínas mitocondriais específicas e modular suas funções (Beilina *et al.*, 2005; Cookson, 2005; Silvestri *et al.*, 2005). A inativação do ortólogo de *PINK1* em *Drosophila*, mediada por RNA de interferência, resultou na perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, que foi suprimida pelo antioxidante humano superóxido desmutase 1 (SOD), sugerindo que a inativação de *PINK1* pode induzir a morte neuronal via estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2006).

Estudos bioquímicos e morfológicos, utilizando *Drosophila melanogaster*, sugeriram que as proteínas PINK1 e Parkin estão envolvidas, através de uma via metabólica comum, na manutenção da função e dinâmica mitocondriais e que PINK1 atua a montante de Parkin (Clark *et al.*, 2006b; Park *et al.*, 2006). É sabido que as proteínas Parkin e PINK1 operam nos processos altamente regulados de fissão e fusão mitocondrial, que são críticos para a manutenção da mitocôndria (especialmente em neurônios). Um desequilíbrio nesta maquinaria mitocondrial tem sido cada vez mais associado à neurodegeneração (Chan, 2006).

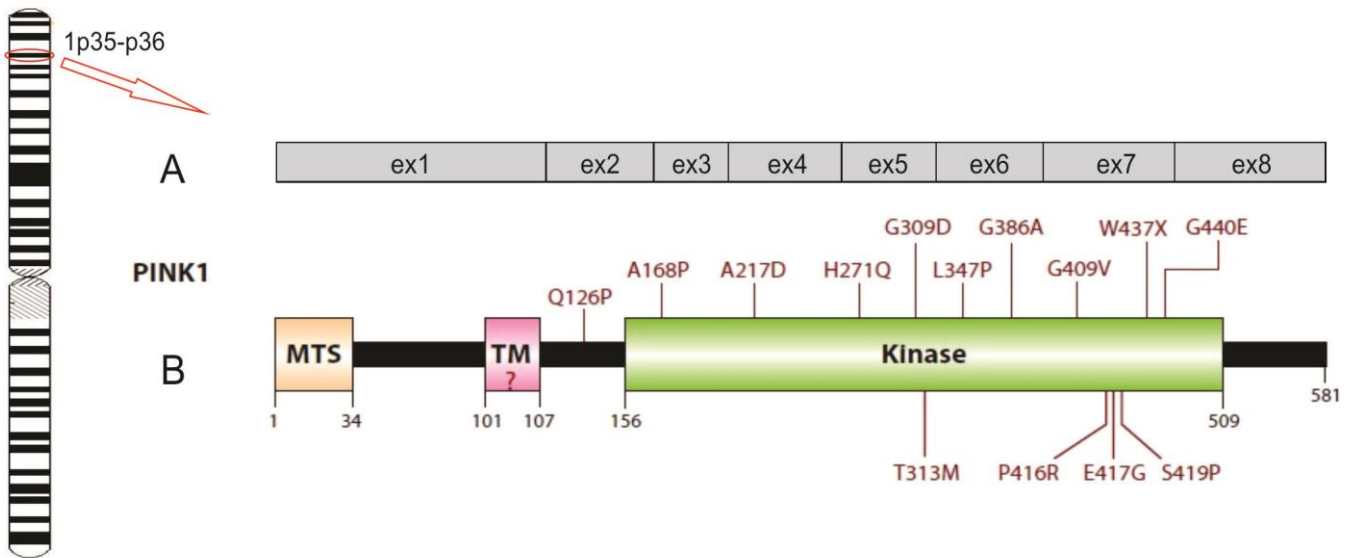


Figura 5: A) Representação esquemática de *PINK1* no nível transcrito; **B)** Domínios funcionais da proteína *PINK1* que possui 581 aminoácidos; MTS – domínio de ligação à mitocôndria; TM – provável domínio transmembrana; Kinase – domínio Kinase serina/treonina; Números abaixo da proteína indicam os limites dos domínios; Mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho em sua posição aproximada ao longo da proteína (**Fonte:** Corti *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011).

Evidências recentes também sugerem que *PINK1* desempenha um papel no controle de qualidade mitocondrial através da autofagia (neste caso mitofagia), juntamente com *Parkin*. O acúmulo de *PINK1*, devido ao baixo potencial de membrana mitocondrial, induz o recrutamento de *Parkin* para as mitocôndrias despolarizadas e, subsequentemente, estas mitocôndrias anormais serão eliminadas por mitofagia (Kawajiri *et al.*, 2011). Além disso, foi visto que *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* formam um complexo ubiquitina E3 ligase que promove a degradação de proteínas malformadas (Xiong *et al.*, 2009).

Alguns substratos de *PINK1* já foram identificados como a proteína associada ao receptor *TNF-1* (*TRAP1*), que é uma chaperona mitocondrial que quando fosforilada por *PINK1* pode fornecer proteção contra a apoptose induzida por estresse oxidativo (Pridgeon *et al.*, 2007). *Parkin* é outro provável substrato de *PINK1*. Sua região de ligação é fosforilada por *PINK1* promovendo, assim, sua translocação mitocondrial (Kim *et al.*, 2008).

Variantes patogênicas no gene *PINK1*

Duas mutações no gene *PINK1* foram, inicialmente, detectadas em três famílias consanguíneas com DP de início precoce (Valente *et al.*, 2004a). Desde então, mutações *missense*, *nonsense*, pequenas inserções e deleções, rearranjos de exons e até mesmo a deleção completa do gene *PINK1* foram confirmadas como causa da DP de início precoce em diferentes etnias com uma frequência que varia de 0-9% (Rogaeva *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004b; Bonifati *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Marongiu *et al.*, 2007; Keyser *et al.*, 2010; Kilarski *et al.*, 2012), constituindo a segunda maior causa de DP de início precoce (**Tabela 3**). A maioria das mutações descritas em *PINK1*, tanto as pontuais como as de dosagem, estão localizadas em regiões codificadoras do domínio funcional serina/treonina quinase da proteína (Klein *et al.*, 2005; Keyser *et al.*, 2010), levando à perda de função.

Em uma revisão sistemática realizada por Kilarski e colaboradores (2012), na qual foram incluídos todos os estudos, entre 2000 e 2011, que investigaram a ocorrência de mutações patogênicas no gene *PINK1* em pacientes com DP, foi demonstrado que mutações em *PINK1* são muito mais comuns em pacientes asiáticos do que em pacientes brancos (13,5% X 0,6%). Além disso, foi constatado que a proporção de casos latino-americanos com variantes em *PINK1* (0,9%) era semelhante à proporção de pacientes de origem branca com alterações neste gene. Curiosamente, mutações em *PINK1* também foram mais propensas a ocorrer no estado homozigoto (~81% comparado a 44% em *Parkin*) (Kilarski *et al.*, 2012).

A taxa de mutações em *PINK1* em pacientes com DP precoce ainda permanece desconhecida, mas estima-se ser população-específica. Dois estudos realizados, majoritariamente, em pacientes italianos encontraram mutações no gene *PINK1* em uma porcentagem relativamente elevada (7% e 6%, respectivamente) (Valente *et al.*, 2004b; Bonifati *et al.*, 2005). Porém, a prevalência de alterações em *PINK1* foi menor ou, até mesmo, ausente em outras populações estudadas (Rogaeva *et al.*, 2004; Bras *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Kumazawa *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2009) (**Tabela 3**). Um estudo em irlandeses identificou apenas um portador heterozigoto entre 290 pacientes com DP não aparentados (Healy *et al.*, 2004). Este resultado da Irlanda pode ser explicado pelo

baixo número de casos de DP precoce analisados (aproximadamente 1/3), mas também pode indicar que a frequência de mutações em *PINK1* varia de acordo com a região da população estudada.

Em nossa população, dois estudos triaram alterações no gene *PINK1* em pacientes com DP precoce (Camargos *et al.*, 2009; Godeiro-Junior *et al.*, 2009). Camargos e colaboradores (2009) analisaram 45 probandos e identificaram uma nova deleção em homozigose no gene *PINK1*, correspondendo a uma taxa mutacional de 2,2%. Os autores sugeriram que, apesar da heterogeneidade genética da população brasileira contemporânea, resultado da mistura de indivíduos de origens européia (principalmente portugueses, mas também italianos, alemães e outras nacionalidades), africana e indígena, a frequência de mutações genéticas em *PINK1* não difere substancialmente das populações de outras áreas geográficas. Outro estudo realizado no Brasil (Godeiro-Junior *et al.*, 2009) não identificou mutações patogênicas no gene *PINK1* em 60 pacientes com DP precoce analisados, apoiando a hipótese de que mutações neste gene podem não ser uma causa relevante de DP precoce entre pacientes brasileiros.

Tabela 3: Frequência de mutações no gene *PINK1* em diferentes populações.

População (referências)	Amostra (n)	Familiar (n)	Isolado (n)	Corte	Alterações encontradas n (%)
Norte-americanos (Rogaeva <i>et al.</i> , 2004)	289	136	153	-	2 (0,7)**
Italianos (Valente <i>et al.</i> , 2004)	100	-	-	<50 a	7 (7)**
Italianos (Klein <i>et al.</i> , 2005)	65	3	62	≤51 a	0 (0)* 3 (4,6)**
Italianos (Bonifati <i>et al.</i> , 2005)	134	18	116	<50 a	8 (6)**
Taiwaneses (Lee <i>et al.</i> , 2008)	68	10	58	<50 a	0 (0)* 3 (4,4)**
Japoneses (Kumazawa <i>et al.</i> , 2008)	391	201	190	-	10 (2,5)**
Caucasianos não-Hispânicos (Brooks <i>et al.</i> , 2009)	250	95	155	-	0 (0)* 1 (0,4)**
Brasileiros (Godeiro-Junior <i>et al.</i> , 2009)	60	25	33	<50 a	0 (0)**
Holandeses (Macedo <i>et al.</i> , 2009)	187	50	137	≤50 a	0 (0)* 2 (1)**
Brasileiros (Camargos <i>et al.</i> , 2009)	45	-	-	≤40 a	1 (2,2)* 0 (0)**
Chineses (Zhang <i>et al.</i> , 2010)	66	14	52	<50 a	0 (0)* 0 (0)**
Indianos (Biswas <i>et al.</i> , 2010)	250	-	-	-	5 (2)**
Africanos (Keyser <i>et al.</i> , 2010)	154	55	99	-	0 (0)* 1 (0,6)**
Ingleses (Kilarski <i>et al.</i> , 2012)	136	29	107	<45 a	0 (0)* 1 (0,7)**

(n), número de pacientes analisados; a, anos; *CNV, variação no nº de cópias; **VS, variantes de sequência

PARK2: gene *Parkin* (PRKN)

O gene *Parkin* possui uma função na biogênese mitocondrial através da regulação da transcrição e replicação do DNA mitocondrial (Kuroda *et al.*, 2006), além de induzir a autofagia de mitocôndrias danificadas (Narendra *et al.*, 2008; 2009). A ausência do gene *parkin* em *Drosophila* leva à patologia mitocondrial e à degeneração muscular apoptótica e, com isso, aumenta a probabilidade de que um prejuízo mitocondrial semelhante ocasione a perda celular seletiva observada em pacientes com DP autossômica recessiva (Greene *et al.*, 2003; Pesah *et al.*, 2004). Apesar de ocorrerem apenas déficits leves, camundongos *knockout* para o gene *Parkin* têm características de disfunção mitocondrial e danos oxidativos (Palacino *et al.*, 2004) e pacientes deficientes em *Parkin* possuem atividade do complexo I da mitocôndria de linfócitos diminuída (Muftuoglu *et al.*, 2004), fornecendo maiores evidências que a perda de função de *Parkin* leva à disfunção mitocondrial. Por outro lado, a superexpressão de *Parkin* em modelos celulares previne o abcesso mitocondrial e a apoptose induzida por *stress* (Cookson, 2005).

A proteína Parkin é essencialmente citosólica, sendo que uma pequena fração pode estar associada a membranas intracelulares como as da mitocôndria (Kuroda *et al.*, 2006), sugerindo que Parkin possa regular proteínas mitocondriais que sejam importantes para a sua própria função. Ela possui 465 aminoácidos e pertence a uma família de proteínas com domínio ubiquitina N-terminal conservado e com dois motivos RING-finger C-terminal (Deshaies & Joazeiro, 2009) (**Figura 6B**).

Parkin compreende aproximadamente 1,38 Mb de extensão (**Figura 6A**) e também está envolvido na degradação proteossômica de proteínas alvo, pois seu produto atua como uma ubiquitina E3 ligase (Shimura *et al.*, 2000).

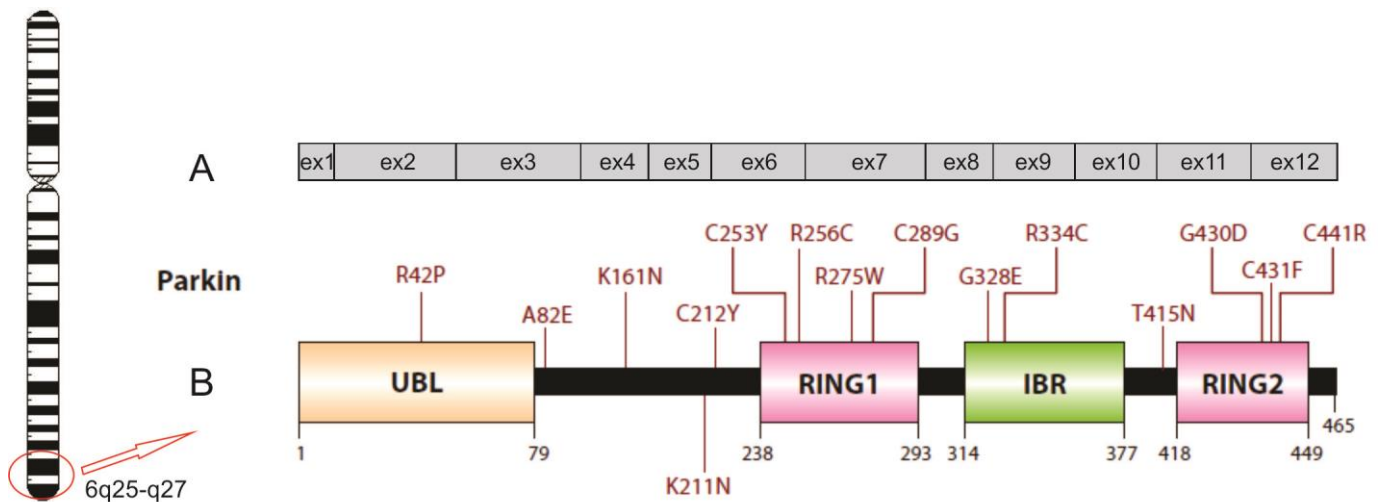


Figura 6: A) Representação esquemática de *Parkin* no nível transcrito; **B)** Domínios funcionais da proteína *Parkin* que possui 465 aminoácidos; UBL – domínio ubiquitina; RING1 e RING2 - domínios RING *finger* separados por um domínio IBR (entre RING); Números abaixo da proteína indicam os limites dos domínios; Mutações que segregam com a DP estão escritas em vermelho em suas posições aproximadas ao longo da proteína (**Fonte:** Corti *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011).

A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos produzida a partir de outras proteínas precursoras que são codificadas no genoma humano. A ubiquitina é covalentemente ligada ao resíduo de lisina de proteínas em um processo chamado ubiquitinação. Este mecanismo ocorre através da transferência de uma molécula de ubiquitina de uma enzima E1 ativada para uma enzima E2, onde uma E3 ligase catalisa a transferência da molécula de ubiquitina de uma enzima E2 para o substrato alvo (Hershko & Ciechanover, 1998). Tem sido demonstrado que *Parkin*, além de mediar a ubiquitinação via lisina 48 (K48), que direciona proteínas ubiquitinadas para a degradação proteossômica, também promove a ubiquitinação via lisina 63 (K63), que desempenha uma função nos processos de sinalização intracelular, além da formação dos corpúsculos de Lewy (Lim *et al.*, 2005).

Mais recentemente, da Costa & Checler (2012) demonstraram uma nova função para a proteína *Parkin* atuando como um fator de transcrição, independentemente de sua atividade de ubiquitina ligase previamente caracterizada. Foi estabelecido que *Parkin* possa agir como um repressor transcricional da proteína

p53 por interagir fisicamente com sua região promotora através do domínio RING1 (da Costa & Checler, 2011).

A proteína Parkin é expressa em processos pré-sinápticos e pós-sinápticos e no corpo celular de muitos neurônios (Schlossmacher *et al.*, 2002). O RNAm de *Parkin* e sua proteína são detectados em estágios embrionários em camundongos e mostram uma distribuição generalizada no sistema nervoso central (SNC) e em outros órgãos, além de apresentarem um aumento considerável durante a metade do período gestacional no SNC, seguido de um acréscimo estável até a maioridade (Biskup *et al.*, 2008). A expressão de Parkin está correlacionada com a maturação celular, o que implica uma função fisiológica de Parkin em vários tipos neuronais (Kuhn *et al.*, 2004).

Pacientes portadores de mutações em *Parkin* costumam manifestar a DP precocemente (antes dos 50 anos), porém o fenótipo da doença geralmente é similar ao de casos esporádicos. Além disso, a doença tende a seguir um curso mais lento e a maioria dos estudos reportaram sintomas mais simétricos, uma boa resposta ao tratamento com levodopa, uma proporção mais alta de distonia e hiperreflexia, e severas complicações motoras relacionadas ao tratamento (Lucking *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2008). A patologia mais observada em portadores de mutações em *Parkin* é a degeneração nigral sem corpúsculos de Lewy, embora poucos casos tenham sido descritos com estes corpúsculos (Wider *et al.*, 2010).

Variantes patogênicas no gene *Parkin*

Mutações no gene *Parkin*, que se localiza em 6q25-q27, foram originalmente identificadas em famílias consanguíneas japonesas com parkinsonismo juvenil, segregando de forma autossômica recessiva (Kitada *et al.*, 1998) e representam a causa mais comum de DP de início precoce, sendo responsáveis por 10 a 20% dos casos (Klein & Schlossmacher, 2006). Mutações em *Parkin* são encontradas em até 50% dos casos familiares de pacientes com DP de manifestação abaixo dos 45 anos de idade (Lucking *et al.*, 2000), além de desempenharem uma função no parkinsonismo esporádico (18%) (Pilcher, 2005; Klein & Schlossmacher, 2007; Klein & Lohmann-Hedrich, 2009).

O grande número e o amplo espectro de mutações em *Parkin* inclui alterações em todos os seus 12 exons (Hedrich *et al.*, 2001) e levam à perda de função associada com a DP. A maioria dos pacientes possui mutação em homozigose, embora uma proporção significativa de heterozigotos tenha sido encontrada, sugerindo que uma alteração em heterozigose pode aumentar o risco de se desenvolver a doença (Klein *et al.*, 2007). O papel de mutações heterozigotas em *Parkin* como causa ou fator de suscetibilidade para a DP permanece controverso (Kay *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2007; Klein & Lohmann-Hedrich, 2007). Vários estudos de casos familiares e esporádicos de DP demonstraram que pacientes com alterações em heterozigose manifestam a doença mais tardiamente e são mais provavelmente representados por casos esporádicos do que pacientes com mutações homozigotas ou heterozigotas compostas (Abbas *et al.*, 1999; Lucking *et al.*, 2000; Hedrich *et al.*, 2002; Foroud *et al.*, 2003; Lohmann *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Periquet *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006). Variantes heterozigotas em *PARK2* também já foram observadas em indivíduos controles saudáveis, o que torna a avaliação da patogenicidade dessas alterações bastante complexa (Nuytemans *et al.*, 2010). Mais de 170 alterações diferentes já foram identificadas ao longo da sequência deste gene, de grande extensão, incluindo amplas deleções e multiplicações, pequenas deleções/inserções, além de mutações *missense* e *nonsense* (Nuytemans *et al.*, 2010). Aproximadamente, 50% dos portadores de mutações em *Parkin* exibem rearranjos de exons (Hedrich *et al.*, 2001), enquanto os outros 50% restantes possuem pequenas alterações.

Sugere-se que a alta frequência de rearranjos exônicos em *Parkin* seja decorrente de seus grandes introns e da presença de numerosos elementos repetitivos que levam à instabilidade (Keyser *et al.*, 2009). Determinadas mutações em *Parkin* prejudicam sua atividade ligase levando ao acúmulo intracelular de seus substratos. Alguns candidatos a substratos de Parkin têm sido identificados e incluem proteínas que estão implicadas na DP, como sinfilina-1 e uma forma glicosilada da α -sinucleína (von Coelln *et al.*, 2004). Este acúmulo de substratos proteicos, potencialmente tóxicos, pode ser prejudicial às células nervosas, especialmente aos neurônios dopaminérgicos.

Estudos epidemiológicos em relação à frequência populacional de mutações no gene *Parkin* já foram conduzidos em diversas amostras de pacientes com DP familiar e esporádica de diferentes etnias e comprovaram que a prevalência de

alterações é população específica (**Tabela 4**). As aparentes discrepâncias entre os resultados ao redor do mundo podem estar relacionadas à heterogeneidade clínica das coortes analisadas, caracterizada por diferentes proporções de casos familiares *versus* casos isolados de DP precoce, além de diferenças na estratificação da idade de manifestação da DP precoce.

Tabela 4: Frequência de mutações no gene *Parkin* em diferentes populações.

População (referências)	Amostra (n)	Familiar (n)	Isolado (n)	Corte	Alterações encontradas n (%)
Chineses (Zhang <i>et al.</i> , 2010)	66	14	52	<50 a	18 (27,3)* 2 (3)**
Chineses (Wu <i>et al.</i> , 2005)	41	7	34	<50 a	2 (4,9)* 3 (7,3)**
Chineses (Wu <i>et al.</i> , 2009)	55	-	55	≤50 a	2 (3,6)* 2 (3,6)**
Hispanicos e não hispanicos (Marder <i>et al.</i> , 2010)	956	140	816	<51 a	33 (3,4)* 31 (3,2)**
Espanhóis (Muñoz <i>et al.</i> , 2002)	37	24	13	≤40 a	1 (2,7)* 6 (16,2)**
Norte-americanos (Pankratz <i>et al.</i> , 2009)	420	420	-	-	11 (2,6)* 13 (3,1)**
Norte-americanos (Clark <i>et al.</i> , 2006)	101	13	88	≤50 a	3 (3)* 10 (10)**
Nigerianos (Okubadejo <i>et al.</i> , 2008)	57	9	48	-	Nenhuma
Sul-africanos (Keyser <i>et al.</i> , 2009)	88	30	58	≤50 a	6 (6,8)*
Brasileiros (Aguiar <i>et al.</i> , 2008)	72	27	41	≤50 a	6 (8,3)* 4 (5,5)**

Continua

(n), número de pacientes analisados; a, anos; *CNV, variação no nº de cópias; **VS, variantes de sequência

População (referências)	Amostra (n)	Familiar (n)	Isolado (n)	Corte	Continuação Alterações encontradas n (%)
Italianos (Klein <i>et al.</i> , 2005)	65	3	62	≤51 a	2 (3)**
Indianos (Vinish <i>et al.</i> , 2010)	69	-	69	-	28 (40,5)* 6 (8,7)**
Americanos (Kay <i>et al.</i> , 2010)	2091	475	1616	-	18 (0,86)*
Poloneses (Gaweda-Walerych <i>et al.</i> , 2012)	104	-	-	≤50 a	1 (1)* 1 (1)**
Ingleses (Kilarski <i>et al.</i> , 2012)	136	29	107	<45 a	6 (4,4)* 4 (2,9)**
Brasileiros (Camargos <i>et al.</i> , 2009)	45	-	-	≤40 a	1 (2,2)* 5 (11,1)**
Portugueses (Bras <i>et al.</i> , 2008)	46	19	27	<50 a	5 (10,8)* 3 (6,5)**

(n), número de pacientes analisados; a, anos; *CNV, variação no nº de cópias; **VS, variantes de sequência

Estudos em pacientes orientais revelou que a frequência de mutações em *Parkin* varia de 3,6% a 27,3% para mutações de dosagem e de 3% a 7,3% para variantes pontuais (Wu *et al.*, 2005; 2009; Zhang *et al.*, 2010) (**Tabela 4**). Zhang e colaboradores (2010) sugeriram que mutações neste gene são comuns em pacientes chineses com DP precoce e são compostas principalmente por rearranjos de exons.

Em um estudo multicêntrico (Marder *et al.*, 2010), que envolveu 13 centros de desordens do movimento, um total de 956 pacientes com DP precoce, de origem hispânica e não-hispânica, foram investigados para alterações quantitativas e qualitativas no gene *Parkin*. Do total, 64 probandos carregavam variantes em *Parkin* (6,7%), sendo as variações no número de cópias (CNVs) as alterações mais frequentes nestes indivíduos (3,4%). Os autores também demonstraram que

mutações em *Parkin*, em particular deleções nos exons 3 e 4 e a variante *frameshift* c.255delA, são comuns entre hispânicos, especificamente porto-riquenhos.

Na Europa, a prevalência de mutações em *Parkin* varia de acordo com a região geográfica estudada. Em um estudo na Espanha foi identificada uma frequência mutacional de aproximadamente 19% entre os 37 casos majoritariamente familiares que foram analisados, sendo 16,2% de alterações de ponto e 2,7% de mutações de dosagem (Muñoz *et al.*, 2002). Diferentemente, Klein e colaboradores (2005) utilizaram uma amostra de casos isolados de DP e encontraram uma baixa frequência de mutações pontuais no gene *Parkin* na população italiana analisada (3%). Em Portugal a frequência de mutações de sequência e de dosagem encontrada foi de 10,8% e 6,5%, respectivamente (Bras *et al.*, 2008).

O rastreamento de alterações no gene *Parkin* também já foi realizado em diferentes populações da América do Norte que identificaram um total de 12,9%, 5,7% e 0,86% de mutações em *Parkin*, respectivamente (Clark *et al.*, 2006; Pankratz *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2010). Pankratz e colaboradores (2009) sugeriram que a porcentagem de indivíduos com mutações em *Parkin* foi maior quando os sintomas começaram mais precocemente. Por outro lado, Kay e colaboradores (2010) constataram que não existe evidência convincente para a associação de alterações no número de cópias em heterozigose no gene *Parkin* com a DP.

No norte da Índia Ocidental, Vinish e colaboradores (2010) analisaram 69 pacientes indianos, todos casos esporádicos de DP, sem corte por idade de manifestação. Do total foram encontradas alterações de dosagem gênica (deleções em homozigose) em 40,5% da amostra triada, além de 8,7% dos pacientes portarem também mutações de ponto, demonstrando assim que variações no número de cópias no gene *Parkin* são bastante comuns na população da Índia.

Estudos em pacientes com DP de origem africana também foram relatados na literatura. Um desses trabalhos, realizado na Nigéria, não identificou qualquer mutação patogênica no gene *Parkin*, embora algumas variantes heterozigotas tanto em pacientes quanto em controles tenham sido encontradas (Okubadejo *et al.*, 2008). Com isso, os autores sugeriram que variantes patogênicas em *Parkin* são uma causa rara de DP nesta população. Outro estudo, conduzido em 88 pacientes da África do Sul, encontrou 6 pacientes com mutações em *Parkin* (6,8%) que possuíam duplicações e deleções em heterozigose ou deleções em homozigose (Keyser *et al.*, 2009). Este trabalho reforçou a importância de se incluir a análise de

dosagem gênica como parte do rastreamento de mutações no gene *Parkin*, uma vez que este tipo de alteração tem sido encontrada com frequência de até 50% em pacientes com DP precoce (Hattori *et al.*, 1998; Hedrich *et al.*, 2004).

Na América Latina os únicos estudos populacionais relacionados ao gene *Parkin* em pacientes com DP precoce foram realizados no Brasil, especificamente na área urbana de São Paulo e no Estado de Minas Gerais, respectivamente (Aguiar *et al.*, 2008; Camargos *et al.*, 2009). Aguiar e colaboradores (2008) investigaram alterações pontuais e de dosagem no gene *Parkin* em 72 pacientes brasileiros com DP precoce (≤ 50 anos), sendo 27 casos familiares e 41 isolados (4 não souberam informar), além de 81 voluntários saudáveis. Os autores encontraram uma frequência total de mutações em *Parkin* de 12,5% nos casos, sendo a maioria das alterações identificadas rearranjos exônicos em heterozigose (8,3%) que afetavam as regiões dos exons 2 a 7 do gene *Parkin*. Camargos e colaboradores (2009) rastrearam a frequência de mutações em *Parkin* em 45 pacientes brasileiros com DP precoce e identificaram 5 mutações de sequência conhecidas (11,1%) e uma duplicação do exon 5 (2,2%).

De um modo geral, os estudos realizados até o momento nos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* indicam que tanto as mutações de sequência quanto as alterações de dosagem contribuem para o desenvolvimento da DP precoce, demonstrando a importância de se rastrear igualmente alterações quantitativas e qualitativas nestes fatores genéticos. Os trabalhos apontam uma discrepância nos resultados encontrados, pois a maioria dos estudos se concentrou em uma população específica, sendo os estudos conduzidos em populações latino-americanas escassos ou, até mesmo, ausentes. Poucos trabalhos foram realizados na população brasileira o que reforça a importância de se conduzir a análise dos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* em outras regiões do Brasil, para se determinar a real contribuição de alterações em genes autossômicos recessivos e a DP em nossa população.

1 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo principal:

- Rastrear mutações nos genes que codificam proteínas participantes de vias metabólicas mitocondriais (*Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*) em uma amostra de pacientes brasileiros com doença de Parkinson precoce, de modo a verificar se alterações nestes genes constituem um importante fator genético na etiologia desta doença em nossa população;

Objetivos específicos:

- Implantar a metodologia de MLPA com a finalidade de rastrear a presença de rearranjos genômicos (deleções e multiplicações) nos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* na amostra selecionada, a fim de gerar dados relativos à frequência destas alterações e contribuir para o melhor entendimento do papel das CNVs na doença de Parkinson;
- Proceder à análise de segregação das variantes encontradas nas diferentes genealogias;

2 METODOLOGIA

2.1 Pacientes

Neste estudo foram incluídos 136 pacientes não aparentados (**Apêndice A**), que foram selecionados a partir de um banco de 450 pacientes com DP idiopática, de ambos os sexos (50 mulheres e 86 homens; faixa etária: 21 a 96 anos; idade média: $49,8 \pm 13,3$ anos), sendo 31 casos com história familiar da doença em parentes de 1º ou 2º graus e 105 casos isolados. Todos os pacientes manifestaram a DP com idade igual ou inferior a 50 anos e eram residentes do Estado do Rio de Janeiro (n=111) e Goiás (n=25).

Eles foram avaliados por médicos neurologistas especialistas em distúrbios do movimento ligados a hospitais públicos que são referências para a DP no Rio de Janeiro: 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 Universitário Antônio Pedro/UFF. Além desses, alguns pacientes são provenientes de Goiás: Instituto Integrado de Neurociências (IINEURO) 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 do probando. Foram incluídos na pesquisa apenas os casos de DP idiopática, sendo os casos de parkinsonismo secundário excluídos.

Além dos pacientes com DP, participaram deste estudo 200 indivíduos voluntários saudáveis (todos com mais de 50 anos de idade), 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 selecionados 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 do paciente, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo A**). 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. 032.2.2008) (**Anexo B**).

2.2 Extração de DNA genômico

Dois kits comerciais foram utilizados para a extração de DNA. Nos pacientes oriundos do Rio de Janeiro, a extração foi feita através da coleta de 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo, 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 provenientes 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 por ambos os métodos, duas alíquotas de DNA foram feitas para cada paciente, em tubos 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 das amostras obtidas, estas 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)]. Ao gel de agarose foi adicionado 0,6 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 de DNA foi comparada com o padrão de DNA de Bacteriófago λ (INVITROGEN) de 100 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

Para estimar a concentração das amostras foi realizada a espectrofotometria em um biofotômetro 6131 (EPPENDORF). No preparo das amostras, 5 μL da alíquota de DNA foram diluídos em 65 μL de água deionizada (MilliQ) e colocadas em uma cubeta própria para a leitura do biofotômetro. Uma diluição de 5 μL 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 μL foi usada como branco na calibração do equipamento. A estimativa da concentração da amostra, bem como o seu grau de pureza, foram calculados pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita.

2.4 Análise qualitativa

2.4.1 Rastreamento de mutações no gene *Parkin*

2.4.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram analisadas todas as regiões codificantes do gene *Parkin* e para amplificar os fragmentos gênicos correspondentes aos exons 1-12 foram utilizados 12 pares de oligonucleotídeos (INVITROGEN) descritos por Choi e colaboradores (2008) (**Tabela 5**). 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 6**.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons 1-12 do gene *Parkin* (Choi *et al.*, 2008).

Exon	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
1	PARK2_1F 5' AGGCGTGAGGAGAACTACG 3' PARK2_1R 5' CGCAGAGAGGCTGTACCTG 3'	249 pb
2	PARK2_2F 5' ATGTTGCTATCACCATTTAAG 3' PARK2_2R 5' AGATTGGCAGCGCAGGCGGCA 3'	308 pb
3	PARK2_3F 5' ACATGTCACTTTTGCTTCC 3' PARK2_3R 5' AGGCCATGCTCCATGCAGACT 3'	427 pb
4	PARK2_4F 5' ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTT 3' PARK2_4R 5' AGGCAATGTGTTAGTACA 3'	260 pb
5	PARK2_5F 5' ACATGTCTTAAGGAGTACAT 3' PARK2_5R 5' TCTCTAATTTCTGGCAAACAG 3'	227 pb
6	PARK2_6F 5' AGAGATTGTTTACTGTGGAAA 3' PARK2_6R 5' GAGTGATGCTATTTTTAGATC 3'	268 pb
7	PARK2_7F 5' TGCCTTTCCACACTGACAGGTA 3' PARK2_7R 5' TCTGTTCTTCATTAGCATTAGA 3'	239 pb
8	PARK2_8F 5' TGATAGTCATAACTGTGTGTA 3' PARK2_8R 5' ACTGTCTCATTAGCGTCTATC 3'	206 pb
9	PARK2_9F 5' GGGTGAAATTTGCAGTCA 3' PARK2_9R 5' AATATAATCCCAGCCCATGTG 3'	278 pb
10	PARK2_10F 5' ATTGCCAAATGCAACCTAATG 3' PARK2_10R 5' TTGGAGGAATGAGTAGGGCA 3'	165 pb
11	PARK2_11F 5' ACAGGGAACATAAACTCTGAT 3' PARK2_11R 5' CAACACACCAGGCACCTTCA 3'	303 pb
12	PARK2_12F 5' GTTTGGGAATGCGTGT 3' PARK2_12R 5' AGAATTAGAAAATGAAGGTAGA 3'	255 pb

pb – pares de bases

Todas as reações de amplificação foram feitas em tubos de 0,2 mL e as condições de ciclagem utilizadas foram as mesmas para as 12 regiões: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos; e extensão final a 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento para a

amplificação dos exons 1-12 foi de 55°C. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20°C.

Tabela 6: Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-12 do gene *Parkin*.

Reagentes	Exons 1-12 do gene <i>Parkin</i>
Tampão de reação 10X (BIOTOOLS)*	1X
dNTPs 5 mM (GE HEALTHCARE)	200 µM
MgCl ₂ 50 mM (BIOTOOLS)	2,0 mM
Oligonucleotídeo F 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM
Oligonucleotídeo R 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM
Taq DNA polimerase 1U/µL (BIOTOOLS)	1,0 U
DNA ~50 ng	1,0 µL
Volume final	25 µL

*Tampão de reação 10X [KCl 5 mM, Tris HCl 7,5 mM - pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 2 mM].

2.4.1.2 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)]. Ao gel de agarose foi adicionado 0,6 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 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)]. Para confirmação do tamanho do amplicon foi utilizado o padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder (INVITROGEN).

2.4.1.3 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.

2.4.1.4 Sequenciamento automático

As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10 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 ηg) do DNA purificado e 0,5 μL do Kit Big Dye Terminator (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações foram feitas 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 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 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. As reações foram processadas 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 sequências obtidas foram alinhadas com o fragmento correspondente à sequência selvagem do gene *Parkin*, acessada no banco de dados Ensembl. Os indivíduos que apresentaram variação nas sequências tiveram uma nova alíquota do DNA analisada para a confirmação da variante encontrada.

2.4.1.5 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 & Henikoff, 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. 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 exônicas silenciosas 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".

2.4.2 Rastreamento de mutações no gene *PINK1*

2.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram analisadas todas as regiões codificantes do gene *PINK1* e para a amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes aos exons 1-8 foram utilizados 8 pares de oligonucleotídeos (INVITROGEN) descritos por Choi e

colaboradores (2008) (**Tabela 7**). 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 8**.

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons 1-8 do gene *PINK1* (Choi *et al.*, 2008).

Exon	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
1	PINK1_1F 5' TCACTGCTAGAGGCGC 3' PINK1_1R 5' CGGCCCTCGATCTGC 3'	695 pb
2	PINK1_2F 5' ATTGATCTGGTCGACGT 3' PINK1_2R 5' CCTTTCCTGTGCATAATC 3'	522 pb
3	PINK1_3F 5' CTCGAAGGTCAGAGCCA 3' PINK1_3R 5' CTGTCATATCAGACACTG 3'	323 pb
4	PINK1_4F 5' GAATGTCAGTGCCAGTG 3' PINK1_4R 5' AGATATGTTCCCTTTGCA 3'	429 pb
5	PINK1_5F 5' CGTATTGGGAGTCGTCG 3' PINK1_5R 5' GACCTGAAGAGTCAGTCC 3'	300 pb
6	PINK1_6F 5' GTCAGCTATGTCTTGCT 3' PINK1_6R 5' ATCACAAGGCATCGAGT 3'	309 pb
7	PINK1_7F 5' TGGATCAGGTGATGTGC 3' PINK1_7R 5' AGGATCTGTCACTGTGG 3'	416 pb
8	PINK1_8F 5' GAGAAGGGAAGACCCTC 3' PINK1_8R 5' CAGACTGAACTCTCACTC 3'	520 pb

pb – pares de bases

Todas as reações de amplificação foram feitas em tubos de 0,2 mL e as condições de ciclagem utilizadas foram:

Análise do exon 1

98°C – 9 minutos
98°C – 1,5 minutos } 35 ciclos
55°C – 1 minuto }
72°C – 1,5 minutos }
72°C – 10 minutos

Análise do exon 2

95°C – 10 minutos
95°C – 1 minuto } 35 ciclos
55°C – 1 minuto }
72°C – 1 minuto }
72°C – 10 minutos

Análise dos exons 3, 4, 5, 6 e 7

94°C – 10 minutos
94°C – 30 segundos } 35 ciclos
55°C – 30 segundos }
72°C – 45 segundos }
72°C – 10 minutos

Análise do exon 8

94°C – 10 minutos
94°C – 30 segundos } 35 ciclos
52°C – 30 segundos }
72°C – 45 segundos }
72°C – 10 minutos

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20°C.

Tabela 8: Condições utilizadas na PCR para a amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-8 do gene *PINK1*.

Reagentes	Exons 1-12 do gene <i>Parkin</i>
Tampão de reação 10X (BIOTOOLS)*	1X
dNTPs 5 mM (GE HEALTHCARE)	200 µM
MgCl ₂ 50 mM (BIOTOOLS)	2,0 mM
Oligonucleotídeo F 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM
Oligonucleotídeo R 10 µM (INVITROGEN)	0,4 µM
Taq DNA polimerase 1U/µL (BIOTOOLS)	1,0 U
DNA ~50 ηg	1,0 µL
Volume final	25 µL

*Tampão de reação 10X [KCl 5 mM, Tris HCl 7,5 mM - pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 2 mM].

As etapas realizadas após a amplificação dos fragmentos exônicos do gene *PINK1* consistiram na avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação, purificação dos produtos da PCR e sequenciamento automático, conforme os itens dispostos em 2.4.1.2, 2.4.1.3 e 2.4.1.4.

2.5 Análise quantitativa

2.5.1 MLPA

A técnica recentemente desenvolvida de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) consiste em um método rápido e sensível que permite a

quantificação relativa de até 45 sequências diferentes de ácido nucleico em uma única reação, baseado na amplificação simultânea de sondas hibridizadas especificamente a sequências alvo no DNA genômico (Schouten *et al.*, 2002; Scarciolla *et al.*, 2007; Djarmati *et al.*, 2007). No MLPA não é a amostra de DNA que é amplificada e sim a sonda que é adicionada à mesma.

As sondas do MLPA consistem de dois oligonucleotídeos separados, cada um contendo uma das sequências de *primer* da PCR. Em contraste com o método de PCR multiplex, na técnica de MLPA um único par de *primers* é utilizado na amplificação. Apenas quando as duas partes da sonda estão hibridizadas à sua sequência alvo que elas podem se ligar e, somente sondas ligadas serão amplificadas exponencialmente na reação de PCR. Cada sonda é designada para amplificar um determinado exon de um gene específico e, nos casos de mutações pontuais, ela reconhece o alelo selvagem ou o mutado. Várias sondas controles localizadas em diferentes regiões cromossômicas são também adicionadas à mesma reação para a quantificação relativa. O número de produtos de sonda ligada depende do número de sequências alvo na amostra. Comparado a uma amostra de referência (controle), a quantidade de cada produto amplificado reflete o número de cópias da sequência alvo da sonda na amostra do paciente analisada. Os produtos resultantes da amplificação são separados por eletroforese (sequenciamento), onde o tamanho de cada produto de amplificação é único.

O MLPA visa detectar alterações no número de cópias a nível genômico (ganhos ou perdas) em relação a uma referência e, com isso, rapidamente identifica ampliações e deleções de um ou mais exons. Além disso, o uso do kit de MLPA requer apenas um termociclador e um equipamento de eletroforese capilar.

Deleções de sequências de reconhecimento das sondas serão aparentes por uma redução de 35-50% da área relativa do pico do produto de amplificação daquela sonda. Enquanto que um aumento de 50% da área (ou altura) do pico do produto é esperada no caso de duplicação da região gênica na qual se localiza a sonda. Entretanto, mutações ou polimorfismos próximos ao sítio de ligação das sondas também podem resultar em uma alteração da área do pico.

O Kit de escolha para realizarmos este estudo foi o SALSA MLPA P051-C1 Parkinson (MRC-Holland) que contém 41 sondas diferentes que apresentam produtos de amplificação que variam de 130 a 490 pb e estão distribuídas da seguinte forma: 12 sondas para o gene *Parkin*, 8 sondas para o gene *PINK1*, 4

sondas para o gene *DJ-1* e 8 sondas controles (*reference probe*). As demais sondas se ligam a outras regiões genômicas que não são de interesse nesse estudo.

Além dessas sondas, o kit também apresenta quatro fragmentos que testam a quantidade de DNA (*Q-fragments*) de tamanhos 64-70-76-82 pb, três fragmentos de controle da desnaturação do DNA (*D-fragments*) com 88-92-96 pb, um fragmento controle dependente de ligação de 92 pb, um fragmento marcador de cromossomo Y de 105 pb e um fragmento referente ao cromossomo X de 100 pb.

A técnica de MLPA pode ser dividida em quatro etapas: 1) Desnaturação e hibridização das sondas; 2) Reação de Ligação; 3) Reação de PCR; 4) Separação dos produtos de amplificação por eletroforese e análise dos resultados (**Figura 7**).

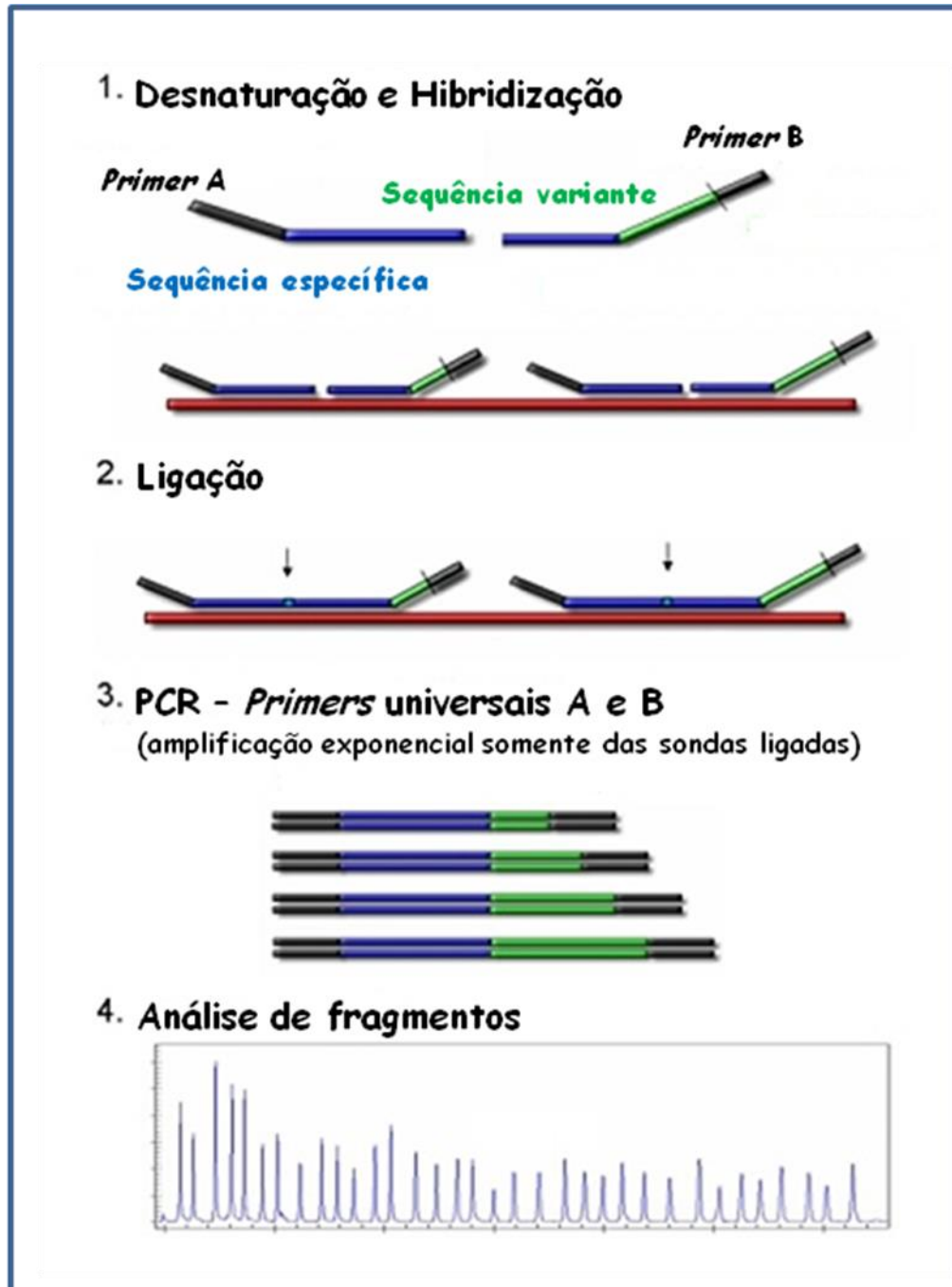


Figura 7: Esquema das etapas necessárias para a realização da técnica de MLPA (Adaptado de MRC-Holland).

1) Desnaturalização e Hibridização das sondas

Primeiramente, o DNA do paciente foi diluído com TE para 5 µl em uma concentração recomendada pelo fabricante de 100 ng (faixa preferencial: 50-200

ng). Durante o estabelecimento da técnica foi verificado que os DNAs com concentração final de 50 a 100 ng foram os que obtiveram os melhores resultados. Após a diluição, o DNA foi desnaturado à 98°C por 40 minutos e resfriado para 25°C antes de abrimos o termociclador. Foi adicionado 1,5 µl do mix de sonda e 1,5 µl do tampão de MLPA em cada tubo. Incubamos por 1 minuto a 95°C seguido de 16 horas a 60°C para a hibridização das sondas do MLPA.

2) Reação de Ligação

Após o período de 16 horas, reduzimos a temperatura para 54°C onde foi adicionado 32 µl do mix da enzima ligase a cada amostra (3 µl do tampão de ligase-65 A, 3 µl do tampão de ligase-65 B, 25 µl de água e 1 µl da enzima Ligase-65). Esta enzima une as sondas que forem complementares ao DNA, e são estes oligonucleotídeos que estão ligados que serão amplificados na etapa da PCR. Incubamos por 15 minutos a 54°C e depois as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 98°C para a inativa o da enzima.

3) Rea o de PCR

Em novos tubos foram adicionados 4 µl do tampão de PCR, 26 µl de água e 10 µl da rea o de liga o. Quando estes tubos atingiram a temperatura de 60°C, adicionamos 10 µl do mix de polimerase em cada tubo (2 µl dos *primers* de PCR, 2 µl de tampão de dilui o da enzima, 5,5 µl de água e 0,5 µl de polimerase) e imediatamente começamos a rea o de PCR:

35 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C por 30 segundos} \\ 60^{\circ}\text{C por 30 segundos} \\ 72^{\circ}\text{C por 60 segundos} \end{array} \right.$
72°C por 20 minutos

4) Separação dos produtos de amplificação por eletroforese e análise dos resultados

Ao término da reação de PCR, 1 µl do amplicom foi adicionado a 0,3 µl do marcador LIZ 500 e 9 µl de formamida Hi-Di (Life Technologies) e levado ao termociclador por 5 minutos a 95°C para desnaturação. Em seguida, a placa com as amostras foi submetida à centrifugação por 1 minuto a 900 rpm e levada ao sequenciador automático ABI Prism 3130 (Life Technologies) para o processamento das mesmas.

A análise dos resultados foi feita através dos *softwares* GeneMapper (Applied Biosystems) e Coffalyser (www.mlpa.com), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5.2 PCR quantitativo (qPCR)

A confirmação dos resultados obtidos pela técnica de MLPA foi realizada através da técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR). Nesta técnica, a amplificação por PCR de uma determinada região dos genes estudados é acompanhada em tempo real através da adição de *SYBR green* (Life Technologies), um composto que se intercala ao DNA de fita dupla e emite fluorescência. Durante a PCR, o crescimento da emissão de fluorescência devido ao aumento de DNA de fita dupla é monitorado em tempo real por um detector de fluorescência situado no termociclador. A comparação das curvas de amplificação detectadas pelo equipamento é utilizada na quantificação do número de cópias gênicas nas amostras. Esta comparação é realizada utilizando os fatores de Ct (*cycle threshold*) que corresponde ao número de ciclos que uma reação leva para atingir uma determinada quantidade de fluorescência emitida (linha de *threshold*).

Uma segunda reação, de um gene com um número de cópias conhecido e invariável, é realizada como controle interno para que variações na concentração inicial do DNA utilizado na reação não comprometam os resultados. Desta forma, variações nas concentrações de DNA irão influenciar da mesma maneira o resultado

do gene alvo a ser avaliado e do controle interno, não alterando a correlação de um com o outro. Desta forma, a diferença entre os Cts calculados para o controle interno e para o gene alvo gera um valor (ΔCt) que pode ser comparado efetivamente com outras amostras de outros indivíduos. Este procedimento é conhecido como método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Visto que em uma PCR em fase exponencial a concentração de DNA é duplicada a cada ciclo, formando uma função exponencial de base 2, um valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$ igual a 1 representa uma diferença de duas vezes o número de cópias gênicas de um indivíduo em relação ao outro. Desta forma, a relação do número de cópias de um determinado gene em um indivíduo em comparação ao número de cópias deste mesmo gene em outro indivíduo pode ser calculado pela fórmula:

$$\text{Número relativo de cópias} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

As reações de amplificação foram conduzidas em triplicatas, utilizando como referência o gene *ALB* e dois controles de indivíduos sabidamente saudáveis. Cada reação continha 1,0 μL de DNA ($\sim 6 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 0,75 μL do mix contendo os dois oligonucleotídeos (10 μM) (Invitrogen), 12,5 μL de *SYBR Green 2X* (Life Technologies) e água milliQ para um volume final de 25 μL . As reações foram processadas em um sistema de PCR em tempo real (7500 FAST, Life Technologies), sendo submetidas à ciclagem padrão do equipamento para reações com *SYBR Green*.

2.5.2.1 Teste de diluição de DNA

Para uma quantificação precisa é necessário verificar se a eficiência da PCR independe da concentração inicial de DNA no ensaio. Assim, a eficiência de cada par de oligonucleotídeos foi testada em reações contendo diferentes diluições de DNA. Para isso, foram utilizadas diluições de 1, 2, 4, 10, 100 e 1000 vezes da amostra de DNA controle, correspondendo a concentrações de DNA de aproximadamente 40 ng, 20 ng, 10 ng, 4 ng, 0,4 ng e 0,04 ng. Os resultados do teste de diluição de DNA foram inseridos em uma planilha do software *Excel* (Microsoft) e um gráfico do log do fator de diluição contra o Ct foi gerado, obtendo-se a equação

da reta $y = ax + b$. Todas as reações realizadas apresentaram eficiências similares e próximas à eficiência máxima (igual a 1).

2.5.2.2 Análise dos dados obtidos

Para a análise dos dados, utilizamos os Cts calculados pelo software do próprio equipamento (Software 7500 - versão 2.0.6; Life Technologies). Os resultados foram transferidos para uma planilha do *Excel* (Microsoft), onde foram analisados. O número relativo de cópias gênicas foi obtido utilizando-se o método de $\Delta\Delta Ct$, baseado no fato de que os genes em estudo são amplificados com a mesma eficiência em cada amostra. O gene autossômico *ALB* foi utilizado como referência. Desta forma, para qualquer gene autossômico normal testado deve-se obter um valor próximo a 1, para qualquer gene autossômico duplicado testado deve-se ter um valor próximo a 1,5 e para cada gene autossômico deletado deve-se alcançar um valor próximo a 0,5.

3 RESULTADOS

3.1 Análise qualitativa – Sequenciamento automático

Variantes identificadas no gene *Parkin*

Conduzimos a triagem de mutações no gene *Parkin*, através do sequenciamento automático, em 136 pacientes com DP idiopática de manifestação precoce (<50 anos). Foram analisadas as sequências dos exons 1, 2 e 3, responsáveis por codificarem o domínio UBL, dos exons 6 e 7, responsáveis por codificarem o domínio RING1, exons 9 e 10 que codificam o domínio IBR e os exons 11 e 12, responsáveis por codificarem o domínio RING2, além dos exons 4, 5 e 8 do gene *Parkin*.

Nestes pacientes foram identificadas 12 variantes de sequência: 3 variantes silenciosas e 9 variantes *missense* (de sentido trocado) (**Tabela 9**).

Tabela 9: Variantes de sequência encontradas no gene *Parkin* e suas características principais.

Varição no cDNA	Varição na proteína	Exon/intron do gene	Domínio proteico	Pacientes N (%)	Zigosidade
c.111G>A	p.P37P	Exon 2	UBL	2 (1,5)	0 homozigoto 2 heterozigoto
c.245C>A	p.A82E	Exon 3	–	1 (0,7)	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.434G>A	p.S145N	Exon 4	–	1 (0,7)	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.500G>A	p.S167N	Exon 4	–	17 (12,5)	0 homozigoto 17 heterozigoto
c.659A>G	p.K220R	Exon 6	–	1 (0,7)	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.719C>T	p.T240M	Exon 6	RING1	1 (0,7)	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.783A>G	p.L261L	Exon 7	RING1	14 (10,3)	0 homozigoto 14 heterozigoto
c.1016C>T	p.A339V	Exon 9	IBR	1 (0,7)/0 (0) ^a	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.1021C>T	p.L341L	Exon 9	IBR	2 (1,5)	0 homozigoto 2 heterozigoto
c.1138G>C	p.V380L	Exon 10	–	33 (24,3)	4 homozigoto 29 heterozigoto
c.1180G>A	p.D394N	Exon 11	–	9 (6,6)	0 homozigoto 9 heterozigoto
c.1310C>T	p.P437L	Exon 12	RING2	2 (1,5)/1 (0,5) ^a	0 homozigoto 2 heterozigoto/ 1 heterozigoto ^b

^a Frequência em 200 controles; ^b número de indivíduos controle com a mutação em heterozigose; - região entre domínios.

3.2 Características das variantes encontradas no gene *Parkin*

A alteração c.500G>A (**Figura 8**) resulta na troca de uma serina por uma asparagina no aminoácido 167 da proteína Parkin, tendo sido identificada em 17 pacientes (2 casos familiares e 15 casos esporádicos), todos heterozigotos. Um dos casos isolados (PAR2391) que possui esta variante também é portador da alteração c.434G>A no exon 4 (**Figura 19**).

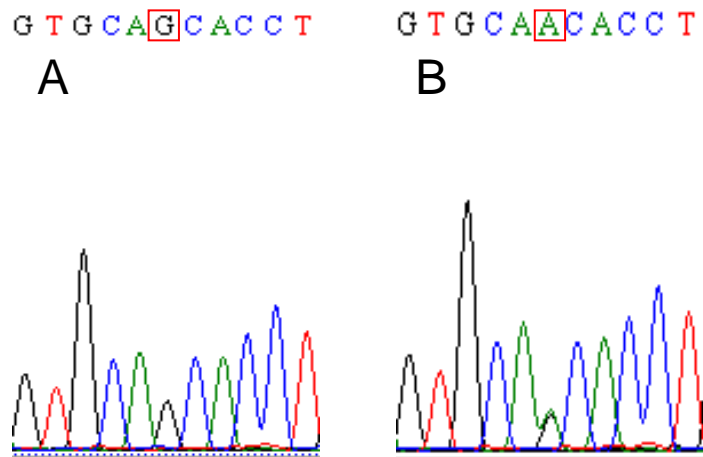


Figura 8: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.500G>A.

A alteração c.1138G>C (**Figura 9**) foi identificada em 29 pacientes heterozigotos e em 4 pacientes homozigotos. Sete casos tinham história familiar de DP e 26 eram casos esporádicos. A variante resulta na troca de uma valina por uma leucina na posição 380 da proteína.

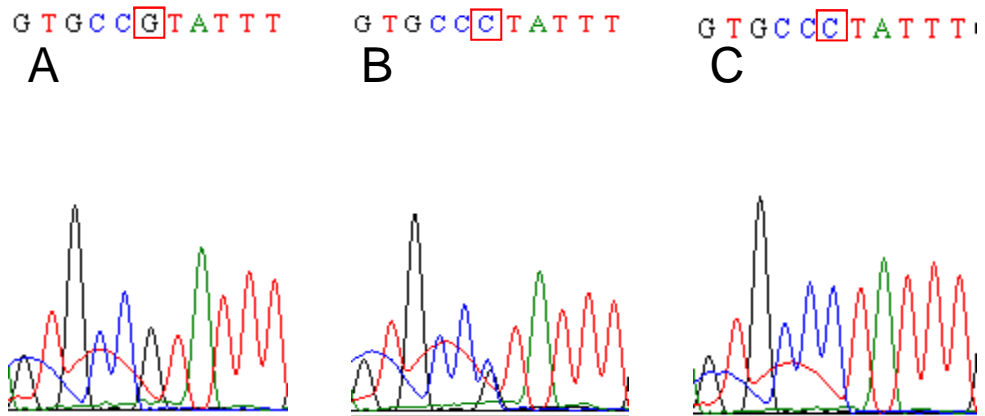


Figura 9: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.1138G>C. **C)** Alteração c.1138G>C em homozigose.

A variante c.783A>G (**Figura 10**) foi identificada em 14 pacientes heterozigotos (2 casos familiares e 12 casos isolados da doença) e resulta em uma mutação silenciosa, p.L261L, no domínio RING1 da proteína.

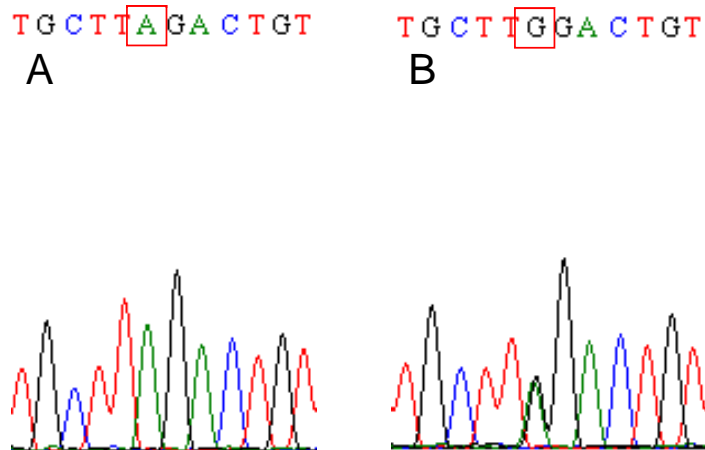


Figura 10: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.783A>G.

Outra variante encontrada em heterozigose em 9 pacientes foi a c.1180G>A (**Figura 11**), sendo dois casos familiares e sete casos esporádicos. Esta alteração leva à troca de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 394 da proteína.

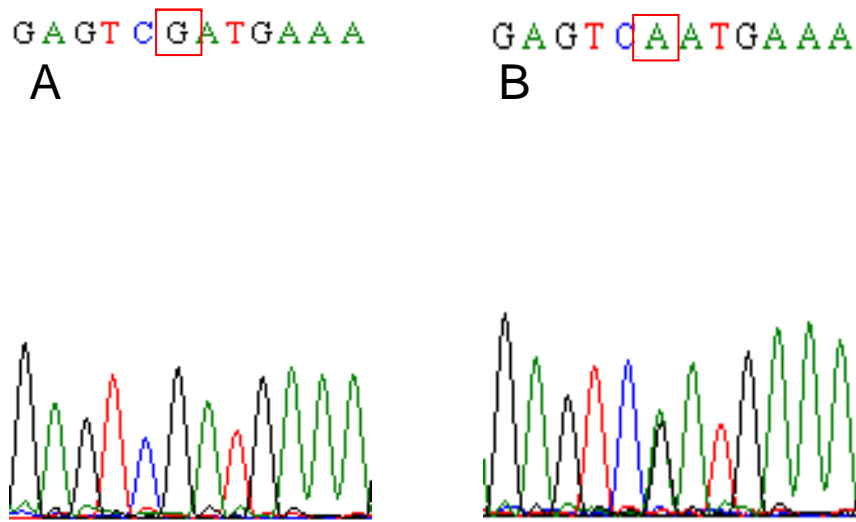


Figura 11: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.1180G>A.

A alteração c.111G>A (**Figura 12**), localizada no exon 2, resulta na mutação silenciosa p.P37P no domínio UBL da proteína Parkin. Esta variante foi encontrada em heterozigose nos pacientes PAR1404 e PAR2067, todos constituindo casos de DP esporádica.

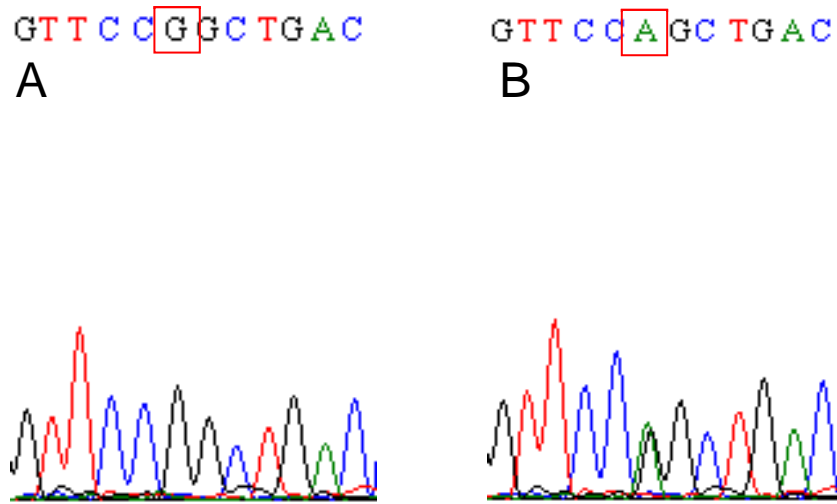


Figura 12: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.111G>A.

A variante c.245C>A no exon 3 (**Figura 13**) resulta na troca de uma alanina por um ácido glutâmico na posição 82 da proteína. Esta alteração foi identificada em um paciente (PAR1296), sem história familiar da DP, que manifestou a doença aos 42 anos de idade. As análises *in silico* relativas ao efeito da substituição do aminoácido na função da proteína, utilizando-se os programas SIFT e *PolyPhen-2*, mostrou que a alteração c.245C>A é benigna.

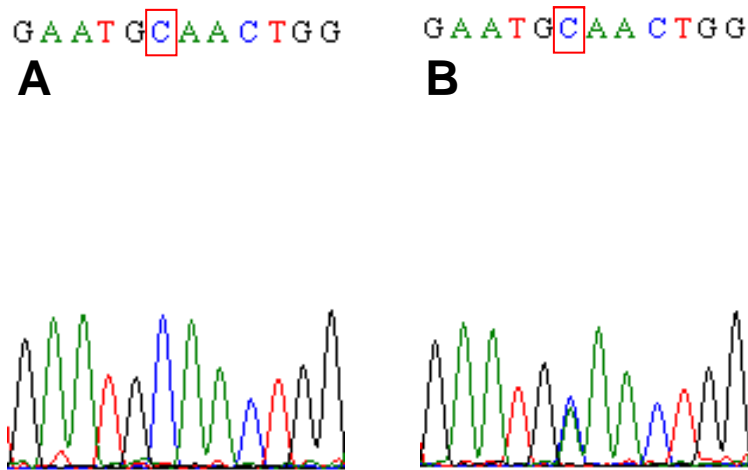


Figura 13: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.245C>A.

Três alterações identificadas neste estudo nunca foram descritas: c.659A>G, c.1016C>T e c.1021C>T.

A variante nova c.659A>G (**Figura 14**) foi encontrada apenas em um paciente (PAR1459), um caso esporádico da doença, em heterozigose. Esta substituição leva à troca de uma lisina por uma arginina na posição 220 da proteína Parkin. Com o objetivo de verificar se a alteração c.659A>G afeta a estrutura ou a função proteica o programa *PolyPhen-2* foi utilizado e apontou esta alteração como benigna. Segundo as análises *in silico* através dos programas PMut e SIFT esta alteração foi classificada como neutra e tolerável, respectivamente. Esta alteração não foi identificada em 200 controles saudáveis.

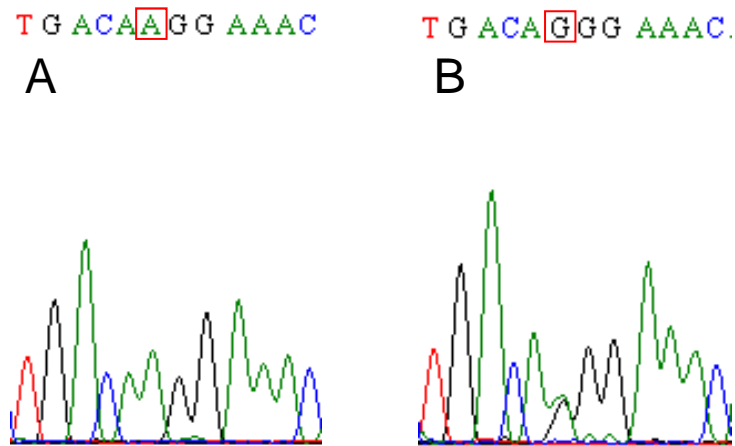


Figura 14: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.659A>G.

Identificamos duas variantes novas no exon 9: c.1016C>T em uma paciente (PAR2384) que possui história familiar de DP e c.1021C>T em dois pacientes (PAR2143 e PAR2256), casos isolados da doença.

A primeira variante (c.1016C>T) (**Figura 15**) altera uma alanina por uma valina na posição 339 do domínio IBR da proteína Parkin. A análise *in silico* da alteração c.1016C>T revelou através dos programas SIFT e PMut que se trata de uma variante benigna, enquanto que o programa *PolyPhen-2* a classificou como uma variante deletéria. Esta alteração não foi encontrada em 200 indivíduos controles saudáveis.

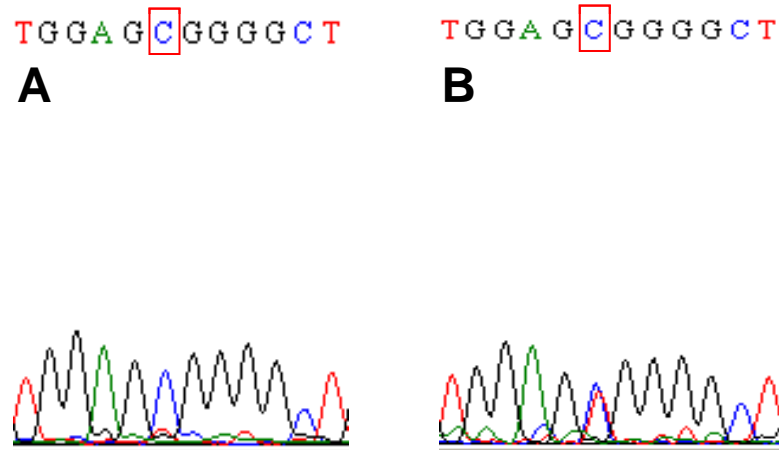


Figura 15: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.1016C>T.

A segunda alteração nova identificada no exon 9 do gene *Parkin*, c.1021C>T (**Figura 16**), resulta na mutação silenciosa p.L341L no domínio IBR da proteína. A análise *in silico*, através das ferramentas eletrônicas *SpliceView* e *NNSPLICE*, foram utilizadas para avaliar se alterações silenciosas nunca descritas na literatura podem alterar os sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA. Segundo as ferramentas utilizadas, a mutação silenciosa c.1021C>T não afeta o reconhecimento dos sítios doadores e dos sítios receptores de encadeamento.

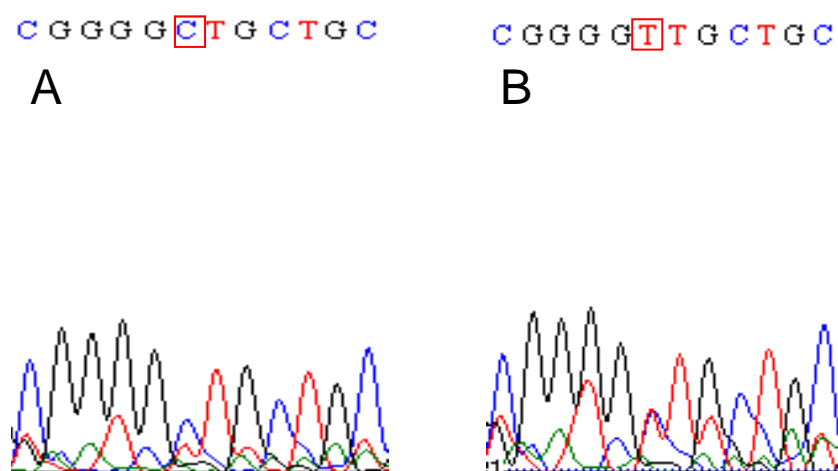


Figura 16: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.1021C>T.

A variante c.719C>T (**Figura 17**) resulta na troca de uma treonina por uma metionina na posição 240 do domínio RING1 da proteína. Ela foi identificada em uma paciente (PAR1308), caso isolado de DP, em heterozigose. A análise *in silico* relativa ao efeito da substituição do aminoácido na função da proteína, utilizando-se o programa *PolyPhen-2*, mostrou que a alteração c.719C>T é provavelmente prejudicial. Através da predição pelo programa SIFT considera-se que esta variante afete a função da proteína, porém o programa PMut a classifica como neutra. Além do heredograma da família (**Figura 18**), obtivemos também a saliva da filha da paciente para análise de segregação da alteração encontrada.

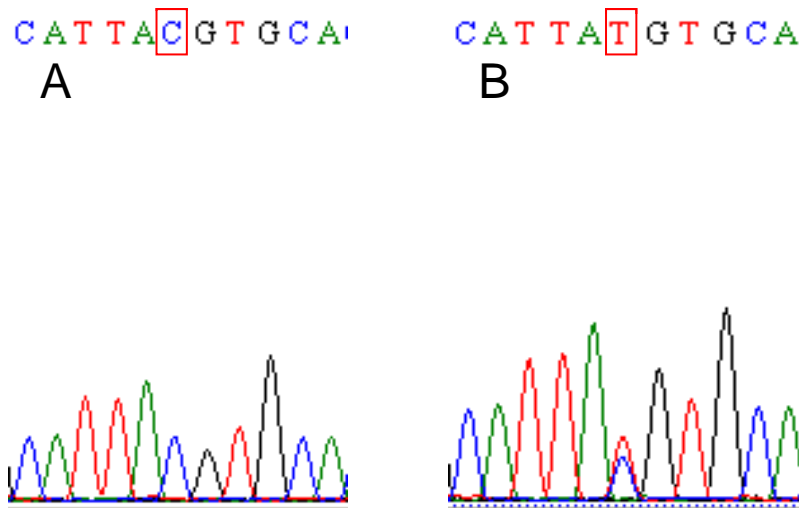


Figura 17: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.719C>T.

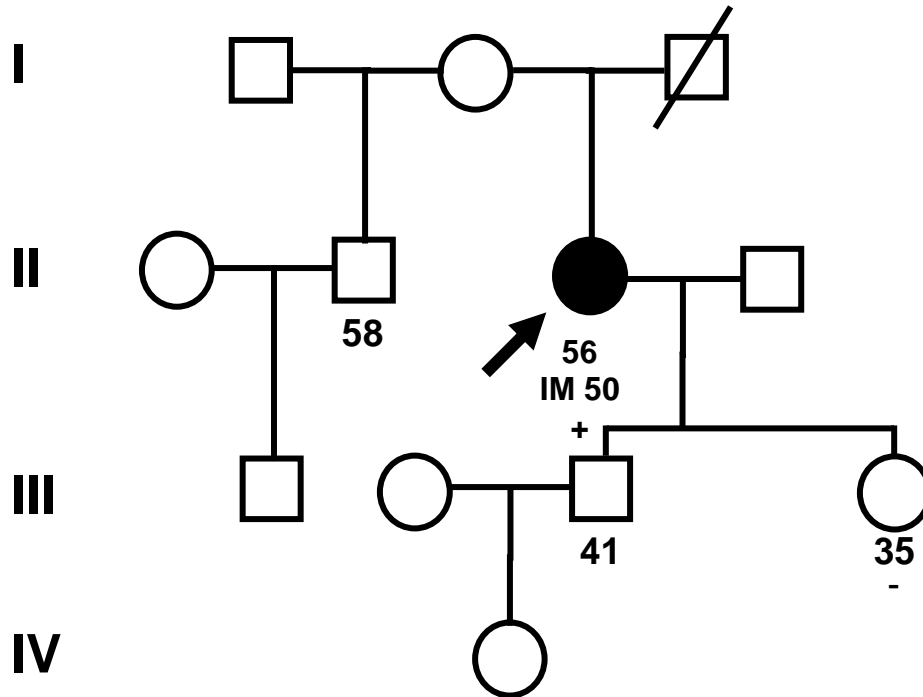


Figura 18: Heredograma da família da paciente PAR1308 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a mutação c.719C>T (p.T240M); -, indivíduo negativo para a mutação c.719C>T (p.T240M).

A alteração c.434G>A (**Figura 19**) no exon 4 foi identificada em um paciente (PAR2391) que também possuía a variante c.500G>A neste mesmo exon do gene *Parkin*. Esta alteração resulta na troca de uma serina por uma asparagina na posição 145 da proteína. A análise *in silico* relativa ao efeito da substituição do aminoácido na função da proteína, utilizando-se o programa *PolyPhen-2*, mostrou que a alteração c.434G>A é provavelmente prejudicial. Dados do programa SIFT classificam esta variante como tolerável e segundo a ferramenta PMut ela é considerada neutra. Não foi possível o estudo genético de seus familiares, pois a família do paciente é oriunda do Estado de Goiás.

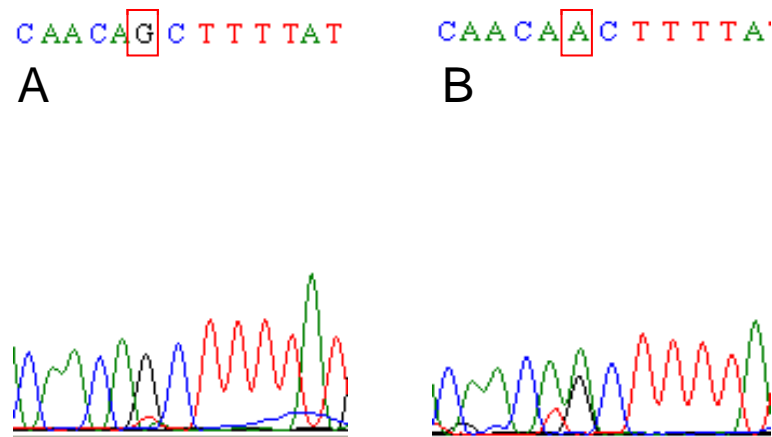


Figura 19: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.434G>A.

A alteração c.1310C>T (**Figura 20**) resulta na troca de uma prolina por uma leucina na posição 437 do domínio RING2 da proteína Parkin, e foi identificada em dois pacientes, um caso familiar (PAR1667) e um caso esporádico da doença (PAR2285).

O programa SIFT apontou a variante c.1310C>T como tolerável, porém as predições *in silico* realizadas através dos programas PMut (mutação patológica) e *PolyPhen-2* (provavelmente prejudicial) classificaram esta variante como provavelmente patogênica. A análise de 200 indivíduos controles mostrou que essa substituição está presente em heterozigose em um indivíduo saudável de 59 anos de idade. Além disso, nós identificamos esta variante em três filhas assintomáticas (35, 34 e 30 anos) e em uma neta (12 anos) da paciente PAR2285 (**Figura 21**).

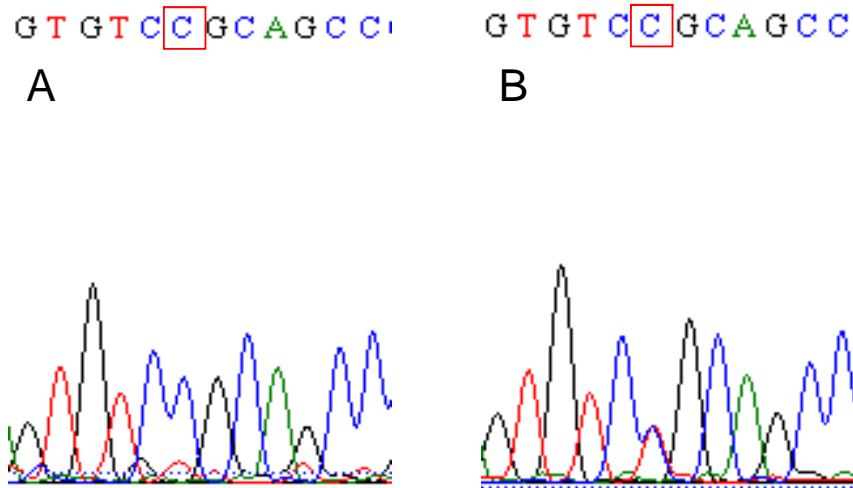


Figura 20: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *Parkin*. **B)** Alteração c.1310C>T.

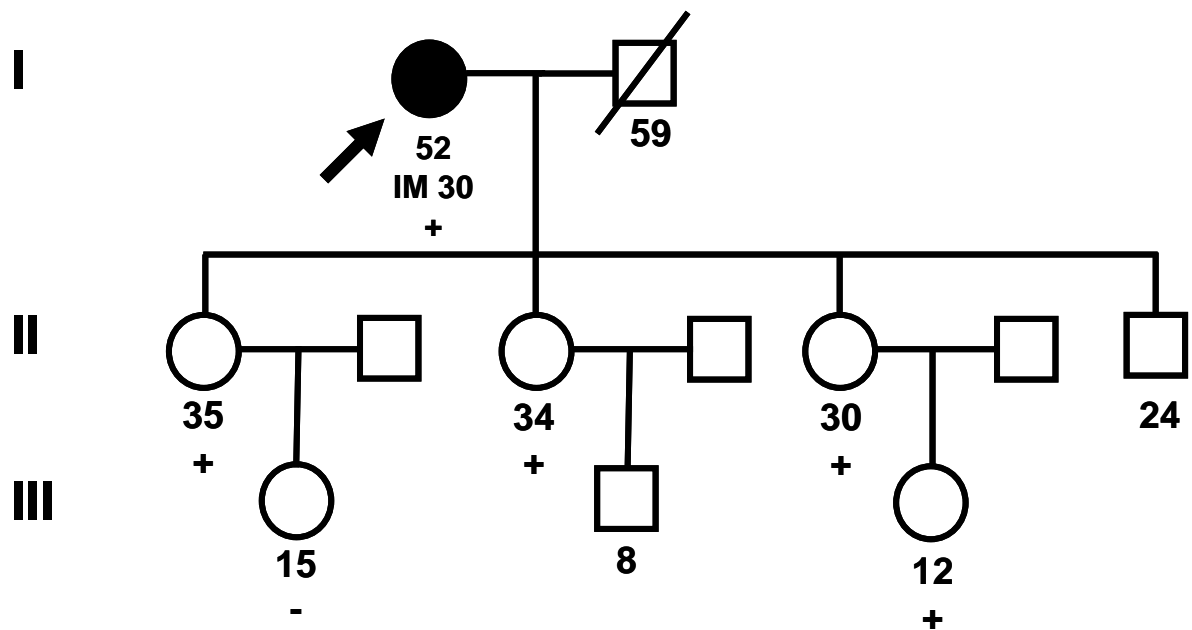


Figura 21: Heredograma da família da paciente PAR2285 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduos positivos para a mutação c.1310C>T (p.P437L); -, indivíduos negativos para a mutação c.1310C>T (p.P437L).

Variantes identificadas no gene *PINK1*

Foi realizada a triagem de mutações no gene *PINK1*, através do sequenciamento automático, em 136 pacientes com DP idiopática de manifestação precoce (<50 anos). Analisamos as sequências dos exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 responsáveis por codificarem o domínio Kinase, além do exon 1 do gene *PINK1*.

Nestes pacientes foram identificadas 4 variantes de sequência: uma variante silenciosa e três variantes *missense* (de sentido trocado) (**Tabela 10**).

Tabela 10: Variantes de sequência encontradas no gene *PINK1* e suas características principais.

Varição no cDNA	Varição na proteína	Exon/ intron do gene	Domínio proteico	Pacientes N (%)	Zigosidade
c.1018G>A	p.A340T	Exon 5	Kinase	7 (5,1)	0 homozigoto 7 heterozigoto
c.1173T>C	p.D391D	Exon 6	Kinase	1 (0,7)	0 homozigoto 1 heterozigoto
c.1426G>A	p.E476K	Exon 7	Kinase	2 (1,5)	0 homozigoto 2 heterozigoto
c.1562A>C	p.N521T	Exon 8	C-terminal	66 (48,5)	8 homozigoto 58 heterozigoto

3.3 Características das variantes encontradas no gene *PINK1*

A variante c.1018G>A foi encontrada em heterozigose em 7 pacientes (**Figura 22**), sendo todos casos isolados da doença. Ela resulta na troca de uma alanina por uma treonina no aminoácido 340 da proteína *PINK1*.

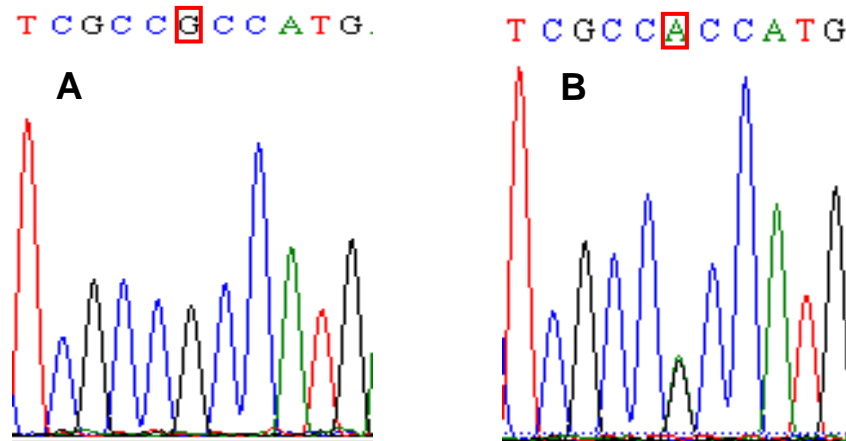


Figura 22: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *PINK1*. **B)** Alteração c.1018G>A.

A alteração c.1173T>C (**Figura 23**), localizada no exon 6, resulta na mutação silenciosa p.D391D no domínio Kinase da proteína PINK1. Esta variante foi encontrada em heterozigose na paciente PAR1649, um caso de DP esporádica.

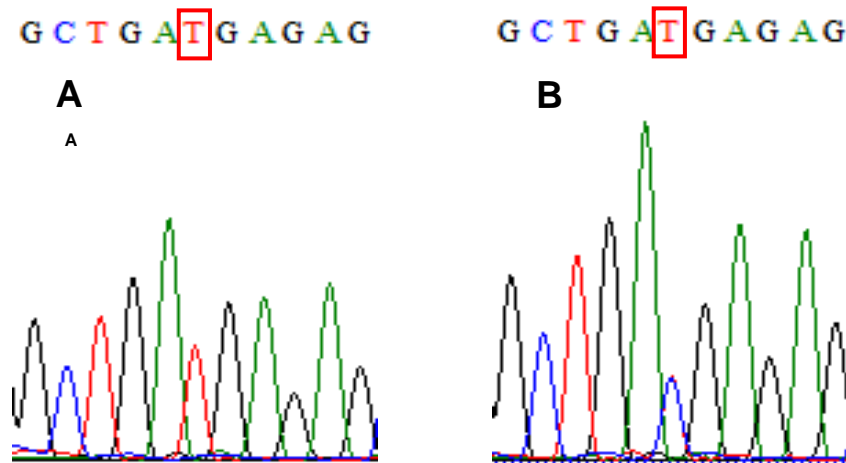


Figura 23: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *PINK1*. **B)** Alteração c.1173T>C.

Dois pacientes (PAR1695, caso isolado e PAR2358, caso familiar) são portadores heterozigotos da substituição c.1426G>A (**Figura 24**) que tem como efeito a troca de um ácido glutâmico por uma lisina na posição 476 da proteína PINK1.

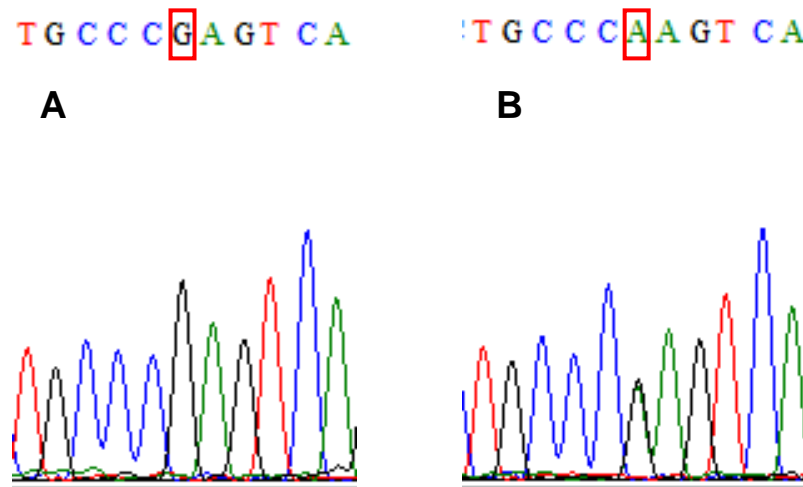


Figura 24: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *PINK1*. **B)** Alteração c.1426G>A.

Foi identificada também a variante c.1562A>C no exon 8 do gene *PINK1* em 66 pacientes, sendo 58 heterozigotos e 8 homozigotos (**Figura 25**). Esta substituição leva à modificação de uma asparagina na posição 521 da proteína por uma treonina.

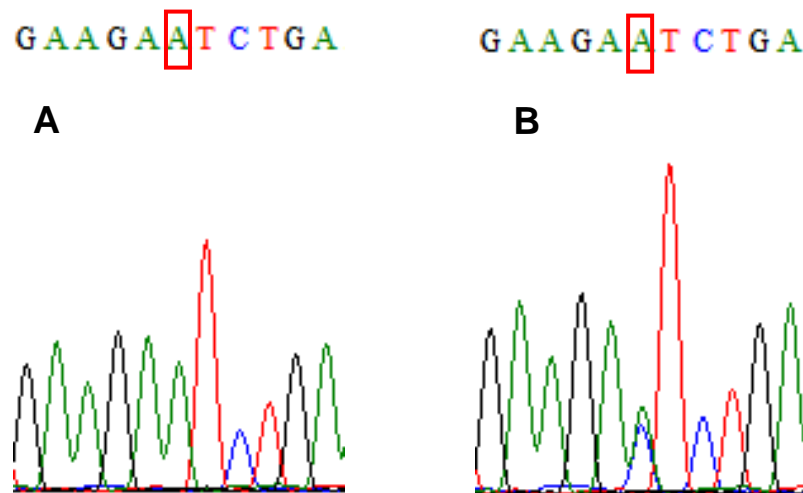


Figura 25: Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. **A)** Sequência selvagem do gene *PINK1*. **B)** Alteração c.1562A>C.

3.4 Análise quantitativa - MLPA

O estabelecimento da técnica de MLPA demandou alguns ajustes no protocolo original. Após todas as modificações que foram feitas almejando a otimização de nossos resultados realizamos a análise de dosagem gênica em 41 regiões do genoma, dentre as quais as regiões codificantes dos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1*.

Foram realizadas as análises dos resultados do MLPA, através dos *softwares* *GeneMapper* e *Coffalyser*, em 129 dos 136 pacientes com DP precoce. Em sete pacientes não foi possível reproduzir esta metodologia, pois o DNA extraído não estava com uma boa qualidade e não conseguimos recoletar o sangue dos mesmos (~5% da amostra). Através do MLPA foram encontradas variações no número de cópias nos genes *Parkin* e *PINK1* em cinco pacientes, não sendo encontrada alteração de dosagem no gene *DJ-1*. Os dados constam na **Tabela 11**. Todos os resultados positivos foram confirmados por PCR em tempo real.

Tabela 11: Alterações de dosagem encontradas nos genes *Parkin* e *PINK1* através da técnica de MLPA em 129 pacientes brasileiros com DP precoce analisados.

Alteração	Gene	Exon	Pacientes N (%)
Deleção em heterozigose	<i>PINK1</i>	1	1 (0,8)
Deleção em heterozigose	<i>Parkin</i>	4	1 (0,8)
Duplicação em heterozigose	<i>Parkin</i>	4	1 (0,8)
Deleção em homozigose	<i>Parkin</i>	4	1 (0,8)
Duplicação	<i>Parkin</i>	3	1 (0,8)
Deleção	<i>Parkin</i>	5 - 6	

Foi identificada uma deleção em heterozigose no exon 1 do gene *PINK1* em um paciente (PAR2083), que manifestou a DP com 45 anos de idade (**Figura 26**). O probando apresenta história familiar da DP (avó materna), como mostra o heredograma na **figura 27**. A análise molecular da sua única filha de 36 anos que é saudável mostrou que a mesma não apresenta a deleção.

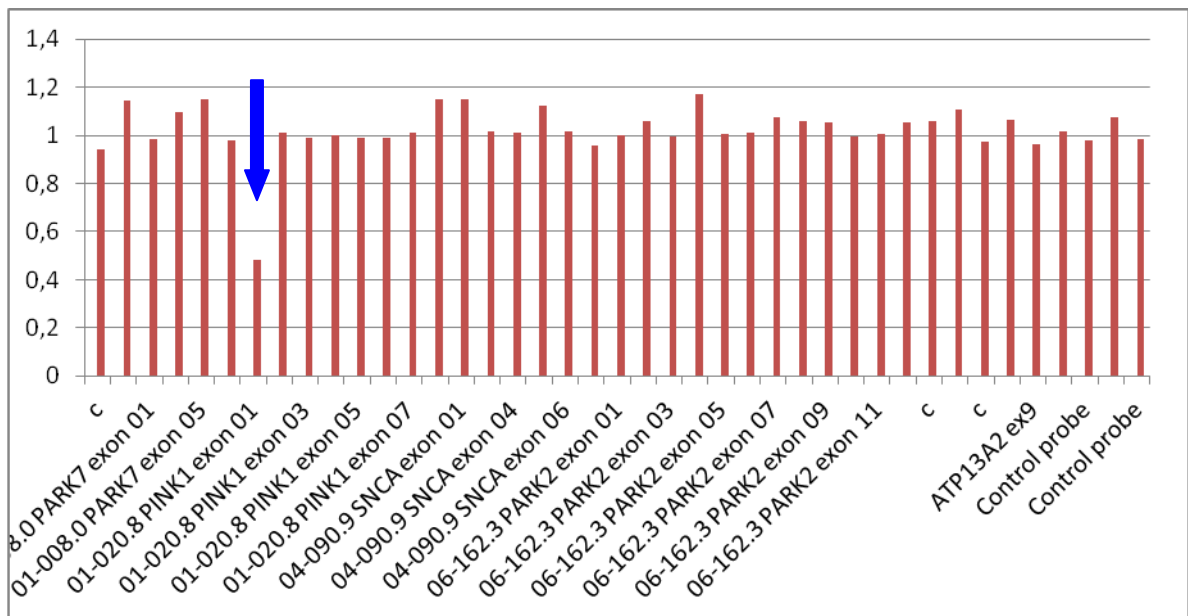


Figura 26: Gráfico referente ao paciente PAR2083, portador de uma deleção em heterozigose no exon 1 do gene *PINK1* (seta azul), gerado pelo programa *Coffalyser*.

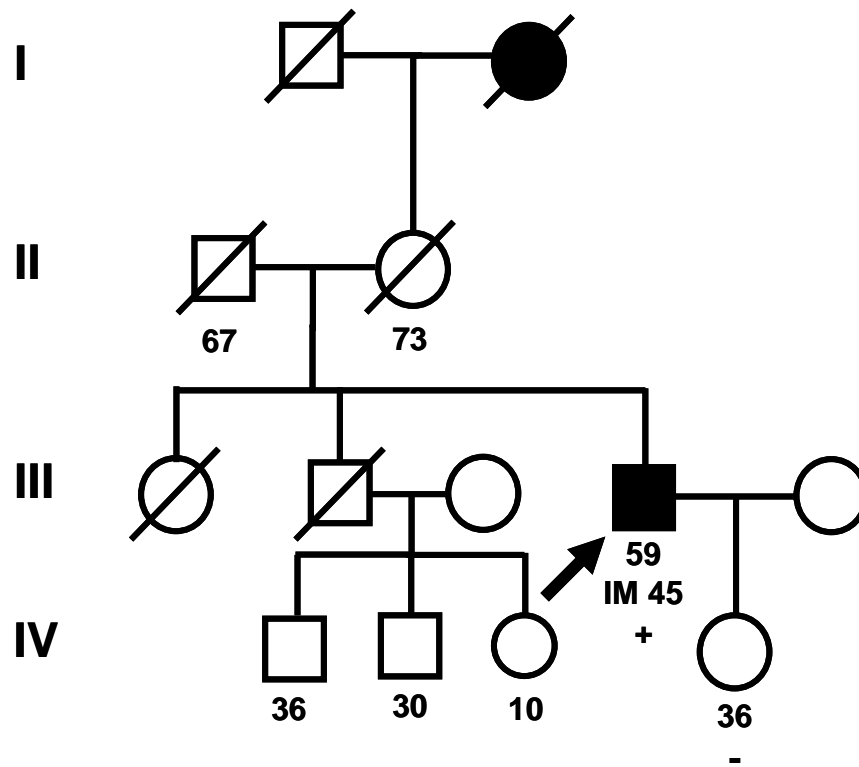


Figura 27: Heredograma da família do paciente PAR2083 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção do exon 1 no gene *PINK1*; -, indivíduos não-portadores da deleção do exon 1 no gene *PINK1*.

Encontramos uma deleção do exon 4 no gene *Parkin* em um paciente (PAR2099), caso isolado de DP, que manifestou a doença aos 12 anos de idade (**Figura 28**). Além do probando, investigamos a presença desta alteração na mãe, no pai e no irmão do paciente. Dos três familiares analisados, identificamos a mesma deleção em sua mãe (**Figura 29**).

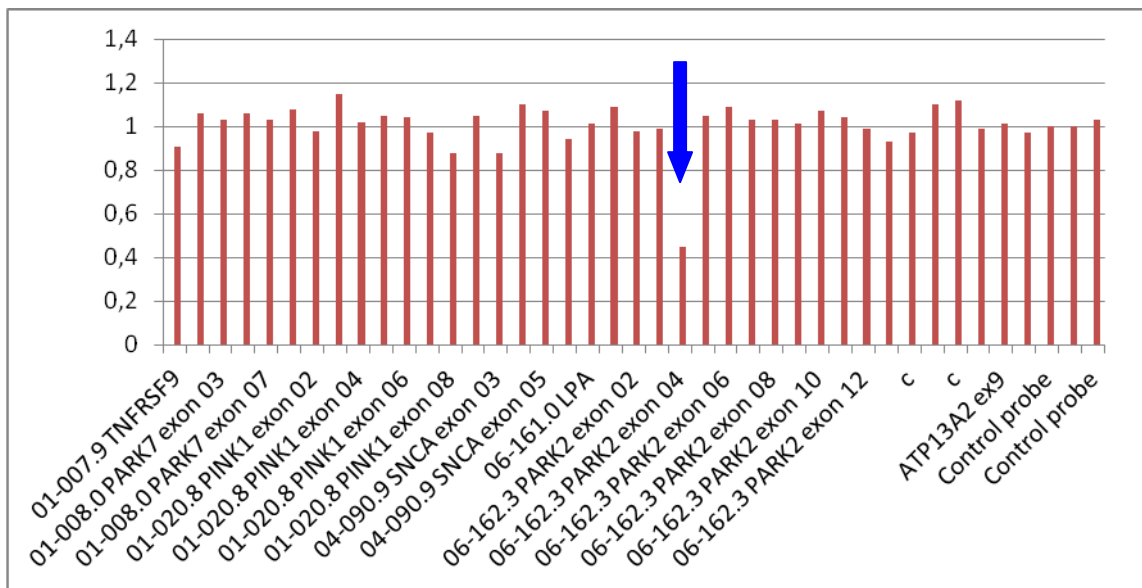


Figura 28: Gráfico referente ao paciente PAR2099, portador de uma deleção em heterozigose no exon 4 do gene *Parkin* (seta azul), gerado pelo programa *Coffalyser*.

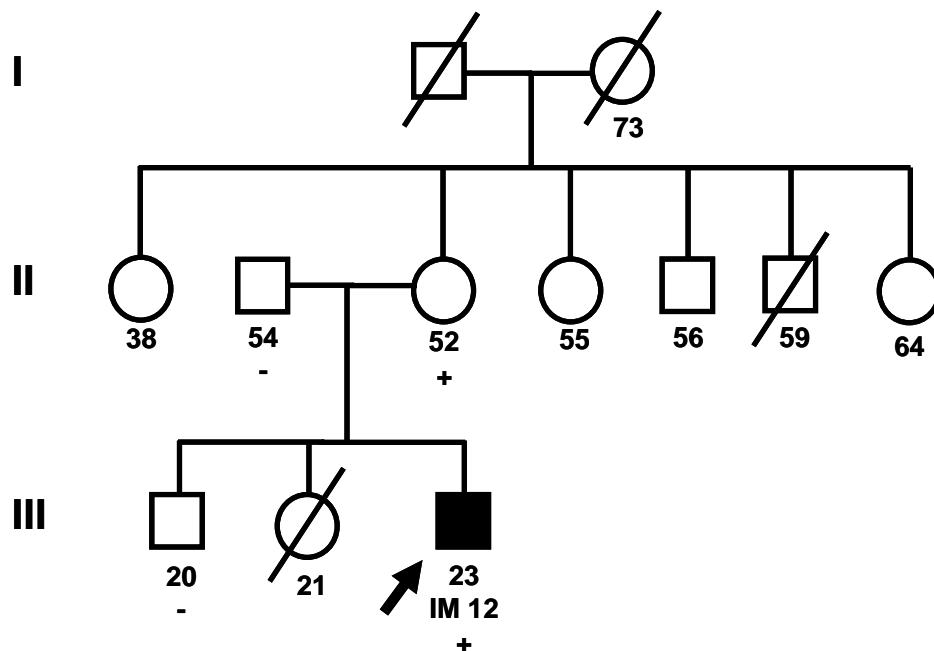


Figura 29: Heredograma da família do paciente PAR2099 (seta). **IM**, idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção em heterozigose no exon 4 do gene *Parkin*; -, indivíduos não-portadores da deleção do exon 4 no gene *Parkin*.

Identificamos também uma duplicação no exon 4 do gene *Parkin*, em heterozigose, em um caso isolado de DP (PAR2256) (**Figura 30**).

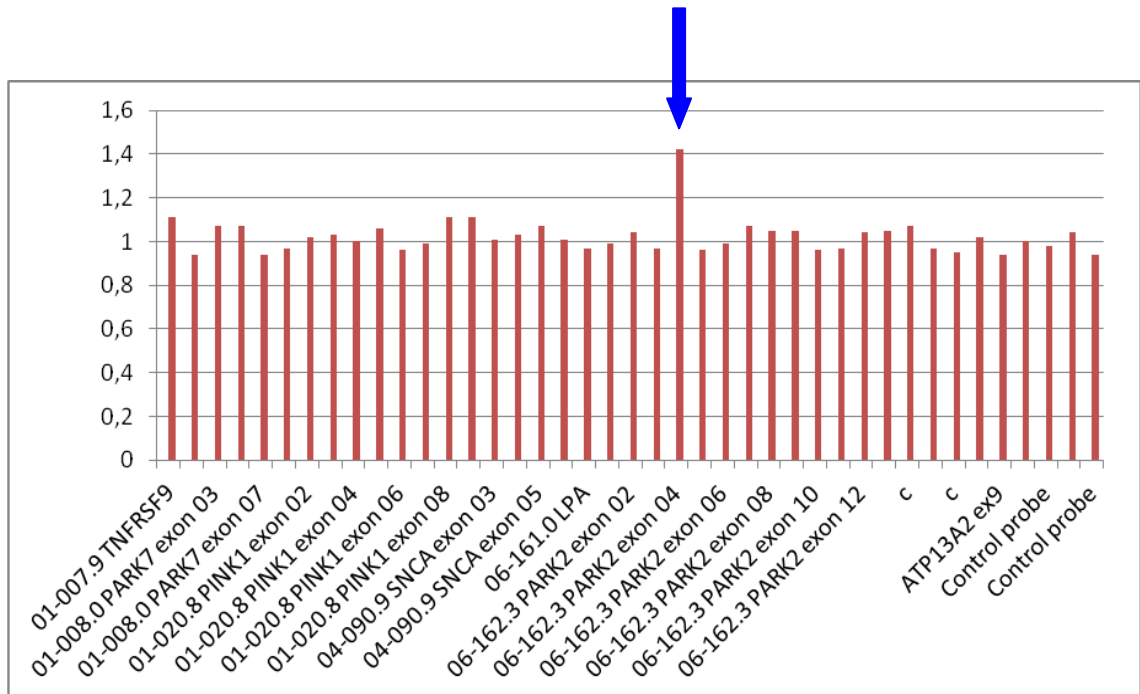


Figura 30: Gráfico referente à paciente PAR2256, portadora de uma duplicação em heterozigose no exon 4 do gene *Parkin* (seta azul), gerado pelo programa *Coffalyser*.

Ainda no exon 4 do gene *Parkin* foi identificada uma deleção em homozigose na paciente PAR3380 (**Figura 31**), que manifestou a DP com 35 anos de idade. Foi investigada a presença desta alteração em seu irmão, que também é acometido pela DP e possui a mesma deleção. Ambos são frutos de um casamento consanguíneo (**Figura 32**).

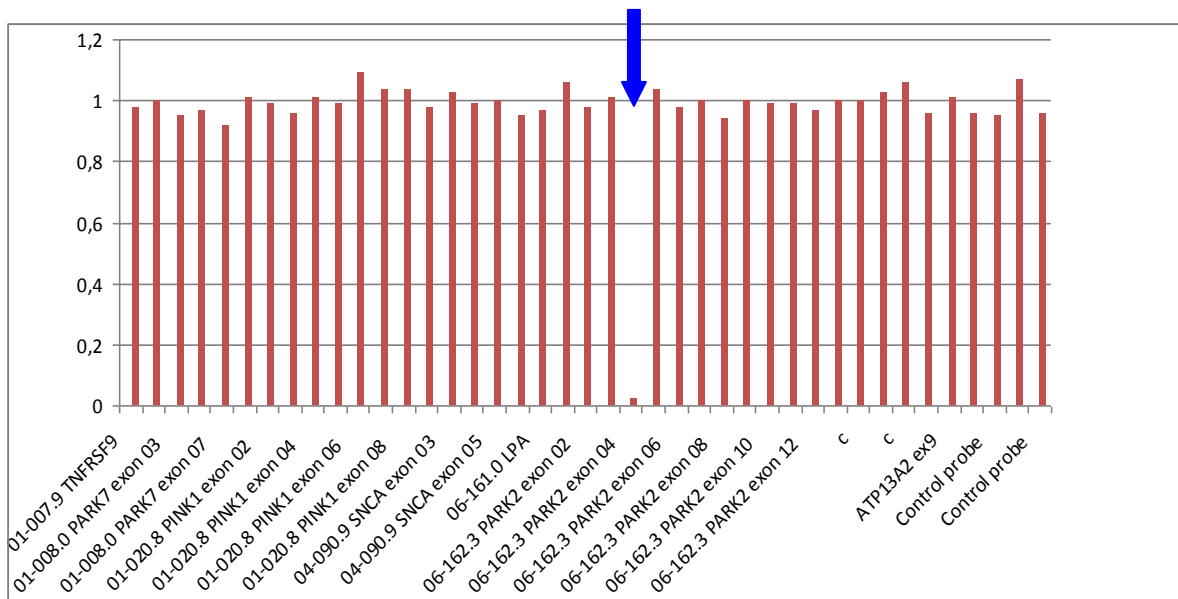


Figura 31: Gráfico referente à paciente PAR3380, portadora de uma deleção em homocigose no exon 4 do gene *Parkin* (seta azul), gerado pelo programa *Coffalyser*.

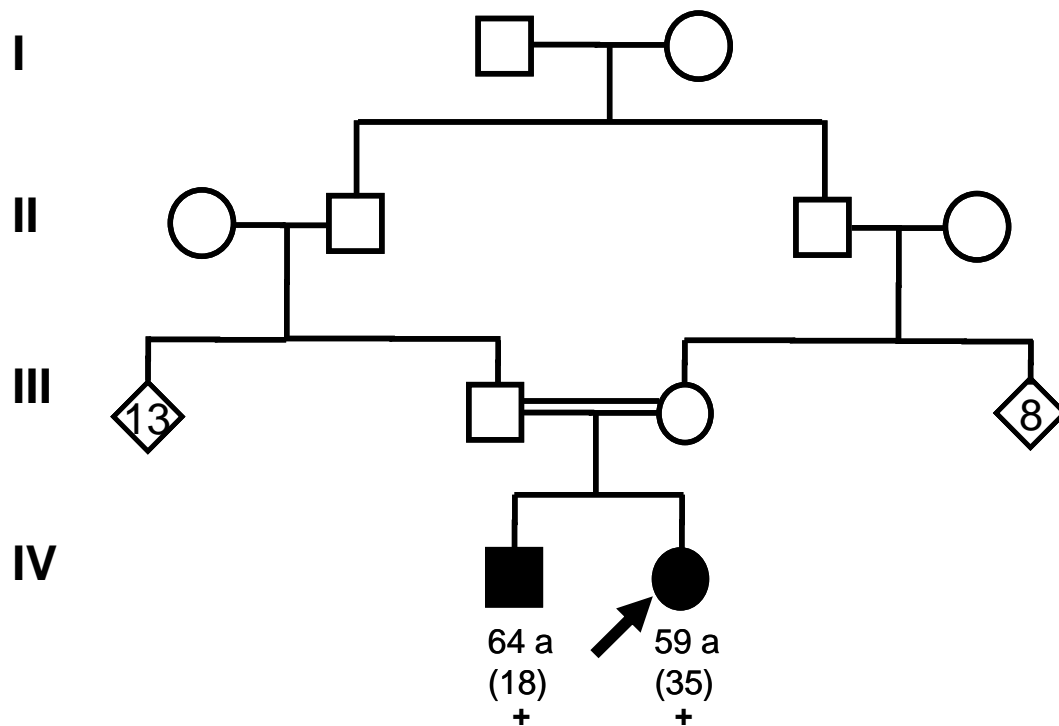


Figura 32: Heredograma da família da paciente PAR3380 (seta). (**IM**), idade de manifestação da DP; +, indivíduos portadores da deleção em homocigose no exon 4 do gene *Parkin*.

No paciente PAR2396, que possui história familiar de parkinsonismo (**Figura 33**), foram identificadas duas alterações quantitativas, uma duplicação do exon 3 no gene *Parkin* e uma deleção dos exons 5 e 6 neste mesmo gene (**Figura 34**). Observa-se assim que se trata de um indivíduo heterozigoto composto com duas alterações de dosagem em *Parkin*.

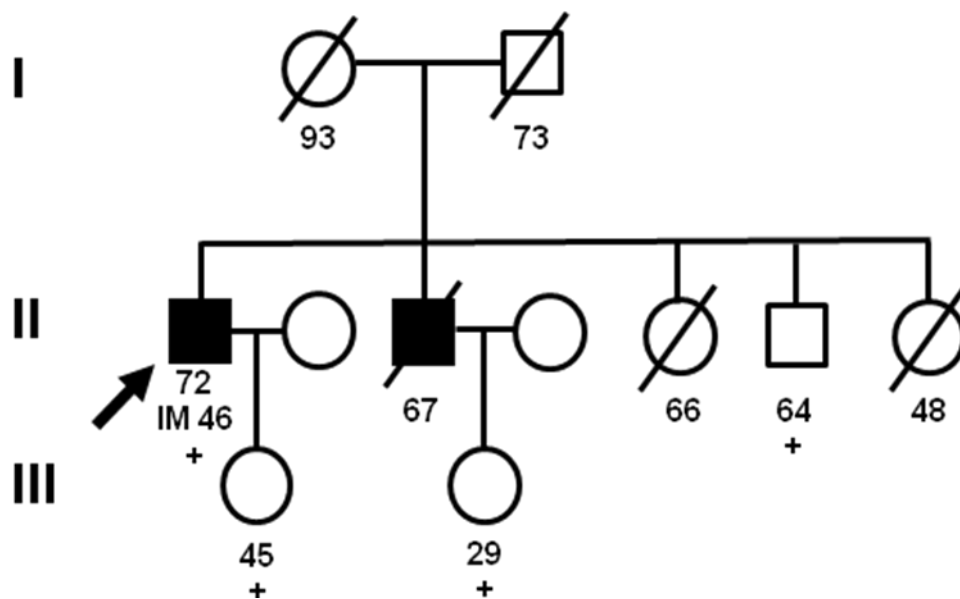


Figura 33: Heredograma da família do paciente PAR2396 (seta). (IM), idade de manifestação da DP; +, indivíduo portador de duplicação do exon 3 e/ou de deleção dos exons 5 e 6 no gene *Parkin*.

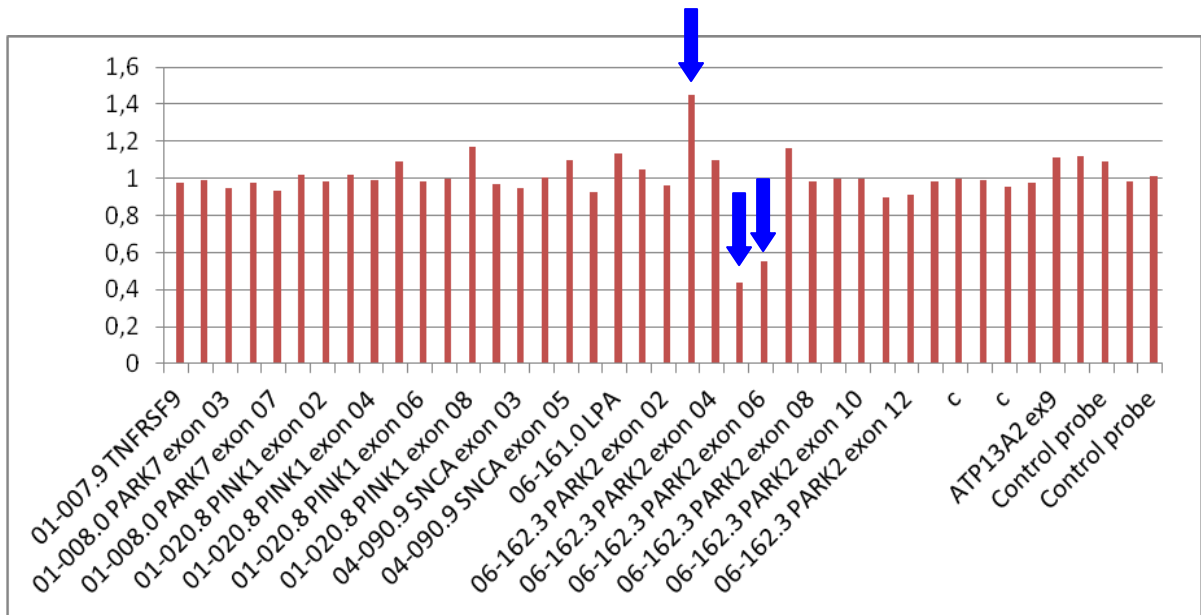


Figura 34: Gráfico referente ao paciente PAR2396, portador de uma duplicação no exon 3 e de uma deleção nos exons 5 e 6 do gene *Parkin* (setas azuis), gerado pelo programa *Coffalyser*.

Os resultados quantitativos obtidos através da técnica de MLPA deram origem a um artigo publicado no periódico *Disease Markers* (**Apêndice B**). Posteriormente, os resultados gerados nesta tese referentes às análises moleculares das regiões codificantes dos genes *Parkin* e *PINK1* originaram outro artigo científico que foi submetido para a revista *GENE* e encontra-se sob revisão (**Apêndice C**).

4 DISCUSSÃO

A partir da análise de mutações de ponto, através do sequenciamento automático, e da investigação de alterações quantitativas pelo MLPA nos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* em uma amostra de 136 pacientes brasileiros com DP precoce identificamos um total de nove variantes genéticas patogênicas ou potencialmente patogênicas (**Tabela 12**), além de 13 variantes não patogênicas. Não foi encontrada alteração no gene *DJ-1*.

Tabela 12: Variantes genéticas patogênicas ou potencialmente patogênicas identificadas nos genes *Parkin* e *PINK1* em 136 pacientes brasileiros com DP precoce.

Variantes patogênicas encontradas no gene <i>Parkin</i>				
Registro paciente	Idade	IM	F/I	Mutação - Zigosidade
PAR2099	23	12	I	ex4del - het
PAR2256	45	37	I	ex4dup - het
PAR3380	59	35	F	ex4del - hom
PAR2396	72	46	F	ex5-6del - het ex3dup - het
PAR1308	56	50	I	p.T240M - het
PAR2285	49	30	I	p.P437L - het
PAR1667	38	35	F	p.P437L - het
PAR2391	24	24	I	p.S145N - het
Variantes patogênicas encontradas no gene <i>PINK1</i>				
Registro paciente	Idade	IM	F/I	Mutação - Zigosidade
PAR2083	59	45	F	ex1del - het

IM - idade de manifestação da DP; F/I - caso familiar ou isolado; ex - exon; del - deleção; dup - duplicação; het - heterozigoto; hom - homozigoto

Variantes de sequência patogênicas ou potencialmente patogênicas

Identificamos a mutação c.719C>T (p.T240M) em heterozigose no gene *Parkin* em um caso esporádico de DP (PAR1308) (**Tabela 12**). Trata-se de uma variante patogênica conhecida, anteriormente descrita em outros estudos (Sironi *et al.*, 2008; Pankratz *et al.*, 2009; Marder *et al.*, 2010). Pankratz e colaboradores (2009) identificaram essa variante em 2 de 520 pacientes com DP familiar, porém a mesma não foi encontrada em 263 controles saudáveis. Um estudo em pacientes brasileiros também identificou esta alteração em dois indivíduos com DP, um em heterozigose e outro heterozigoto composto (Camargos *et al.*, 2009).

Esta mutação está localizada no domínio RING1 da proteína, que é essencial para sua atividade catalítica. Estudos funcionais demonstraram que variantes neste domínio proteico podem alterar a localização intracelular e a solubilidade, resultando na agregação de PARKIN (Cookson *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Além disso, a maioria das evidências *in silico* apontam esta alteração como sendo prejudicial para a atividade da proteína PARKIN. Através da análise de segregação na família da paciente portadora da mutação p.T240M, realizamos o estudo genético apenas em sua filha saudável de 35 anos de idade, que mostrou não ser portadora desta alteração. Infelizmente não foi possível realizar a coleta do sangue de sua mãe e de seu filho de 41 anos.

Além da mutação p.T240M, identificamos também outras duas variantes potencialmente patogênicas. A variante c.434G>A (p.S145N) foi identificada em um paciente (PAR2391), caso isolado da doença, que manifestou a DP aos 24 anos e também é portador do conhecido polimorfismo p.S167N no gene *Parkin* (**Tabela 12**). As análises *in silico* foram contraditórias, pois apenas um programa (*PolyPhen-2*) apontou a alteração p.S145N como sendo provavelmente prejudicial. Não foi possível realizar o estudo de segregação da variante em outros membros da família, pois o paciente e seus familiares residem no Estado de Goiás. Esta variante já havia sido detectada por Varrone e colaboradores (2004) e por Romito e colaboradores (2005), porém ambos os autores não discutiram a sua patogenicidade e, segundo o PDmutDB (Nuytemans *et al.*, 2010), um banco de dados de todas as mutações que já foram descritas nos principais genes associados à DP, esta alteração foi classificada como sendo de natureza patogênica desconhecida. Embora estudos

funcionais sejam necessários para avaliar o real impacto desta variante na função da proteína, nós acreditamos tratar-se de uma mutação causal.

A outra mutação potencialmente patogênica no gene *Parkin*, c.1310C>T (p.P437L), foi identificada por nosso grupo em dois pacientes: um caso isolado de DP que manifestou a doença aos 30 anos e um probando com história familiar de parkinsonismo, que iniciou a DP aos 35 anos (**Tabela 12**). Além desses pacientes, também detectamos a variante p.P437L em um indivíduo saudável de 59 anos. Esta mutação já havia sido descrita na literatura em outras populações mundiais (Brooks *et al.*, 2009; Nuytemans *et al.*, 2009; Pankratz *et al.*, 2009). Pankratz e colaboradores (2009) encontraram uma frequência desta alteração de 0,9% em pacientes com DP e de 0,4% em indivíduos controles. Em outro estudo desenvolvido na Bélgica (Nuytemans *et al.*, 2009), os autores também encontraram uma frequência similar desta variante entre casos e controles (0,32% X 0,37%, respectivamente), não sendo estatisticamente significativa. Embora a maioria das predições *in silico* tenham classificado esta variante como provavelmente patogênica, esta mutação foi identificada em um indivíduo da nossa população controle, o que torna mais difícil traçar conclusões precisas sobre sua patogenicidade. Esta avaliação deve ser realizada com cautela, já que a alteração encontra-se em um domínio importante da proteína (RING2). Nós identificamos a mutação p.P437L em três filhas assintomáticas (35, 34 e 30 anos de idade) e em uma neta (12 anos) de uma paciente portadora (PAR2285), que não atingiram ainda o limiar de manifestação precoce (50 anos). Análises funcionais ajudariam a esclarecer se a variante p.P437L é um agente causal ou um fator de risco para o desenvolvimento da DP.

Variantes de sequência não patogênicas

Das alterações de ponto encontradas no gene *Parkin*, verificamos que cinco, c.500G>A (p.S167N), c.1138G>C (p.V380L), c.783A>G (p.L261L), c.1180G>A (p.D394N) e c.111G>A (p.P37P), constituem polimorfismos não patogênicos, pois não comprometem a função da proteína, já tendo sido descritos anteriormente em pacientes com DP e em controles normais em diferentes populações mundiais (Lincoln *et al.*, 2003; Lucking *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006a; Aguiar *et al.*, 2008;

Okubadejo *et al.*, 2008; Bardien *et al.*, 2009; Brüggemann *et al.*, 2009; Koziorowski *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010).

Identificamos a variante c.245C>A (p.A82E) em um paciente, caso esporádico da DP, que iniciou a doença aos 42 anos. A alteração p.A82E foi previamente descrita por Brooks e colaboradores em 2009, que a identificaram em 2 de 274 controles saudáveis, porém não foi encontrada na amostra de 250 pacientes com DP triados, demonstrando ser uma variante benigna. Esta alteração foi a variante mais comum detectada na população controle (2/263 enquanto nos casos foi 1/520) em um estudo desenvolvido na América do Norte (Pankratz *et al.*, 2009). Como as análises *in silico* apontaram esta alteração como não prejudicial, nós acreditamos que seja um provável polimorfismo não patogênico.

A transição c.659A>G (p.K220R) é uma alteração nova identificada por nós em apenas um paciente, caso esporádico de DP. Em contrapartida, esta substituição não foi observada em 400 cromossomos controles que foram avaliados. A troca de aminoácido no resíduo 220 não parece ter um efeito deletério na proteína, já que o aminoácido lisina não é tão conservado entre as espécies e possui características químicas semelhantes ao aminoácido arginina, ou seja, é um aminoácido básico de carga positiva (**Figura 35**). Além disso, a variante em questão não codifica parte de nenhum domínio catalítico da proteína PARKIN. Todas as análises *in silico* realizadas mostraram que esta alteração é neutra, o que nos levou a classificá-la, pelos motivos acima citados, como uma variante potencialmente não patogênica.

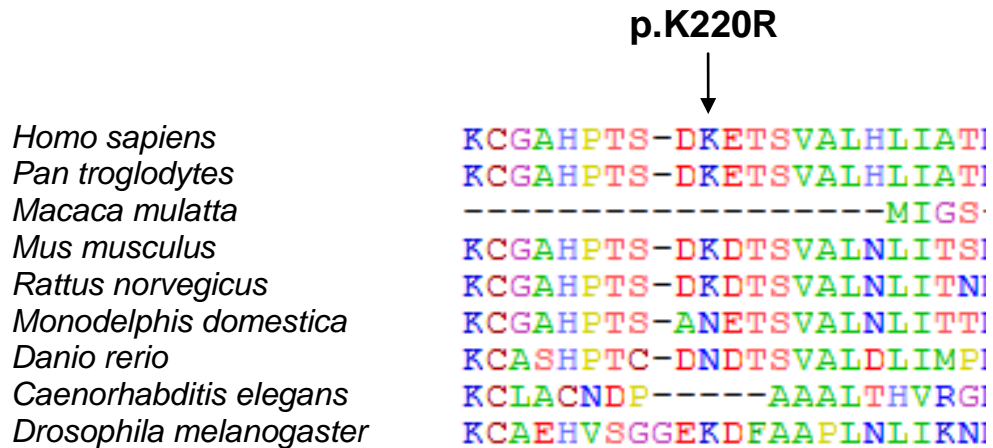


Figura 35: Sequência da proteína Parkin na região da alteração *missense* p.K220R, alinhada com ortólogos de *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Monodelphis domestica*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*.

Identificamos também a variante c.1016C>T (p.A339V) em uma paciente que possui história familiar da doença. Esta alteração nunca havia sido descrita na literatura e não foi observada em 400 cromossomos controles que foram avaliados. A análise *in silico* realizada por dois programas indicou tratar-se de uma alteração benigna. Outra mutação de sentido trocado na mesma localização da proteína (p.A339S) já havia sido identificada por outros estudos e, por não causar alterações fenotípicas, foi classificada como não patogênica pelos autores (Chen *et al.*, 2003; Madegowda *et al.*, 2005). Nós acreditamos que a alteração p.A339V, assim como a outra descrita no mesmo resíduo (p.A339S), seja potencialmente não patogênica.

A mutação silenciosa c.1021C>T (p.L341L) é uma variante nova que foi detectada em dois pacientes, casos isolados da DP. As análises *in silico* utilizando os programas SpliceView e NNSPLICE mostraram que esta alteração exônica não afeta o reconhecimento dos sítios doador e receptor de encadeamento selvagens e, devido ao seu caráter silencioso, acreditamos tratar-se de uma variante comum ao invés de uma mutação patogênica, sendo considerada por nós uma alteração benigna.

No gene *PINK1* identificamos três polimorfismos conhecidos não patogênicos: c.1018G>A (p.A340T), c.1173T>C (p.D391D) e c.1562A>C (p.N521T) (Ishihara-Paul *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2009; Godeiro-Junior *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010). Nós também detectamos a variante c.1426G>A (p.E476K) em dois pacientes

(**Tabela 10**). Como essa substituição já foi descrita em alguns indivíduos controles saudáveis por outros estudos (Bonifati *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Ishihara-Paul *et al.*, 2008; Keyser *et al.*, 2010), foi considerada benigna por programas de bioinformática e é pouco conservada entre espécies de mamíferos, nós acreditamos tratar-se de uma variante não patogênica.

Todas as alterações pontuais encontradas neste estudo, com exceção dos polimorfismos p.V380L no gene *Parkin* (4 pacientes homozigotos) e p.N521T no gene *PINK1* (8 pacientes homozigotos), estão em heterozigose. Diversos autores também fizeram observações semelhantes as nossas (Bonifati *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2009). As funções de variantes homozigotas e heterozigotas compostas nos genes *Parkin* e *PINK1* já estão bem estabelecidas como causas autossômicas recessivas da DP de início precoce, porém a patogenicidade de mutações heterozigotas ainda é incerta, particularmente para substituições *missense* no contexto da herança recessiva.

Diferentes mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos de variantes heterozigotas como mutações de perda de função, por diminuir a atividade biológica da proteína codificada (haploinsuficiência), variantes com propriedades dominante-negativas (através da qual a variante mutante reduz a função da proteína selvagem) ou mutações dominantes com ganho de função (Klein *et al.*, 2007). Com isso, evidências crescentes indicam que variantes heterozigotas não são mutações causais e sim fatores genéticos de suscetibilidade que devem contribuir para o risco de desenvolvimento da DP (Klein *et al.*, 2007). É provável que certos tipos de mutações em heterozigose estejam mais sujeitas a aumentar este risco do que outras, pois possuem um efeito mais prejudicial na estrutura e função da proteína (Pankratz *et al.*, 2009). Decifrar o papel destas variantes heterozigotas no parkinsonismo é importante no que se refere ao entendimento da relação desse tipo de alteração com a manifestação da doença, bem como, ao desenvolvimento de diretrizes para o teste genético e para o aconselhamento dos indivíduos portadores.

Ao contrário do que se imagina, existem mais pacientes com DP que exibem mutações em heterozigose nos genes *Parkin* e *PINK1* do que pacientes com mutações homozigotas ou heterozigotas compostas nestes mesmos genes (Rogaeva *et al.*, 2004; Bonifati *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2009). Isso aumenta o questionamento se as mutações heterozigotas, muito mais frequentes em genes recessivos, podem contribuir para o

desenvolvimento do parkinsonismo sob algumas circunstâncias, com isso constituindo um fator de risco.

Mutações pontuais em heterozigose não são exclusivas de pacientes com DP, pois já foram identificadas também em controles normais (Lincoln *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006a; Kay *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2008). Sendo assim, é provável que a prevalência de indivíduos controle com mutações em heterozigose tanto em *Parkin* quanto em *PINK1* seja subestimada, já que a maior parte desses indivíduos selecionados não foi submetida ao mesmo exame neurológico rigoroso que os pacientes. Além disso, alguns indivíduos saudáveis podem não ter atingido a idade crítica para manifestação da doença. Outro dado importante se deve ao fato desses controles genotipados nunca terem sido acompanhados por especialistas em distúrbios do movimento. Considerando os resultados controversos observados em estudos caso-controle (Lincoln *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006a; Kay *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2008), o papel de variantes de sequência heterozigotas em genes recessivos ligados à DP ainda não pôde ser determinado de forma conclusiva.

Exames clínicos cuidadosos em familiares portadores de mutações heterozigotas nos genes *Parkin* ou *PINK1* constataram que, de fato, eles podem ser afetados com sinais leves de parkinsonismo clássico (Farrer *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2005; Criscuolo *et al.*, 2006; Hedrich *et al.*, 2006). Além disso, existem fortes evidências de que portadores de mutações heterozigotas apresentem alterações pré-clínicas nos níveis metabólico, estrutural e/ou funcional, que são detectáveis apenas por meio de técnicas modernas de neuroimagem e eletrofisiologia.

Estudos *post-mortem* também poderiam ajudar a elucidar o papel de mutações heterozigotas em genes recessivos ligados a DP. Até o momento, existe um relato da presença de mutações em *Parkin* em tecidos cerebrais de um portador heterozigoto e seis portadores homozigotos ou heterozigotos compostos (Pramstaller *et al.*, 2005). Todos os testes revelaram números reduzidos de neurônios na substância negra. Em relação ao gene *PINK1*, existe apenas um estudo de quatro portadores de mutação em heterozigose que demonstrou que todos os portadores apresentavam as características patológicas típicas de DP idiopática: perda de células neuronais na substância negra, gliose e a presença de corpos de Lewy no tronco cerebral e neocórtex (Gandhi *et al.*, 2006).

Sendo assim, acreditamos que mutações em heterozigose em genes recessivos possam contribuir para a suscetibilidade à DP em um subgrupo de

portadores. Sinais identificáveis da doença podem ser pré-clínicos e, portanto, detectáveis apenas com estudos refinados de neuroimagem ou eletrofisiológicos. Além disso, eles podem ser extremamente sutis e evidentes apenas para neurologistas especializados, que classificarão o paciente como um possível ou provável caso de parkinsonismo. Entre os pacientes com diagnóstico de DP estabelecido, o número de portadores de mutações em heterozigose nos genes *Parkin* e *PINK1* excede em muito o número de portadores de alterações homozigotas ou heterozigotas compostas (Rogaeva *et al.*, 2004; Bonifati *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2009), sugerindo que a heterozigosidade em genes recessivos ligados à DP contribui para o parkinsonismo em um subconjunto significativo de pacientes.

Concluindo, nossos resultados em uma coorte de pacientes brasileiros com DP precoce mostraram que mutações pontuais em *Parkin* são mais frequentes do que em *PINK1*. A ausência de variantes de sequência patogênicas no gene *PINK1* em nossa população é consistente com outros estudos (Godeiro-Junior *et al.*, 2009; Nuytemans *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), reforçando a hipótese de que mutações em *PINK1* são uma causa rara de parkinsonismo precoce com ou sem história familiar. Os resultados encontrados no gene *Parkin* estão de acordo com estudos de outras populações mundiais que encontraram frequências de mutações pontuais semelhantes a nossa (2,9%) (Klein *et al.*, 2005; Nuytemans *et al.*, 2009; Pankratz *et al.*, 2009; Marder *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), diferindo, em contrapartida, da frequência identificada por dois outros grupos brasileiros (5,5% e 11,1%) (Aguiar *et al.*, 2008; Camargos *et al.*, 2009) (**Tabela 13**). Uma possível explicação para estes resultados diferentes seria o tamanho reduzido das amostras testadas pelos mesmos (72 e 45 pacientes, respectivamente).

Tabela 13: Frequência de mutações de ponto encontradas no gene *Parkin* em diferentes populações.

População (Referência)	Amostra N	Fenótipo clínico	Frequência (%)
Este estudo, 2012	136	DP precoce	2,9
Brasileiros (Aguiar <i>et al.</i> , 2008)	72	DP precoce	5,5
Brasileiros (Camargos <i>et al.</i> , 2009)	45	DP precoce	11,1
Norte-americanos (Pankratz <i>et al.</i> , 2009)	420	DP familiar	3,1
Belgas (Nuytemans <i>et al.</i> , 2009)	310	DP	3,5
Hispânicos e não-hispânicos (Marder <i>et al.</i> , 2010)	956	DP precoce	3,2
Chineses (Zhang <i>et al.</i> , 2010)	66	DP precoce	3
Italianos (Klein <i>et al.</i> , 2005)	65	DP precoce	3

Alterações quantitativas identificadas nos genes *Parkin* e *PINK1*

Além das variantes de sequência identificadas nos genes *Parkin* e *PINK1*, encontramos seis mutações de dosagem gênica em cinco pacientes com DP precoce (**Tabela 12**), sendo cinco delas no gene *Parkin* e uma em *PINK1*. Não foi identificada alteração quantitativa no gene *DJ-1*.

Em três probandos, as alterações envolviam o exon 4 do gene *Parkin*, sendo um caso de duplicação e dois de deleção. A paciente PAR2256, com uma duplicação em heterozigose neste exon, manifestou a doença aos 37 anos e não relatou outros casos de parkinsonismo na família (**Tabela 12**). Esta mesma alteração

em heterozigose já havia sido identificada por Pankratz e colaboradores, em 2009, em 2 de 420 probandos com DP familiar.

O paciente PAR2099, portador de uma deleção em heterozigose no exon 4 do gene *Parkin*, é um caso esporádico de DP e manifestou a doença aos 12 anos (forma juvenil) (**Tabela 12**). Além do probando, também foi investigada a presença desta mutação em seus pais e seu irmão (**Figura 29**), o que nos permitiu concluir que o paciente herdou a deleção de sua mãe, de 52 anos, que é uma portadora assintomática. Esta mutação já foi descrita por diversos autores em pacientes com DP de diferentes etnias (Keyser *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2009; Pankratz *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010). Tem sido sugerido que os indivíduos heterozigotos para deleções em *Parkin* podem sofrer haploinsuficiência por causa da redução da expressão e da atividade enzimática da proteína (Klein *et al.*, 2007), conferindo assim um risco maior de desenvolvimento da DP. Devemos, no entanto, ter cautela, uma vez que deleções em heterozigose já foram encontradas em indivíduos controles, tornando a patogenicidade dessas variantes incerta (Brüggemann *et al.*, 2009).

A paciente PAR3380, um caso familiar de DP, iniciou a doença aos 35 anos de idade. Trata-se da única paciente em nossa casuística que exibe uma mutação em homozigose, uma deleção completa do exon 4 no gene *Parkin* (**Tabela 12**). O estudo de segregação em sua família (**Figura 32**) permitiu identificar a mesma alteração, também em homozigose, em seu irmão com DP, que manifestou a doença aos 18 anos (forma juvenil). Ambos são frutos de um casamento consanguíneo, entre primos de 1º grau. Neste caso, sendo a deleção homozigota, é possível afirmar que se trata de uma mutação causal que leva ao fenótipo da DP.

Além das alterações de dosagem no exon 4 do gene *Parkin*, foram identificadas outras alterações nesse gene, envolvendo os exons 3, 5 e 6, em um único paciente (PAR2396), que manifestou a DP aos 46 anos e constitui um caso familiar da doença (**Figura 33**). Trata-se de um heterozigoto composto, que apresenta duas alterações de dosagem no gene *Parkin*: uma deleção dos exons 5-6 e uma duplicação do exon 3 (**Tabela 12**). Além do probando, coletamos o sangue de seu irmão (64 anos), de sua filha (45 anos) e de sua sobrinha (29 anos), cujo pai, já falecido, também tinha DP. Os resultados das análises genéticas demonstraram que cada familiar analisado possui uma das alterações do probando. O irmão e a sobrinha são portadores da deleção dos exons 5 e 6 e sua filha possui a duplicação

do exon 3 (**Figura 33**). Duplicações do exon 3 do gene *Parkin* já foram relatadas, em 2009, por Nuytemans e colaboradores em pacientes com DP oriundos da Bélgica e por Kay e colaboradores (2010) em pacientes americanos com parkinsonismo e em indivíduos controles. Deleção dos exons 5 e 6 no gene *Parkin* já foram identificadas anteriormente por outros autores em pacientes com DP precoce (Scarciolla *et al.*, 2007; Sironi *et al.*, 2008; Pankratz *et al.*, 2009). Já foram relatados na literatura outros casos referentes à coexistência de diferentes mutações de dosagem em *Parkin* em um mesmo paciente com DP (Keyser *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2012).

Foi sugerido que a alta frequência de rearranjos exônicos em *Parkin* seja devida a seus grandes introns e à presença de numerosos elementos repetitivos que levam à instabilidade (Keyser *et al.*, 2009). Além disso, a elevada taxa de rearranjos também pode ser explicada pelo fato de *Parkin* estar localizado dentro de um grande sítio frágil comum, FRA6E, que é conhecido por ser altamente suscetível à instabilidade genômica (Smith *et al.*, 2006). Isto está de acordo com a constatação de que a região mais instável em FRA6E localiza-se entre os exons 2 e 8 de *Parkin*, sugerindo *hotspots* para a formação de lacunas e quebras nas grandes regiões intrônicas (Denison *et al.*, 2003).

Dentre as alterações de dosagem encontradas no gene *Parkin* em nosso estudo, mutações no exon 4 (2 deleções e 1 duplicação) foram as mais frequentes (3/5 = 60%), o que corrobora dados de outros estudos no sentido de ser esse exon um *hotspot* mutacional no gene *Parkin* (Periquet *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2004; Marder *et al.*, 2010). Variações no número de cópias gênicas nesta região têm sido identificadas constantemente em outras etnias (Myhre *et al.*, 2008; Keyser *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2010; Ghazavi *et al.*, 2011; Semenova *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2012).

Segundo Hedrich e colaboradores (2004), a maioria das mutações descritas em *Parkin* afetam as regiões codificantes dos exons 2 a 7 e, mais de 50% dos portadores de mutações possuem rearranjos de exons. Em consulta à tabela 12 constatamos, em nosso estudo, que a prevalência de mutações de dosagem em *Parkin* (n=5) em relação às mutações de sequência (n=3) foi maior, alcançando uma frequência de 62,5%.

O gene *Parkin* também apresentou uma proporção mais elevada de rearranjos exônicos em nossa amostra (3,7%) comparado aos outros genes recessivos (*PINK1*: 0,7%; *DJ-1*: 0%). Resultados esses similares aos alcançados por

Keyser e colaboradores (2009). Deleções ou duplicações em heterozigose foram identificadas em 2,9% dos casos de DP familiar em um estudo norte-americano (Pankratz *et al.*, 2009). Os autores sugeriram que modificações de dosagem no gene *Parkin* desempenham um papel mais importante na suscetibilidade à DP do que mutações de sequência, indicando que efeitos de dosagem parecem ser mais prejudiciais. Um recente estudo (Camacho *et al.*, 2012), realizado em pacientes mexicanos com DP precoce, revelou que 54% dos probandos possuíam algum tipo de alteração em *Parkin*, sendo que 94,1% eram portadores de mutações de dosagem, constituindo essa a maior frequência de rearranjos exônicos em *Parkin* já descrita. Os autores observaram também que deleções eram mais prevalentes que duplicações, da mesma forma como demonstrado em outras populações, incluindo o presente estudo (Marder *et al.*, 2010; Semenova *et al.*, 2011). A análise de 170 pacientes russos com DP precoce, todos casos esporádicos, mostrou que 21 probandos (12,4%) eram portadores de CNVs no gene *Parkin* (Semenova *et al.*, 2011). A mutação mais comum neste grupo de pacientes foram deleções de exons em heterozigose, sendo os exons 3 e 4 mais frequentemente deletados, o que é consistente com outros achados da literatura (Periquet *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2004; Marder *et al.*, 2010).

As constatações relativas à alta prevalência de mutações de dosagem em *Parkin* observada em diferentes grupos populacionais levaram Camacho e colaboradores (2012) a propor uma mudança na estratégia para o diagnóstico molecular da DP, a partir da qual, rearranjos de exons deveriam ser rastreados anteriormente às mutações de ponto. Nosso estudo corrobora a importância de se incluir as análises de dosagem gênica como parte da triagem de mutações em pacientes com DP, principalmente no gene *Parkin*, uma vez que identificamos uma prevalência maior de alterações quantitativas em relação às qualitativas.

A única alteração quantitativa identificada em *PINK1* foi uma deleção heterozigota no exon 1 (**Tabela 12**), encontrada no paciente PAR2083, um caso familiar de DP, que manifestou a doença aos 45 anos (**Figura 27**). A análise de segregação da mutação em sua filha assintomática de 36 anos revelou que ela não herdou esta alteração. Deleções do exon 1 no gene *PINK1* nunca foram descritas na literatura. O exon 1 codifica duas regiões importantes da proteína PINK1, uma sequência N-terminal de ligação à mitocôndria (MTS) de 34 aminoácidos e um provável domínio transmembrana (TMD) que compreende os resíduos 94 à 110

(Valente *et al.*, 2004b). O domínio TMD é crucial para ancorar PINK1 na membrana mitocondrial e garantir que o domínio quinase esteja voltado para o citoplasma (Zhou *et al.*, 2008). Desta forma, acreditamos que deleções nesta região possam interferir com a localização da proteína PINK1 na mitocôndria, destabilizando-a.

Concluindo, em nosso estudo, observamos uma frequência total de alterações patogênicas ou potencialmente patogênicas em pacientes com DP precoce de 7,3%, sendo 6,6% de mutações no gene *Parkin* (2,9% de variantes de sequência e 3,7% de alterações de dosagem) e 0,7% no gene *PINK1* (uma única mutação de dosagem), tanto em casos esporádicos (n=5) como em casos familiares da doença (n=4) (**Tabela 12**). Não identificamos alterações quantitativas no gene *DJ-1*. Como estratégia para a análise molecular de genes recessivos relacionados à DP, sugerimos proceder à investigação genética, inicialmente, pelo gene *Parkin*, seguido das análises dos genes *PINK1* e *DJ-1*.

5 CONCLUSÕES

- ✓ A partir da investigação de mutações pontuais nos genes *Parkin* e *PINK1* em 136 pacientes com DP precoce, identificamos três variantes patogênicas ou potencialmente patogênicas em *Parkin* (p.T240M, p.437L e p.S145N);
- ✓ Estabelecemos a metodologia de MLPA para a análise quantitativa dos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* e, a partir da aplicação em nossa amostra, encontramos três deleções e duas duplicações no gene *Parkin* e uma deleção em *PINK1*, essa nunca descrita na literatura. Não identificamos rearranjos de exons no gene *DJ-1*;
- ✓ Obtivemos uma frequência total de mutações patogênicas (pontuais e de dosagem) nos genes estudados de 7,3%, sendo 6,6% no gene *Parkin* (2,9% de variantes de sequência e 3,7% de alterações de dosagem) e 0,7% no gene *PINK1* (1 CNV);
- ✓ As mutações de dosagem em *Parkin* (n=5) foram mais frequentes que as variantes de sequência (n=3) em nossa casuística, totalizando 62,5% das alterações encontradas neste gene;
- ✓ Dentre as alterações patogênicas identificadas, sete são heterozigotas, uma heterozigota composta e uma homozigota. Acreditamos que mutações em heterozigose em genes recessivos são um fator de risco para um subgrupo específico de pacientes com DP clássica, onde a genética, epigenética e/ou fatores ambientais contribuem para a expressão do fenótipo;

REFERÊNCIAS

- Abbas N, Lücking CB, Ricard S, *et al.* A wide variety of mutations in the *Parkin* gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 567-574.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ, *et al.* A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 2006; 60: 414-419.
- Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7: 248-249.
- Aguiar P, Lessa P, Godeiro C, *et al.* Genetic and environmental findings in early-onset Parkinson's disease Brazilian patients. *Mov Disord* 2008; 23: 1228-1233.
- Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H, *et al.* Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology* 2005; 65: 1460-1461.
- Bardien S, Keyser R, Yako Y, *et al.* Molecular analysis of the *Parkin* gene in South African patients diagnosed with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 116-121.
- Beilina A, Van Der Brug M, Ahmad R, *et al.* Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5703-5708.
- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The Genetics of Parkinson Disease. *J Geriatr Psych Neurol* 2010; 23: 228-242.
- Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, *et al.* Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol* 2008; 255: 8-17.
- Biswas A, Sadhukhan T, Majumder S, *et al.* Evaluation of PINK1 variants in Indian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16: 167-171.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, *et al.* Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299: 256-259.
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, *et al.* Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65: 87-95.
- Bonifati V. Shaking the genome: new studies reveal genetic risk for Parkinson's disease. *Neurology* 2010; 9: 136-138.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197-211.

Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121-134.

Bras J, Guerreiro R, Ribeiro M, *et al.* Analysis of Parkinson disease patients from Portugal for mutations in SNCA, PRKN, PINK1 and LRRK2. *BMC Neurol* 2008; 8: 1.

Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J, *et al.* Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J Med Genet* 2009; 46: 375-381.

Brüggemann N, Mitterer M, Lanthaler AJ, *et al.* Frequency of heterozygous Parkin mutations in healthy subjects: need for careful prospective followup examination of mutation carriers. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 425-429.

Camacho JL, Jaramillo NM, Gómez P, *et al.* High Frequency of Parkin Exon Rearrangements in Mexican-Mestizo Patients with Early-Onset Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2012; 27: 1047-1051.

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.

Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, *et al.* The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9103-9108.

Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006; 125: 1241-1252.

Chen R, Gosavi NS, Langston JW, *et al.* Parkin mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population. *Parkinsonism Relat Disord* 2003; 9: 309-312.

Choi J, Woo M, Ma H, *et al.* Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008; 9: 263-269.

Clark L, Afridi S, Karlins E, *et al.* Case-control study of the Parkin gene in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006a; 63: 548-552.

Clark IE, Dodson MW, Jiang C, *et al.* Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006b; 441: 1162-1166.

Cookson MR. Pathways to Parkinsonism. *Neuron* 2003; 37: 7-10.

Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 29-52.

Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 1161-1218.

Criscuolo C, Volpe G, De Rosa A, *et al.* PINK1 homozygous W437X mutation in a patient with apparent dominant transmission of parkinsonism. *Mov Disord* 2006; 21: 1265–1267.

Crosiers D, Theuns J, Cras P, *et al.* Parkinson disease: Insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *J Chem Neuroanat* 2011; 42: 131-141.

da Costa CA & Checler F. Parkin: Much More than a Simple Ubiquitin Ligase. *Neurodegener Dis* 2012; 10: 49-51.

Dauer W & Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.

de Lau LM & Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-535.

De Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, *et al.* Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 10-15.

Deng H, Le W, Shahed J, *et al.* Mutation analysis of the Parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families. *Neurosci Lett* 2008; 430: 18–22.

Denison SR, Wang F, Becker NA, *et al.* Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene* 2003; 22: 8370–8378.

Deshaies RJ & Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 399–434.

Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, *et al.* Detection of *Parkin* (*PARK2*) and *DJ1* (*PARK7*) Mutations in Early-Onset Parkinson Disease: *Parkin* Mutation Frequency Depends on Ethnic Origin of Patients. *Hum Mutat* 2004; 23: 525.

Djarmati A, Guzvic M, Grünewald A, *et al.* Rapid and reliable detection of exon rearrangements in various movement disorders genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mov Disord* 2007; 22: 1708-1714.

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

Edwards TL, Scott WK, Almonte C, *et al.* Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 2010; 74: 97-109.

Farrer M, Chan P, Chen R, *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001; 50: 293–300.

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

Ferrer-Costa C, Gelpí J, 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.

Foroud T, Uniacke SK, Liu L, *et al.* Heterozygosity for a mutation in the *Parkin* gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 2003; 60: 796-801.

Gandhi S, Muqit MMK, Stanyer L, *et al.* PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 2006; 129: 1720–1731.

Gaweda-Walerych K, Safranow K, Jasinska-Myga B, *et al.* PARK2 variability in Polish Parkinson's disease patients – interaction with mitochondrial haplogroups. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: 520-524.

Ghazavi F, Fazlali Z, Banihosseini SS, *et al.* PRKN, DJ-1, and PINK1 Screening Identifies Novel Splice Site Mutation in PRKN and Two Novel DJ-1 Mutations. *Mov Disord* 2011; 26: 80-89.

Godeiro-Junior C, de Carvalho-Aguiar PM, Felício AC, *et al.* PINK1 Mutations in a Brazilian Cohort of Early-Onset Parkinson's Disease Patients. *Mov Disord* 2009; 24: 1693-1696.

Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4078-4083.

Guo JF, Zhang XW, Nie LL, *et al.* Mutation analysis of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism. *J Neurol* 2010; 257: 1170-1175.

Hattori N, Kitada T, Matsumine H, *et al.* Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol* 1998; 44: 935-941.

Healy DG, Abou-Sleiman PM, Gibson JM, *et al.* PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology* 2004; 63: 1486-1488.

Hedrich K, Kann M, Lanthaler A, *et al.* The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the Parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1649-1656.

Hedrich K, Marder K, Harris J, *et al.* Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for *Parkin* mutations. *Neurology* 2002; 58: 1239-1246.

Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, *et al.* Distribution, type and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004; 19: 1146-1157.

Hedrich K, Hagenah J, Djarmati A, *et al.* Clinical spectrum of homozygous and heterozygous PINK1 mutations in a large German family with Parkinson disease: role of a single hit? *Arch Neurol* 2006; 63: 833–838.

Hershko A & Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425–479.

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

Irrcher I, Aleyasin H, Seifert EL, *et al.* Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Human Molecular Genetics* 2010; 19: 3734-3746.

Ishihara-Paul L, Hulihan MM, Kachergus J, *et al.* PINK1 mutations and parkinsonism. *Neurology* 2008; 71: 896-902.

Junn E, Jang WH, Zhao X, *et al.* Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *Journal of Neuroscience Research* 2009; 87: 123-129.

Kawajiri S, Saiki S, Sato S, *et al.* Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 573-580.

Kay DM, Moran D, Moses L, *et al.* Heterozygous *Parkin* point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol* 2007; 61: 47-54.

Kay D, Stevens C, Hamza T, *et al.* A comprehensive analysis of deletions, multiplications and copy number variations in PARK2. *Neurology* 2010; 75: 1189-1194.

Keyser RJ, Lombard D, Veikondis R, *et al.* Analysis of exon dosage using MLPA in South African Parkinson's disease patients. *Neurogenetics* 2009; 11: 305-312.

Keyser RJ, Lesage S, Brice A, *et al.* Assessing the prevalence of PINK1 genetic variants in South African patients diagnosed with early- and late-onset Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 125-129.

Khan NL, Horta W, Eunson L, *et al.* Parkin disease in a Brazilian kindred: manifesting heterozygotes and clinical follow-up over 10 years. *Mov Disord* 2005; 20: 479–484.

Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, *et al.* Systematic Review and UK Based Study of PARK2 (*parkin*), PINK1, PARK7 (*DJ-1*) and LRRK2 in early onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27: 1522-1529.

Kim, Y, Park J, Kim S, *et al.* PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 975-980.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608.

Klein C, Djarmati A, Hedrich K, *et al.* PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 1086-1093.

Klein C & Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 136-146.

Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, *et al.* Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with Parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; 6: 652–662.

Klein C & Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 453-464.

Klein C & Schlossmacher MG. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology* 2007; 69: 2093–2104.

Klein C & Lohmann-Hedrich K. Parkinson disease(s): is “Parkin disease” a distinct clinical entity? *Neurology* 2009; 72: 106–107.

Koziorowski D, Hoffman-Zacharska D, Slawek J, *et al.* Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16: 136-138.

Kuhn K, Zhu XR, Lubbert H, *et al.* Parkin expression in the developing mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 149: 131–142.

Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, *et al.* Mutation Analysis of the *PINK1* Gene in 391 Patients With Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2008; 65: 802-808.

Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, *et al.* Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 883–895.

Langston JW, Ballard P, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.

Lee M, Mata I, Lin C, *et al.* Genotype-phenotype correlates in Taiwanese patients with early-onset recessive Parkinsonism. *Mov Disord* 2009; 24: 104-108.

Lesage S, Lohmann E, Tison F, *et al.* Rare heterozygous parkin variants in French early onset Parkinson disease patients and controls. *J Med Genet* 2008; 45: 43-46.

Li Y, Tomiyama H, Sato K, *et al.* Clinicogenetic study of *PINK1* mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 2005; 64: 1955-1957.

Lim KL, Chew KC, Tan JM, *et al.* Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* 2005; 25: 2002–2009.

Lincoln S, Maraganore D, Lesnick T, *et al.* Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. *Mov Disord* 2003; 18: 1306-1311.

Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, *et al.* How much phenotypic variation can be attributed to *Parkin* genotype? *Ann Neurol* 2003; 54: 176-185.

Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, *et al.* Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the *Parkin* gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560–1567.

Lücking C, Chesneau V, Lohmann E, *et al.* Coding polymorphisms in the *Parkin* gene and susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1253-1256.

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.

Madegowda RH, Kishore A, Anand A. Mutational screening of the *parkin* gene among South Indians with early onset Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1588-1590.

Marder K, Tang M, Mejia-Santana H, *et al.* Predictors of *Parkin* mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* 2010; 67: 731-738.

Marongiu R, Brancati F, Antonini A, *et al.* Whole Gene Deletion and Splicing Mutations Expand the *PINK1* Genotypic Spectrum. *Hum Mutat* 2007; 28: 98.

Martin I, Dawson VL, Dawson TM. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011; 12: 301-325.

Martínez H, González-González H, Cantú-Martínez L, *et al.* PARKIN-coding polymorphisms are not associated with Parkinson's disease in a population from northeastern Mexico. *Neurosci Lett* 2010; 468: 264-266.

Mitsumoto A & Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res* 2001; 35: 885–893.

Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, *et al.* Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Human Molecular Genetics* 2005; 14: 71-84.

Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, *et al.* Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with *Parkin* mutations. *Mov Disord* 2004; 19: 544–548.

Muñoz E, Tolosa E, Pastor P, *et al.* Relative high frequency of the c.255delA *Parkin* gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73: 582-584.

Myhre R, Steinkjer S, Stormyr A, *et al.* Significance of the *parkin* and *PINK1* gene in Jordanian families with incidences of young-onset and juvenile parkinsonism. *BMC Neurol* 2008; 8: 47.

Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, *et al.* DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 509-513.

Nakajima A, Kataoka K, Hong M, *et al.* BRPK, a novel protein kinase showing increased expression in mouse cancer cell lines with higher metastatic potential. *Cancer Lett* 2003; 201: 195-201.

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, *et al.* Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183: 795–803.

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, *et al.* Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* 2009; 5: 706–708.

Ng P & Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3812-3814.

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, Theuns J, Cruts M, *et al.* 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.

Oliveira SA, Scott WK, Martin ER, *et al.* *Parkin* mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53: 624-629.

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.

Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 18614–18622.

Pan T, Kondo S, Le W, *et al.* The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131: 1969–1978.

Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, *et al.* Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2006; 408: 209-213.

Pankratz N, Kissell D, Pauciulo M, *et al.* Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology* 2009; 73: 279-286.

- Park J, Lee SB, Lee S, *et al.* Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; 441: 1157-1161.
- Periquet M, Latouche M, Lohmann E, *et al.* *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126: 1271-1278.
- Pesah Y, Pham T, Burgess H, *et al.* *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 2004; 131: 2183–2194.
- Pilcher H. Parkin implicated in sporadic Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2005; 4: 798.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, *et al.* Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol* 2005; 58: 411–422.
- Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, *et al.* PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 2007; 5: e172.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, *et al.* MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic Model of Parkinson's Disease. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 375–379.
- Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, *et al.* Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004; 61: 1898-1904.
- Romito L, Contarino M, Ghezzi D, *et al.* High frequency stimulation of the subthalamic nucleus is efficacious in Parkin disease. *J Neurol* 2005; 252: 208-211.
- 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.
- Scarciolla O, Brancati F, Valente E, *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification assay for simultaneous detection of Parkinson's disease gene rearrangements. *Mov Disord* 2007; 22: 2274-2278.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, *et al.* Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-827.
- Schiesling C, Kieper N, Seidelt K, *et al.* Familial Parkinson's disease - genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2008; 34: 255–271.
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, *et al.* Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 2002; 160: 1655-1667.

Schouten J, McElgunn C, Waaijer R, *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.

Schulte C & Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *The Application of Clinical Genetics* 2011; 4: 67-80.

Semenova EV, Shadrina MI, Slominsky PA, *et al.* Analysis of PARK2 Gene Exon Rearrangements in Russian Patients with Sporadic Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2012; 27: 139-142.

Shen J & Cookson MR. Mitochondria and dopamine: new insights into recessive parkinsonism. *Neuron* 2004; 43: 301-304.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, *et al.* Familial Parkinson disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302-305.

Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, *et al.* Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3477-3492.

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.

Sironi F, Primignani P, Zini M, *et al.* Parkin analysis in early onset Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 14: 326-333.

Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, *et al.* Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett* 2006; 232: 48-57.

Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, *et al.* Influence of heterozygosity for *Parkin* mutation on onset age in familial Parkinson disease: the *Gene PD* study. *Arch Neurol* 2006; 63: 826-832.

Thomas B & Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 183-194.

Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, *et al.* DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Human Molecular Genetics* 2011; 20: 40-50.

Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, *et al.* Mutation analysis for DJ-1 in sporadic and familial parkinsonism: screening strategy in parkinsonism. *Neurosci Lett* 2009; 455: 159-161.

Unoki M & Nakamura Y. Growth-suppressive effects of *BPOZ* and *EGR2*, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001; 20: 4457-4465.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004a; 304: 1158-1160.

- Valente EM, Salvi S, Ialongo T, *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004b; 56: 336-341.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, *et al.* Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 1015-1022.
- Varrone A, Pellecchia MT, Amboni M, *et al.* Imaging of dopaminergic dysfunction with [123I]FP-CIT SPECT in early-onset *parkin* disease. *Neurology* 2004; 63: 2097-2103.
- Vinish M, Prabhakar S, Khullar M, *et al.* Genetic screening reveals high frequency of PARK2 mutations and reduced Parkin expression conferring risk for Parkinsonism in North West India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 166-170.
- Vives-Bauza C, de Vries RL, Tocilescu MA, *et al.* Is there a pathogenic role for mitochondria in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 241-244.
- von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 175–184.
- Wang C, Tan JM, Ho MW, *et al.* Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *J Neurochem* 2005; 93: 422-431.
- Wang DL, Qian L, Xiong H, *et al.* Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13520–13525.
- Wider C, Foroud T, Wszolek ZK. Clinical implications of gene discovery in Parkinson's disease and parkinsonism. *Mov Disord* 2010; 25: 15-20.
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 521-528.
- Wu R, Bounds R, Lincoln S, *et al.* *Parkin* mutations and early onset parkinsonism in a Taiwanese cohort. *Arch Neurol* 2005; 62: 82-87.
- Wu R, Wu H, Chao Y, *et al.* Genetic analysis of *Parkin* in early-onset Parkinson's disease (PD): novel intron 9 g>a single nucleotide polymorphism and risk of Taiwanese PD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 153: 229-234.
- Yang Y, Gehrke S, Haque ME, *et al.* Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13670–13675.
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, *et al.* Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *BiochemBiophys Res Commun* 2003; 312: 1342–1348.

Xiong H, Wang D, Chen L, *et al.* Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* 2009; 119: 650-660.

Zhang L, Shimoji M, Thomas B, *et al.* Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2063-2073.

Zhang B, Hu Z, Yin X, *et al.* Mutation analysis of Parkin and PINK1 genes in early-onset Parkinson's disease in China. *Neurosci Lett* 2010; 477: 19-22.

Zhou C, Huang Y, Shao Y, *et al.* The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 12022-12027.

Zhuge J & Cederbaum AI. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A prevents pyrazole plus lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Free Radical Biology and Medicine* 2009; 46: 406-413.

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

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes *Parkin*, *PINK1* e *DJ-1* e suas características principais (continua)

Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
1	PAR1147	47 (35)	M	I	HUCFF
2	PAR1148	48 (42)	M	F	HUCFF
3	PAR1161	59 (49)	M	I	HUPE
4	PAR1162	64 (47)	M	I	HUPE
5	PAR1170	57 (43)	F	I	HUCFF
6	PAR1173	62 (44)	F	I	HUCFF
7	PAR1176	57 (49)	F	I	HUPE
8	PAR1182	39 (26)	F	I	HUCFF
9	PAR1183	58 (44)	F	I	HUCFF
10	PAR1185	62 (50)	M	I	HUPE
11	PAR1186	57 (45)	F	I	HUPE
12	PAR1192	69 (50)	M	I	HUCFF
13	PAR1196	47 (40)	F	I	HUPE
14	PAR1218	55 (45)	F	I	HUCFF
15	PAR1221	55 (46)	M	I	HUPE
16	PAR1229	56 (43)	M	I	HUCFF
17	PAR1232	54 (43)	M	I	HUPE
18	PAR1247	48 (46)	F	I	HUCFF
19	PAR1287	56 (40)	M	I	HUPE
20	PAR1294	61 (45)	F	I	HUCFF
21	PAR1296	58 (42)	F	I	SCM
22	PAR1297	57 (43)	M	I	SCM
23	PAR1305	38 (36)	F	I	SCM
24	PAR1307	54 (44)	M	I	SCM

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i>, <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais (continuação)					
Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
25	PAR1308	56 (50)	F	I	SCM
26	PAR1319	64 (48)	M	F	HUPE
27	PAR1321	50 (40)	F	F	SCM
28	PAR1322	54 (48)	M	I	SCM
29	PAR1323	54 (47)	F	I	SCM
30	PAR1330	33 (31)	M	I	HUPE
31	PAR1335	61 (50)	M	I	HUPE
32	PAR1345	33 (14)	M	I	HUPE
33	PAR1355	64 (48)	M	I	HUPE
34	PAR1377	48 (38)	F	I	HUCFF
35	PAR1386	49 (46)	M	I	HUPE
36	PAR1394	43 (38)	F	I	INDC
37	PAR1397	53 (50)	F	I	HUCFF
38	PAR1399	42 (39)	M	I	HUCFF
39	PAR1401	43 (37)	F	F	INDC
40	PAR1402	71 (47)	M	I	HUCFF
41	PAR1404	62 (48)	M	I	HUCFF
42	PAR1405	38 (35)	F	I	HUCFF
43	PAR1407	58 (43)	M	I	SCM
44	PAR1409	47 (33)	M	I	SCM
45	PAR1436	41 (35)	M	I	HUPE
46	PAR1438	42 (37)	M	I	HUPE
47	PAR1441	62 (50)	M	I	INDC
48	PAR1442	43 (38)	M	F	INDC

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i>, <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais (continuação)					
Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
49	PAR1443	61 (44)	F	I	HUCFF
50	PAR1450	34 (26)	F	I	HUCFF
51	PAR1452	64 (47)	M	I	HUCFF
52	PAR1453	48 (36)	M	I	SCM
53	PAR1455	57 (47)	M	F	HUCFF
54	PAR1456	70 (43)	F	F	HUCFF
55	PAR1457	80 (50)	M	F	HUCFF
56	PAR1458	59 (45)	F	I	HUCFF
57	PAR1459	46 (42)	M	I	HUCFF
58	PAR1460	60 (42)	M	I	HUCFF
59	PAR1463	53 (46)	F	I	SCM
60	PAR1511A	47 (47)	M	F	SCM
61	PAR1512	54 (50)	M	I	HUCFF
62	PAR1636	47 (44)	M	I	HUCFF
63	PAR1646	51 (41)	M	I	HUCFF
64	PAR1649	57 (49)	F	I	HUPE
65	PAR1650	53 (42)	M	I	HUPE
66	PAR1661	49 (27)	M	I	SCM
67	PAR1667	38 (35)	M	F	HUCFF
68	PAR1695	61 (44)	M	I	HUCFF
69	PAR1703	35 (25)	M	I	SCM
70	PAR1704	56 (47)	M	I	SCM
71	PAR1705	38 (34)	F	F	SCM
72	PAR1963	43 (39)	M	I	GOIÁS

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i>, <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais (continuação)					
Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
73	PAR1964	40 (39)	M	I	GOIÁS
74	PAR1965	44 (39)	M	I	GOIÁS
75	PAR1966	39 (36)	M	I	GOIÁS
76	PAR1967	48 (37)	M	I	GOIÁS
77	PAR1968	41 (38)	M	I	GOIÁS
78	PAR1969	40 (38)	F	I	GOIÁS
79	PAR2036	46(40)	F	F	HUCFF
80	PAR2046	96(33)	M	F	HUCFF
81	PAR2056	59(39)	M	F	HUCFF
82	PAR2064	62(40)	M	I	HUCFF
83	PAR2065	59(43)	F	I	HUCFF
84	PAR2067	70(47)	M	I	HUCFF
85	PAR2068	56(28)	M	I	HUCFF
86	PAR2081	59(40)	M	I	HUCFF
87	PAR2083	59(45)	M	F	HUCFF
88	PAR2085	48 (42)	M	I	HUCFF
89	PAR2097	36(30)	M	I	HUCFF
90	PAR2098	58(49)	F	F	HUCFF
91	PAR2099	21(12)	M	I	HUCFF
92	PAR2101	44(33)	F	I	HUCFF
93	PAR2118	58 (47)	M	I	HUPE
94	PAR2119	58 (45)	M	F	HUCFF
95	PAR2127	57 (46)	M	I	HUCFF
96	PAR2133	50 (40)	M	I	HUCFF

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i>, <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais (continuação)					
Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
97	PAR2143	51 (47)	M	I	HUCFF
98	PAR2145	50 (45)	M	I	HUPE
99	PAR2172	42 (29)	F	I	HUPE
100	PAR2256	45 (37)	F	I	HUPE
101	PAR2257	42 (38)	F	F	HUPE
102	PAR2259	42 (40)	M	I	HUPE
103	PAR2266	43 (42)	M	I	HUCFF
104	PAR2267	49 (45)	F	I	HUCFF
105	PAR2268	52 (43)	M	F	HUCFF
106	PAR2285	49 (30)	F	I	HUCFF
107	PAR2300	56 (42)	F	I	HUCFF
108	PAR2302	36 (34)	M	I	GOIÁS
109	PAR2303	34 (29)	M	I	GOIÁS
110	PAR2304	45 (32)	M	I	GOIÁS
111	PAR2345	41 (38)	M	F	HUCFF
112	PAR2352	41 (20)	F	I	HUCFF
113	PAR2355	54 (44)	F	I	HUPE
114	PAR2357	51 (46)	M	F	HUPE
115	PAR2358	64 (49)	F	F	HUPE
116	PAR2362	50 (46)	F	I	HUPE
117	PAR2363	63 (42)	M	I	HUPE
118	PAR2367	49 (48)	M	I	INEURO
119	PAR2368	51 (47)	M	I	INEURO
120	PAR2369	34 (31)	F	I	INEURO

Apêndice A - Pacientes analisados para alterações nos genes <i>Parkin</i>, <i>PINK1</i> e <i>DJ-1</i> e suas características principais (conclusão)					
Nº	Registro do paciente	Idade (IM)	Sexo	Caso familiar (F) ou isolado (I) da DP	Origem
121	PAR2371	62 (49)	F	I	INEURO
122	PAR2374	52 (40)	M	F	INEURO
123	PAR2375	38 (34)	F	I	INEURO
124	PAR2376	40 (37)	M	F	INEURO
125	PAR2380	52 (37)	M	F	INEURO
126	PAR2381	46 (38)	F	I	INEURO
127	PAR2384	46 (38)	F	F	INEURO
128	PAR2385	55 (45)	M	F	INEURO
129	PAR2386	46 (43)	M	I	INEURO
130	PAR2388	55 (48)	F	F	INEURO
131	PAR2389	47 (37)	M	F	INEURO
132	PAR2391	24 (24)	M	I	INEURO
133	PAR2395	50 (39)	M	I	HUCFF
134	PAR2396	69 (46)	M	F	HUCFF
135	PAR2397	57 (50)	F	I	HUCFF
136	PAR3380	59 (35)	F	F	UFF

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

Disease Markers 32 (2012) 173–178
DOI 10.3233/DMA-2011-0873
IOS Press

173

Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

Karla Cristina Vasconcelos Moura^{a,1}, Mário Campos Junior^{a,1}, Ana Lúcia Zuma de Rosso^b, Denise Hack Nicaretta^c, João Santos Pereira^d, Delson José Silva^{e,f}, Cíntia Barros Santos-Rebouças^a, Márcia Mattos Gonçalves Pimentel^{a,*}

^aInstituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bHospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^cUniversidade Gama Filho, Rio de Janeiro, Brazil

^dFaculdade de Ciências Médicas, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^eNúcleo Neurociências, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brazil

^fInstituto Integrado de Neurociências, Goiás, Brazil

Abstract. Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative disorders associated with aging, reaching ~ 2% of individuals over 65 years. Knowledge achieved in the last decade about the genetic basis of Parkinson's disease clearly shows that genetic factors play an important role in the etiology of this disorder. Exon dosage variations account for a high proportion of Parkinson's disease mutations, mainly for *PARKIN* gene. In the present study, we screened genomic rearrangements in *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes in 102 Brazilian Parkinson's disease patients with early onset (age of onset \leq 50 years), using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. Family history was reported by 24 patients, while 78 were sporadic cases. Screening of exon dosage revealed *PARKIN* and *PINK1* copy number variations, but no dosage alteration was found in *SNCA* and *DJ-1* genes. Most of the carriers harbor heterozygous deletions or duplications in the *PARKIN* gene and only one patient was found to have a deletion in *PINK1* exon 1. Data about dosage changes are scarce in the Brazilian population, which stresses the importance of including exon dosage analysis in Parkinson's disease genetic studies.

Keywords: Copy number variation, early-onset, MLPA, Deletion, Duplication

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is mainly characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* and also by the involvement of other *nuclei* in the brain. PD is the

second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, affecting ~ 2% of individuals over 65 years [7] and occurring worldwide. The clinical symptoms vary, but they are mainly characterized by rest tremor, postural instability, rigidity, and bradykinesia, as well as, a good response to levodopa therapy [8]. Both genetic and environmental factors can be implicated in its etiology. In the past decade, several genetic factors have been identified and five genes were conclusively implicated as causative of autosomal dominant (*SNCA* and *LRRK2*) or autosomal recessive (*PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1*) forms of PD [11].

¹These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author: Departamento de Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC, sala 501F. Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 2334-0039; E-mail: pimentel@uerj.br.

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

174

K.C.V. Moura et al. / Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease

Besides missense mutations and single nucleotide polymorphisms, genomic rearrangements (deletions and multiplications containing entire exons or genes) are common mutations found in PD patients [21]. This type of alteration plays a particularly important role in the *PARKIN* gene, where they are significantly more frequent [21]. Point mutations and copy number alterations have been described in all 12 exons of *PARKIN* and they typically leads to juvenile-onset (< 21 years) or early-onset forms of PD (≤ 50 years) [1,19]. Exon rearrangements account for more than 50% of patients with *PARKIN* mutations [13], which highlight the importance of screening copy number variations in this gene. These mutations can be present in homozygous, compound heterozygous or heterozygous state, suggesting that *PARKIN* may present itself as a causative or a susceptibility genetic factor [10,26].

Additionally to *PARKIN*, whole gene multiplications (duplications or triplications) have been described for *SNCA* gene, which leads to overexpression of the protein caused by the extra copies of the gene. *SNCA* is the only PD gene that undergoes duplications of its entire extension, which makes its gain-of-function pathogenic process unique between the genetic causes of PD [21]. In addition, there is a direct correlation between the dose of *SNCA* multiplications (duplication or triplication) with the severity and the age of onset of the patient's symptoms. For this reason, *SNCA* dosage alteration is one of the few well-established genotype-phenotype correlations in PD.

Mutations of exon dosage have also been identified in two additional PD genes, *PINK1* [20] and *DJ-1* [9], but they were observed in a relative lower frequency than those seen in *PARKIN*. No copy number variation affecting the dosage of *LRRK2* or its exons was ever found [21].

In this study, we present the first analysis of genomic rearrangements in known parkinsonian genes in Brazilian PD patients, using the multiplex ligation-dependent probe amplification method (MLPA), to ascertain whether exon dosage changes in *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* are an important genetic factor in the etiology of this disorder in our population.

2. Materials and methods

The molecular analysis was performed in a sample of 102 unrelated Brazilian patients (64 males and 38 females; mean age: 51.9 ± 10.4 years) diagnosed with early-onset PD (≤ 50 years), including two cases of

juvenile parkinsonism (age at onset of 12 and 14 years). The mean age at onset (AAO) of our sample was 41.4 ± 6.6 years. The patients were recruited by specialized clinicians from movement disorder clinics of major public hospitals from the Southeast and Midwest regions of Brazil and fulfilled criteria established for the clinical diagnosis of PD [14]. Family history of PD was self-reported by 24 patients, while 78 were sporadic cases. No individual reported an Ashkenazi Jewish background. The research protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (REG. 032.2.2008), and written informed consent was obtained from all subjects.

The DNA of each participant was obtained from a sample of peripheral blood through extraction using Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Dosage analysis was performed by MLPA. The commercially available kit P051-C1 (MRC Holland) was used for the multiplex dosage of exons in genes *PARKIN*, *SNCA*, *DJ-1* and *PINK1*. MLPA reaction conditions followed the protocol suggested by MRC Holland, except for the quantity of DNA used (50 ng) and the time of the initial denaturation (40 minutes) to fix problems with incomplete denaturation in some samples. MLPA fragments were analyzed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) following the configuration recommended by MRC Holland. The results were processed on GeneMapper software v3.7 (Applied Biosystems) and then analyzed on Coffalyser (<http://old.mlpa.com/coffalyser/index.html>), a macro written in Visual Basic that runs within Microsoft Office Excel. The peak areas were normalized against the sum of the areas observed in the control probes for each patient. The normalized value was compared with the mean normalized value of a group of control to generate a ratio that represents the relative number of copies. A value of one or near one is normal (two copies), values below 0.65 point a deletion, 1.35–1.65 means three copies and so on.

All abnormal findings pointing to possible deletions and duplications detected by MLPA were verified in a second independent experiment and, after, in a quantitative PCR assay (qPCR). The dosage by qPCR was performed in a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The relative copy number was calculated through a $\Delta\Delta CT$ method, using ALB as an internal reference as previously described [5]. False positives were sequenced to verify the existence of SNPs within the sequence of hybridization of the MLPA probe and patients who exhibited dosage changes

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

K.C.V. Moura et al. / Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease

175

Table 1
Duplications and deletions observed in Brazilian early onset PD patients

Patient	Region	Variation	AAO	Family history ^a	M/F ^b
2083	<i>PINK1</i> – Exon 1	Deletion	45	+	M
2099	<i>PARKIN</i> – Exon 4	Deletion	12	–	M
2256	<i>PARKIN</i> – Exon 4	Duplication	37	–	F
2396	<i>PARKIN</i> – Exon 5–6	Deletion	46	+	M
	<i>PARKIN</i> – Exon 3	Duplication			

AAO age at onset.

^a – absent; + present.

^b M male; F female.

had the entire exons of the respective gene sequenced in order to screen for a possible second pathogenic mutation. Sequencing was performed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with the BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Primer sequences are available upon request.

3. Results

Screening of the exon dosage through MLPA in 100 Brazilian patients with early onset PD and two probands with juvenile onset, revealed four patients (3.9%), two familial and two sporadic cases, with copy number variations of specific exons in genes *PARKIN* and *PINK1*. MLPA Kit P051-C1 tests for all 12 *PARKIN* exons and multiplications were detected in exons 3 and 4 (three copies). Deletions were detected in exons 4, 5 and 6 (one copy). In *PINK1*, all 8 exons were analyzed, but only exon 1 was found to be deleted (one copy) in one patient. No duplications were found in *PINK1*. In addition, no *SNCA* gene multiplication or *DJ-1* dosage alterations were observed in our sample (Table 1). Most of our cases consisted in heterozygous deletions or duplications in the *PARKIN* gene (patients 2099 and 2256). One patient, 2396, harbors a deletion of *PARKIN* exons 5–6 and a duplication of *PARKIN* exon 3 (Fig. 1).

The MLPA screening detected a heterozygous deletion of *PINK1* exon 1 in 6 patients. However, only one *PINK1* exon 1 deletion, observed in patient 2083, was confirmed after validation by real time PCR, revealing a high occurrence of false positives in this region. Sequencing revealed that the false positives were not due to SNPs and it is postulated that it may be as a result of incomplete denaturation of this particular probe which occurs in a GC-rich region.

No point mutations within the exonic sequence of the affected genes (*PARKIN* and *PINK1*) were detected in the patients with heterozygous variants, with the exception of patient 2256, who carries a duplication in *PARKIN* exon 4 and also harbors the silent variant c.1021C>T in *PARKIN* exon 9 (p.L341L).

4. Discussion

Since exonic dosage alterations in the *PARKIN* gene were first identified in families with juvenile parkinsonism, segregating as an autosomal recessive form of PD [17], copy number variations of exons or entire genes related to PD have been gaining an increased attention over the years and have been screened in several populations across the world [21]. However, data about these mutations are scarce in the Brazilian population. Only one study has analyzed genomic dosage in *PARKIN*, *SNCA*, *DJ-1* and *PINK1* in a sample of 45 Brazilian PD patients with early onset [4].

The screening of quantitative changes in *PARKIN*, *PINK1*, *DJ-1* and *SNCA* genes in our sample revealed five copy number variations in four probands. Among the changes identified, *PARKIN* was the most frequently mutated, harboring four copy number alterations located in exons 3, 4, 5 and 6. Exon 4 was the most affected region, accounting for 50% of the total mutations in *PARKIN*, corroborating the data present in the literature [12,13,23,27].

Among all the changes identified in *PARKIN* so far, exon rearrangements are responsible for, approximately, 50% of cases [13]. Because of its genomic structure, the *PARKIN* gene is prone to a high rate of irregular meiotic recombination processes that lead to exonic rearrangements [2]. These dosage mutations can be present in either homozygous, compound heterozygous or heterozygous states. We identified a heterozygous deletion in exon 4 of *PARKIN* gene in one patient who has a juvenile AAO of 12 years and no family history of the disease. This alteration had already been reported by other groups in PD patients and healthy individuals [3,6,15,22]. Kay and colleagues (2010) demonstrated that heterozygous dosage mutations in exons 2–4 are common and well-tolerated in control subjects [15]. However, it is possible that harboring a single *PARKIN* mutation could be a risk factor that, combined with other unknown genetic and environmental factors, can lead to PD phenotype. We have also found an exon

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

176

K.C.V. Moura et al. / Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease

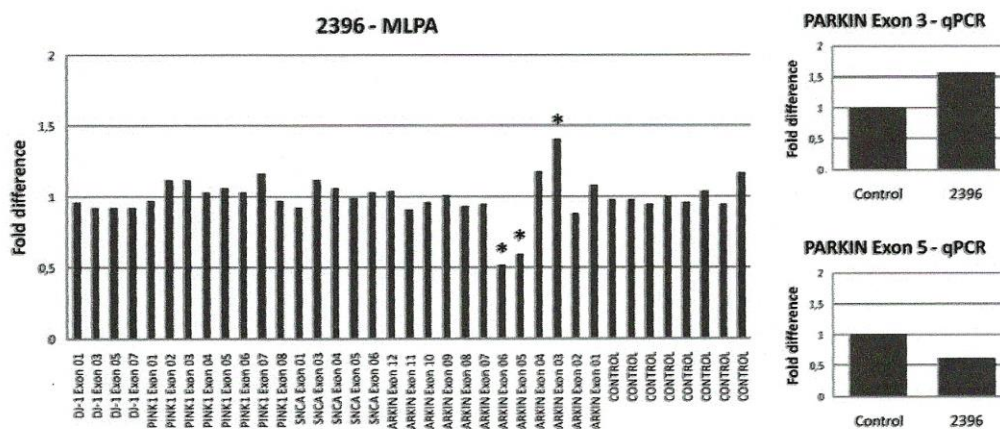


Fig. 1. Left: MLPA analysis result of a patient (2396) that harbors two mutations in *PARKIN* gene: duplication in exon 3 (3 copies) and a deletion of exons 5–6 (1 copy). Asterisks indicate the probes that were affected by the genomic rearrangements in the three exons of *PARKIN*. The vertical axis represents the ratios calculated and the horizontal axis represents the different probes within the SALSA P051 MLPA kit. Right: quantitative PCR validation of the duplication in exon 3 (upper) and of the deletion in exon 5 (lower).

4 duplication in another sporadic case that manifested the symptoms of the disease at 37 years of age.

An exon 5–6 deletion was detected in a male PD patient. Deletions in exon 5 were previously found in PD patients by several other studies [21], and it was also reported to be present in a healthy female [18]. Deletions in exon 6, however, were never detected in healthy individuals. Moreover, the patient also harbors a duplication in exon 3. He manifested PD symptoms at 46 years and reported a positive family history of parkinsonism, different from the other probands of our sample with mutations in *PARKIN* that were all sporadic cases of the disease. We believe that segregation studies would help clarify the pathogenic value of both variants, however, biological material of family members is not available at this time.

In the analysis of the *PINK1* gene, the MLPA technique initially detected an apparent heterozygous deletion of exon 1 in six patients. However, by verification through qPCR, the deletion was not confirmed in five cases. Only patient 2083, a case of familial PD, with AA0 of 45 years, was found to harbor a novel exon 1 deletion. Only deletions in this gene were reported associated with PD so far and, in exception of one case of a complete deletion of *PINK1* [20], no rearrangement was observed affecting exons 1 or 2 [21]. To our knowledge, this is the first report of a patient with a deletion affecting only exon 1 of *PINK1*.

SNCA multiplications have been implicated in autosomal dominant forms of PD since 2003 [25]. However,

it became clear that whole-gene multiplications in *SNCA* locus are a rare form of parkinsonism and may account for only a small fraction of the total number of PD patients [21,24]. Corroborating this data, we have not found any dosage alteration involving the *SNCA* gene and the *DJ-1* gene in our sample. The *DJ-1* gene is another example of a rare genetic factor associated with PD. Point mutations and copy number variations in this gene represent less than 1% of all genetic variants found in PD [21].

In this study, we have used MLPA to screen for exon deletions and duplications, which showed to be effective and reproducible, but it is necessary to confirm positive results by real time PCR, as false positives can arise. In conclusion, dosage mutations are relatively common in Brazilian early onset PD patients. The frequency observed by our study was similar to others from the literature [6,13,16]. *PARKIN* presented the majority of dosage alterations compared with the other known PD genes, as expected, while *PINK1*, *SNCA* and *DJ-1* exon rearrangements were less common. Our results confirm the importance of including exon dosage analysis in PD genetic studies, particularly in *PARKIN* gene, for a better understanding of PD etiology.

Acknowledgements

We thank the study participants. This work was supported by funds by Ministério da Saúde, Fundação de

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

K.C.V. Moura et al. / Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease

177

Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E-26/110.765/2010; E-26/102.860/2008), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303256/2009-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] N. Abbas, C.B. Lucking, S. Ricard, A. Durr, V. Bonifati, G. De Michele, S. Bouley, J.R. Vaughan, T. Gasser, R. Marconi, E. Broussolle, C. Brefel-Courbon, B.S. Harhangi, B.A. Oostra, E. Fabrizio, G.A. Bohme, L. Pradier, N.W. Wood, A. Filla, G. Meco, P. Deneffe, Y. Agid and A. Brice, A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, *Human Molecular Genetics* 8 (1999), 567–574.
- [2] S. Asakawa, N. Hattori, A. Shimizu, Y. Shimizu, S. Minoshima, Y. Mizuno and N. Shimizu, Analysis of eighteen deletion breakpoints in the parkin gene, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389 (2009), 181–186.
- [3] S. Bardiën, R. Keyser, Y. Yako, D. Lombard and J. Carr, Molecular analysis of the parkin gene in South African patients diagnosed with Parkinson's disease, *Parkinsonism & Related Disorders* 15 (2009), 116–121.
- [4] S.T. Camargos, L.O. Dornas, P. Momeni, A. Lees, J. Hardy, A. Singleton and F. Cardoso, 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, *Movement Disorders* 24 (2009), 662–666.
- [5] M. Campos, Jr., S.M. Churchman, C.B. Santos-Reboucas, F. Ponchel and M.M. Pimentel, High frequency of nonrecurrent MECP2 duplications among Brazilian males with mental retardation, *Journal of Molecular Neuroscience* 41 (2010), 105–109.
- [6] J.M. Choi, M.S. Woo, H.I. Ma, S.Y. Kang, Y.H. Sung, S.W. Yong, S.J. Chung, J.S. Kim, H.W. Shin, C.H. Lyoo, P.H. Lee, J.S. Baik, S.J. Kim, M.Y. Park, Y.H. Sohn, J.H. Kim, J.W. Kim, M.S. Lee, M.C. Lee, D.H. Kim and Y.J. Kim, Analysis of *PARK* genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease, *Neurogenetics* 9 (2008), 263–269.
- [7] M.C. de Rijk, L.J. Launer, K. Berger, M.M. Breteler, J.F. Dartigues, M. Baldereschi, L. Fratiglioni, A. Lobo, J. Martinez-Lage, C. Trenkwalder and A. Hofman, Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group, *Neurology* 54 (2000), S21–S23.
- [8] M.C. de Rijk, W.A. Rocca, D.W. Anderson, M.O. Melcon, M.M. Breteler and D.M. Maraganore, A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease, *Neurology* 48 (1997), 1277–1281.
- [9] A. Djarmati, K. Hedrich, M. Svetel, N. Schafer, V. Juric, S. Vukosavic, R. Hering, O. Riess, S. Romac, C. Klein and V. Kostic, Detection of *Parkin* (*PARK2*) and *DJ1* (*PARK7*) mutations in early-onset Parkinson disease: *Parkin* mutation frequency depends on ethnic origin of patients, *Human Mutation* 23 (2004), 525.
- [10] T. Foroud, S.K. Uniacke, L. Liu, N. Pankratz, A. Rudolph, C. Halter, C. Shults, K. Marder, P.M. Conneally and W.C. Nichols, Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease, *Neurology* 60 (2003), 796–801.
- [11] T. Gasser, Genetics of Parkinson's disease, *Current Opinion in Neurology* 18 (2005), 363–369.
- [12] J.F. Guo, X.W. Zhang, L.L. Nie, H.N. Zhang, B. Liao, J. Li, L. Wang, X.X. Yan and B.S. Tang, Mutation analysis of *Parkin*, *PINK1* and *DJ-1* genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism, *Journal of Neurology* 257 (2010), 1170–1175.
- [13] K. Hedrich, C. Eskelson, B. Wilmot, K. Marder, J. Harris, J. Garrels, H. Meija-Santana, P. Vieregge, H. Jacobs, S.B. Bressman, A.E. Lang, M. Kann, G. Abbruzzese, P. Martinelli, E. Schwinger, L.J. Ozelius, P.P. Pramstaller, C. Klein and P. Kramer, Distribution, type, and origin of *Parkin* mutations: review and case studies, *Movement Disorders* 19 (2004), 1146–1157.
- [14] A.J. Hughes, Y. Ben-Shlomo, S.E. Daniel and A.J. Lees, What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study, 1992, *Neurology* 57 (2001), S34–S38.
- [15] D.M. Kay, C.F. Stevens, T.H. Hamza, J.S. Montimurro, C.P. Zabetian, S.A. Factor, A. Samii, A. Griffith, J.W. Roberts, E.S. Molho, D.S. Higgins, S. Gancher, L. Moses, S. Zarepari, P. Poorkaj, T. Bird, J. Nutt, G.D. Schellenberg and H. Payami, A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in *PARK2*, *Neurology* 75 (2010), 1189–1194.
- [16] R.J. Keyser, D. Lombard, R. Veikondis, J. Carr and S. Bardiën, Analysis of exon dosage using MLPA in South African Parkinson's disease patients, *Neurogenetics* 11 (2010), 305–312.
- [17] T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature* 392 (1998), 605–608.
- [18] S.J. Lincoln, D.M. Maraganore, T.G. Lesnick, R. Bounds, M. de Andrade, J.H. Bower, J.A. Hardy and M.J. Farrer, *Parkin* variants in North American Parkinson's disease: cases and controls, *Movement Disorders* 18 (2003), 1306–1311.
- [19] C.B. Lucking, A. Durr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B.S. Harhangi, G. Meco, P. Deneffe, N.W. Wood, Y. Agid and A. Brice, Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene, *The New England Journal of Medicine* 342 (2000), 1560–1567.
- [20] R. Marongiu, F. Brancati, A. Antonini, T. Ialongo, C. Ceccarini, O. Scarciolla, A. Capalbo, R. Benti, G. Pezzoli, B. Dallapiccola, S. Goldwurm and E.M. Valente, Whole gene deletion and splicing mutations expand the *PINK1* genotypic spectrum, *Human Mutation* 28 (2007), 98.
- [21] K. Nuytemans, J. Theuns, M. Cruts and C. Van Broeckhoven, Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, and *LRRK2* genes: a mutation update, *Human Mutation* 31 (2010), 763–780.
- [22] N. Pankratz, D.K. Kissell, M.W. Pauculo, C.A. Halter, A. Rudolph, R.F. Pfeiffer, K.S. Marder, T. Foroud and W.C. Nichols, *Parkin* dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations, *Neurology* 73 (2009), 279–286.
- [23] M. Periquet, M. Latouche, E. Lohmann, N. Rawal, G. De Michele, S. Ricard, H. Teive, V. Fraix, M. Vidailhet, D.

APÊNDICE B - Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: Analysis of *SNCA*, *PARKIN*, *PINK1* and *DJ-1* genes

178

K.C.V. Moura et al. / Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease

- Nicholl, P. Barone, N.W. Wood, S. Raskin, J.F. Deleuze, Y. Agid, A. Durr and A. Brice, Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism, *Brain* **126** (2003), 1271–1278.
- [24] O.A. Ross, A.T. Braithwaite, L.M. Skipper, J. Kachergus, M.M. Hulihan, F.A. Middleton, K. Nishioka, J. Fuchs, T. Gasser, D.M. Maraganore, C.H. Adler, L. Larvor, M.C. Chartier-Harlin, C. Nilsson, J.W. Langston, K. Gwinn, N. Hattori and M.J. Farrer, Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism, *Annals of Neurology* **63** (2008), 743–750.
- [25] A.B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crowley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muenter, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy and K. Gwinn-Hardy, alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science* **302** (2003), 841.
- [26] M. Sun, J.C. Latourelle, G.F. Wooten, M.F. Lew, C. Klein, H.A. Shill, L.I. Golbe, M.H. Mark, B.A. Racette, J.S. Perlmutter, A. Parsian, M. Guttman, G. Nicholson, G. Xu, J.B. Wilk, M.H. Saint-Hilaire, A.L. DeStefano, R. Prakash, S. Williamson, O. Suchowersky, N. Labelle, J.H. Growdon, C. Singer, R.L. Watts, S. Goldwurm, G. Pezzoli, K.B. Baker, P.P. Pramstaller, D.J. Burn, P.F. Chinnery, S. Sherman, P. Vieregge, I. Litvan, T. Gillis, M.E. MacDonald, R.H. Myers and J.F. Gusella, Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study, *Archives of Neurology* **63** (2006), 826–832.
- [27] C. Wang, H. Ma, X. Feng, S. Xie and P. Chan, Parkin dosage mutations in patients with early-onset sporadic and familial Parkinson's disease in Chinese: an independent pathogenic role, *Brain Research* **1358** (2010), 30–38.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Elsevier Editorial System(tm) for Gene
Manuscript Draft

Manuscript Number: GENE-D-12-01523

Title: Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Article Type: Research Paper

Keywords: Parkinson's disease; *PARKIN*; *PINK1*; early-onset; sequence mutations

Corresponding Author: Dr. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Karla C Moura

Order of Authors: Karla C Moura; Mário Campos Junior; Ana Lúcia Zuma de Rosso; Denise H Nicaretta; João S Pereira; Delson J Silva; Flávia L dos Santos; Fabíola da Costa Rodrigues; Cíntia B Santos-Rebouças; Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Parkinson's disease is the second most frequent neurodegenerative disorder in the world, affecting 1-2% of individuals over the age of 65. The etiology of Parkinson's disease is complex, with the involvement of gene-environment interactions. Although it is considered a disease of late manifestation, early-onset forms of parkinsonism contribute to 5-10% of all cases. In the present study, we screened mutations in coding regions of *PARKIN* and *PINK1* genes in 136 unrelated Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. We identified six missense variants in *PARKIN* gene: one known pathogenic mutation, two variants of uncertain role and three non-pathogenic changes. No pathogenic mutation was identified in *PINK1* gene, only benign polymorphisms. All putative pathogenic variants found in this study were in heterozygous state. Our data show that *PARKIN* point mutations are more common in Brazilian early-onset Parkinson's disease patients (3%) than *PINK1* missense variants (0%), corroborating other studies worldwide.

Suggested Reviewers: Vincenzo Bonifati
Department of Clinical Genetics, Erasmus MC, P.O. Box 2040, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands.
v.bonifati@erasmusmc.nl
author's suggestion

Juan Segura-Aguilar
Programme of Molecular and Clinical Pharmacology, ICBM, Faculty of Medicine, Independencia 1027,
Casilla 70000, Santiago-7, Chile.
jsegura@med.uchile.cl
author's suggestion

Carlos Rieder
Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-003
Porto Alegre, RS, Brazil.
carlosrieder@terra.com.br

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Karla Cristina Vasconcelos Moura^a, Mário Campos Junior^a, Ana Lúcia Zuma de Rosso^b, Denise Hack Nicaretta^c, João Santos Pereira^d, Delson José Silva^{e,f}, Flávia Lima dos Santos^a, Fabíola da Costa Rodrigues^a, Cíntia Barros Santos-Rebouças^a, Márcia Mattos Gonçalves Pimentel^{a*}.

^a Departamento de Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^b Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^c Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^d Faculdade de Ciências Médicas, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^e Núcleo Neurociências, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brazil.

^f Instituto Integrado de Neurociências, Goiás, Brazil.

Short title: Genetic analysis in Parkinson's disease.

*Corresponding Author:

Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Departamento de Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524,
PHLC, sala 501F, Maracanã, 20550-013

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

e-mail: pimentel@uerj.br

telephone: +55 21 2334-0039

Line numbers: 374

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Abstract

Parkinson's disease is the second most frequent neurodegenerative disorder in the world, affecting 1-2% of individuals over the age of 65. The etiology of Parkinson's disease is complex, with the involvement of gene-environment interactions. Although it is considered a disease of late manifestation, early-onset forms of parkinsonism contribute to 5-10% of all cases. In the present study, we screened mutations in coding regions of *PARKIN* and *PINK1* genes in 136 unrelated Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. We identified six missense variants in *PARKIN* gene: one known pathogenic mutation, two variants of uncertain role and three non-pathogenic changes. No pathogenic mutation was identified in *PINK1* gene, only benign polymorphisms. All putative pathogenic variants found in this study were in heterozygous state. Our data show that *PARKIN* point mutations are more common in Brazilian early-onset Parkinson's disease patients (3%) than *PINK1* missense variants (0%), corroborating other studies worldwide.

Keywords: Parkinson's disease; *PARKIN*; *PINK1*; early-onset; sequence mutations.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder that affects different regions of the nervous system, although it is clinically recognized by typical motor manifestations [1]. Even though much of the etiology of PD remains unknown, early-onset PD (EOPD) (onset before 50 years old), which accounts for approximately 5%–10% of all PD cases, can be explained by monogenic causes [2].

Mutations in coding regions of *PARKIN* gene (*PARK2*) are often implicated as the most common cause of EOPD, followed by *PINK1* gene variants. These two genes are associated with the autosomal recessive forms of parkinsonism and may act in the same pathway controlling mitochondrial homeostasis [2,3,4].

PARKIN is an ubiquitin E3 ligase and, therefore, participates of the ubiquitin-mediated proteasomal degradation pathway [5], whose activity seems to be compromised by pathogenic mutations. Since the first description of *PARKIN* mutations in Japanese patients with juvenile EOPD [6], more than 170 different mutations have been described throughout its sequence, including large deletions or amplifications, small deletions/insertions as well as missense mutations. As a common molecular consequence, such mutations are known to cause loss of *PARKIN* function, leading to impaired mitochondrial integrity [7].

PINK1 (*PARK6*) encodes a mitochondrial serine/threonine kinase, which is expressed ubiquitously in the human brain. Recent evidence suggests that the physiological role of *PINK1* comprises the phosphorylation of mitochondrial proteins in response to cellular stress and the protection of mitochondria against various stressors [8,9]. Up to date, homozygous and

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

compound heterozygous loss of function mutations affecting the kinase domain of *PINK1* gene were observed, all of them reducing its enzymatic activity [10, 11]. The frequency of these mutations varies according to the geographic region from 0 to 15% all over the world [7, 12].

PARKIN and *PINK1* are thought to participate from the same pathway concerning controlling mitochondrial integrity and function, with *PINK1* functioning upstream from *PARKIN* [13, 14]. In the present study, we investigated the presence of *PARKIN* and *PINK1* sequence mutations in patients with EOPD from the Southeast and Midwest region of Brazil.

Patients Data

We analyzed 136 unrelated Brazilian patients (86 men and 50 women; mean age 49.8 ± 13.3 years; mean age at onset 39.5 ± 10.3 years) with idiopathic PD manifested before 51 years old and 200 healthy Brazilian controls. Amongst the patients included in this study, 30 cases had familial history of PD in relatives of 1st and 2nd degrees and 106 represented isolated cases of the disease. The Ethics Committee of State University of Rio de Janeiro approved this study and a written informed consent was obtained from all subjects.

Methods

The DNA of patients was obtained from peripheral blood. The presence of exon rearrangements in *PARKIN* and *PINK1* genes were formerly screened in 102 probands of our sample through the MLPA analysis [15]. The coding regions of *PARKIN* and *PINK1* genes were sequenced using primers previously described [16]. The sequencing reactions were prepared according to the

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

manufacturer, using the Big Dye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems). Control DNA samples were screened for p.P437L and p.A339V substitutions. All reactions were processed on an automated sequencer ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) and the sequence analysis was performed using the softwares Chromas Lite 2.0 (Technelysium) and BioEdit Sequence Alignment Editor Version 6.0.6 (Isis Pharmaceuticals, Inc.). Individuals who showed sequence variations had a new aliquot of DNA analyzed to confirm the alteration found. The prediction analysis of the effects of changes which cause amino acid substitutions in proteins was performed using electronic tools PolyPhen and Pmut.

Results

We identified twelve sequence variants in *PARKIN* gene: three silent variants and nine missense mutations (Table 1). Between the alterations found, four are non-pathogenic polymorphisms: c.500G>A (p.S167N), c.1138G>C (p.V380L), c.783A>G (p.L261L) and c.1180G>A (p.D394N). The already known c.245C>A (p.A82E) and c.719C>T (p.T240M) variants were found in one patient each, both in heterozygous state. We also identified the c.1310C>T (p.P437L) variant in two probands. The patient found with the c.434G>A (p.S145N) substitution also harbors the p.S167N polymorphism in *PARKIN* exon 4. Three changes found in this study have never been described: c.659A>G (p.K220R), c.1016C>T (p.A339V) and c.1021C>T (p.L341L) (Table 1). The new variant recognized in exon 9 of *PARKIN* gene, c.1021C>T, was identified in two patients and results in a silent mutation (p.L341L).

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Among the 200 healthy controls, the c.1310C>T (p.P437L) substitution in *PARKIN* gene was found just in one individual in heterozygous state. Besides this, we investigated the presence of c.1016C>T (p.A339V) in the same population and we did not identified this variant.

In *PINK1* gene we found only known benign polymorphisms, including the exon 5 variant c.1018G>A (p.A340T) in seven patients, the silent variant c.1173T>C (p.D391D) in one patient (exon 6), the exon 7 variant c.1426G>A (p.E476K) in two patients and exon 8 variant c.1562A>C (p.N521T) that was found in half of our patients (66/132) (Table 2).

The quantitative analysis, previously realized by our group, identified 4 patients with dosage mutations: one proband with exon 1 heterozygous deletion of *PINK1* gene, an index case with heterozygous deletion of *PARKIN* exon 4, one patient with heterozygous duplication of *PARKIN* exon 4 and a compound heterozygous patient that harbors two *PARKIN* mutations, a deletion of exons 5-6 and a duplication of exon 3 [15]. No pathogenic point mutation was detected in these patients with dosage changes.

Discussion

So far, *PARKIN* and *PINK1* are the genes most frequently associated with autosomal recessive EOPD and both coding products participate from the same metabolic pathway centered on maintenance of the morphological integrity of mitochondria. Studies of *PARKIN* and *PINK1* genes in Latin American populations are very scarce. In our study, we found twelve substitutions in *PARKIN* gene, from which nine non-pathogenic variants and

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

three putative pathogenic mutations. Among the heterozygous variants identified, three are silent mutations, including one that is novel (p.L341L).

The exon 3 c.245C>A (p.A82E) variant was identified in one proband and was previously described by other authors in PD patients and controls [17,18], suggesting that the p.A82E variant is probably non-pathogenic. Besides this, the *in silico* analysis through the PolyPhen and Pmut softwares showed that this alteration is benign. We also identified the c.719C>T (p.T240M) substitution in one patient. This change had already been described and it had been previously classified as a known pathogenic variant [18,19]. Our *in silico* analysis corroborated these data and considered that this alteration affects the *PARKIN* function, being probably pathogenic.

Another mutation, c.1310C>T (p.P437L) was found in two patients and one healthy subject. Other groups have reported this variant in a similar frequency between cases and controls in North American and European populations [18,20]. Although our *in silico* predictions have classified this variant as probably pathogenic, this mutation was present in a Brazilian control individual (59 years old), which leads us to believe that it is a non-pathogenic polymorphism. However, the evaluation of pathogenicity of this variant must be done with caution. We have identified this mutation in three asymptomatic daughters (35, 33 and 31 years old) and a granddaughter (12 years old) of a carrier patient. Functional analyses should help to clarify if the p.P437L substitution is a risk factor for PD.

The c.434G>A (p.S145N) variant was found in a patient that also harbors the polymorphism c.500G>A (p.S167N) in the same exon of *PARKIN* gene. The *in silico* analysis had contradictory results and this mutation has its

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

pathogenic nature unclear in the literature [7]. Although the pathogenicity is not yet confirmed, we believe that functional analyses are important to establish if the p.S145N variant is related with a high risk of developing PD.

Three changes identified in this study have never been described: c.659A>G (p.K220R), c.1016C>T (p.A339V) and c.1021C>T (p.L341L). The first one (p.K220R) was found in only one patient, in heterozygous state. All *in silico* evidence points this variant as non-deleterious for PARKIN protein. In addition, this mutation does not encode any part of the catalytic domain of the protein, which led us to classify it as non-pathogenic.

Two novel mutations were found in exon 9 of *PARKIN*: p.A339V in one patient with familial history of PD and p.L341L in two sporadic cases. We did not observe the p.A339V variant in 400 control chromosomes. Since other known missense mutation in the same amino acid residue does not cause phenotypic changes [21], we believe that this variant is probably non-pathogenic. The second new alteration found in *PARKIN* exon 9 (c.1021C>T) results in a silent mutation, p.L341L. This variant does not affect the recognition of donor and receptor sites of splicing and, because of its silent nature, this change is considered non-pathogenic.

No pathogenic mutation was identified in *PINK1* gene. We found the variant c.1426G>A (p.E476K) in two patients. As this substitution has already been found in some healthy control subjects by other studies [22,23], it was predicted to be benign by bioinformatic programs and is poorly conserved even within mammals [23], we suggest it is a non-pathogenic variant.

All putative pathogenic point mutations identified in this study in *PARKIN* gene were in heterozygous state (Table 1). Until now, the role of

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

homozygous and compound heterozygous variants were already established as a cause of autosomal recessively inherited EOPD, but the pathogenic significance of heterozygous mutations is still uncertain, particularly for missense substitutions in the context of recessive inheritance. Different mechanisms have been suggested to explain the effects of single heterozygous variants like loss-of-function mutations by lowering the biological activity of the encoded protein (haploinsufficiency), dominant-negative property or as gain-of-function dominant mutations [24]. So, increasing evidence indicates that heterozygous variants are non-causative mutations but rather genetic susceptibility factors which may contribute to the risk of developing PD [24].

Our findings showed that *PARKIN* point mutations are more frequent than *PINK1* pathogenic variants in our sample of Brazilian EOPD patients. The absence of pathogenic mutations in *PINK1* gene in our population is consistent with other studies [20,25,26], supporting the hypothesis that mutations in *PINK1* may not be a relevant cause of EOPD among Brazilian sporadic and familial patients. Our results of *PARKIN* gene are in agreement with studies worldwide that have found similar frequencies of *PARKIN* point mutations in different kinds of populations [18-20,25,27] (Table 3), although they differ from the frequency identified by other Brazilian groups (5.5% and 11.1%) [28,29]. One possible explanation for these different results would be the reduced sample sizes tested by them (72 and 45 patients, respectively) (Table 3).

In conclusion, we strengthen that the functional analyses of the missense variants found by us are still missing and would help us to clarify the real pathogenic value of these mutations in our population. Besides this,

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

whether heterozygous mutations in recessive genes act as susceptibility factors or as causal agents in the PD process remains to be determined.

Acknowledgements

We thank the study participants. This work was supported by funds by Ministério da Saúde, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E-26/110.765/2010; E-26/103.065/2011), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303256/2009-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. The authors declare that they have no conflict of interest.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

References

- [1] Hawkes CH. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: Does it exist and if so how long is it? *Mov Disord.* 2008; 23 (13): 1799-807.
- [2] Martin I, Dawson VL, Dawson TM. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011; 12: 301-25.
- [3] Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004; 279 (18): 18614-22.
- [4] Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 2004; 56 (3): 336-41.
- [5] Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 2000; 25 (3): 302-5.
- [6] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Nature.* 1998; 392 (6676): 605-8.
- [7] 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 (7): 763-80.
- [8] Rakovic A, Grünwald A, Seibler P, Ramirez A, Kock N, Orolicki S, Lohmann K, Klein C. Effect of endogenous mutant and wild-type PINK1 on Parkin in fibroblasts from Parkinson disease patients. *Hum Mol Genet.* 2010; 19 (16): 3124-37.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

- [9] Burbulla LF, Krüger R. Converging environmental and genetic pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2011; 306: 1-8.
- [10] Atsumi M, Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hattori N. A 62-year-old woman with early onset Parkinson's disease associated with the PINK1 gene deletion. *Rinsho Shinkeigaku.* 2006; 46 (3): 199-202.
- [11] Exner N, Treske B, Paquet D, Holmström K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, et al. Loss-of function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci.* 2007; 27 (45): 12413-8.
- [12] Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW. PINK1 function in health and disease. *EMBO Mol Med.* 2009; 1 (3): 152-65.
- [13] Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature.* 2006; 441 (7097): 1157-61.
- [14] Um JW, Stichel-Gunkel C, Lübbert H, Lee G, Chung KC. Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 40 (4): 421-32.
- [15] Moura KC, Junior MC, de Rosso AL, Nicaretta DH, Pereira JS, José Silva D, Santos-Rebouças CB, Pimentel MM. Exon dosage variations in Brazilian patients with Parkinson's disease: analysis of SNCA, PARKIN, PINK1 and DJ-1 genes. *Dis Markers.* 2012; 32 (3): 173-8.
- [16] Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW, Chung SJ, Kim JS, Shin HW, Lyoo CH, Lee PH, Baik JS, et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics.* 2008; 9 (4): 263-9.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

[17] Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Singleton AB, Scholz SW. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J Med Genet*. 2009; 46 (6): 375-81.

[18] Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW, Halter CA, Rudolph A, Pfeiffer RF, Marder KS, Foroud T, Nichols WC; Parkinson Study Group-PROGENI Investigators. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology*. 2009; 73 (4): 279-86.

[19] Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Comella CL, Colcher A, Siderowf AD, Jennings D, Nance MA, Bressman S, Scott WK, et al. Predictors of Parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol*. 2010; 67 (6): 731-8.

[20] Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, Brouwers N, Goossens D, Engelborghs S, Pals P, Pickut B, Van den Broeck M, Corsmit E, Cras P, De Deyn PP, et al. Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat*. 2009; 30 (7): 1054-61.

[21] Chen R, Gosavi NS, Langston JW, Chan P. Parkin mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population. *Parkinsonism Relat Disord*. 2003; 9 (5): 309-12.

[22] Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ, Yang YX, Gandhi S, Healy DG, Harvey K, Harvey RJ, Deas E, Bhatia K, Quinn N, Lees A, et al. A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol*. 2006; 60 (4): 414-9.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

- [23] Marongiu R, Ferraris A, Ialongo T, Michiorri S, Soleti F, Ferrari F, Elia AE, Ghezzi D, Albanese A, Altavista MC, Antonini A, Barone P, et al. *PINK1* heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 2008; 29 (4): 565.
- [24] Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007; 6 (7): 652-62.
- [25] Zhang BR, Hu ZX, Yin XZ, Cai M, Zhao GH, Liu ZR, Luo W. Mutation analysis of parkin and *PINK1* genes in early-onset Parkinson's disease in China. *Neurosci Lett.* 2010; 477 (1): 19-22.
- [26] Godeiro-Junior C, de Carvalho-Aguiar PM, Felício AC, Barsottini OG, Silva SM, Borges V, Andrade LA, Ferraz HB. *PINK1* mutations in a Brazilian cohort of early-onset Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 2009; 24 (11): 1693-6.
- [27] Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schäfer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schüle B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S, Wiegers K, et al. *PINK1*, *Parkin*, and *DJ-1* mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13 (9): 1086-93.
- [28] Aguiar Pde C, Lessa PS, Godeiro C Jr, Barsottini O, Felício AC, Borges V, Silva SM, Saba RA, Ferraz HB, Moreira-Filho CA, Andrade LA. Genetic and environmental findings in early-onset Parkinson's disease Brazilian patients. *Mov Disord.* 2008; 23 (9): 1228-33.
- [29] Camargos ST, Dornas LO, Momeni P, Lees A, Hardy J, Singleton A, Cardoso F. Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: phenotypic characterization and frequency

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations. Mov Disord. 2009; 24 (5): 662-6.

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

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

Nucleotide Change	Protein Change	Position	Domain	Homozygous N ^a	Heterozygous N ^b	Frequency N ^c (%)	Pathogenicity
c.111G>A	p.F37P	Exon 2	UBL	-	2	2 (1.5)	Silent mutation
c.245C>A	p.A82E	Exon 3	-	-	1	1 (0.7)	Probably non-pathogenic
c.434G>A	p.S145N	Exon 4	-	-	1	1 (0.7)	Probably pathogenic
c.500G>A	p.S167N	Exon 4	-	-	17	17 (12.9)	Polymorphism
c.659A>G	p.K220R	Exon 6	-	-	1	1 (0.7)	Novel, probably non-pathogenic
c.719C>T	p.T240M	Exon 6	RING1	-	1	1 (0.7)	Pathogenic
c.783A>G	p.L261L	Exon 7	RING1	-	14	14 (10.6)	Silent mutation, polymorphism
c.1016C>T	p.A339V	Exon 9	IBR	-	1	1 (0.7)	Novel, probably non-pathogenic
c.1021C>T	p.L341L	Exon 9	IBR	-	2	2 (1.5)	Novel, silent mutation
c.1138G>C	p.V380L	Exon 10	-	4	29	33 (25)	Polymorphism
c.1180G>A	p.D394N	Exon 11	-	-	9	9 (6.8)	Polymorphism
c.1310C>T	p.P437L	Exon 12	RING2	-	2	2 (1.5)	Probably pathogenic

^a Number of homozygous carriers identified in PD cases

^b Number of heterozygous carriers identified in PD cases

^c Frequency represents number of variants identified in PD cases

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Table 2: Summary of *PINK1* gene exonic variations detected in this study

Nucleotide Change	Protein Change	Position	Domain	Homozygous N ^a	Heterozygous N ^b	Frequency N ^c (%)	Pathogenicity
c.1018G>A	p.A340T	Exon 5	Kinase	-	7	7 (5.3)	Polymorphism
c.1173T>C	p.D391D	Exon 6	Kinase	-	1	1 (0.7)	Silent mutation
c.1426G>A	p.E476K	Exon 7	Kinase	-	2	2 (1.5)	Probably non-pathogenic
c.1562A>C	p.N521T	Exon 8	C-term	8	58	66 (50)	Polymorphism

^a Number of homozygous carriers identified in PD cases

^b Number of heterozygous carriers identified in PD cases

^c Frequency represents number of variants identified in PD cases

APÊNDICE C - Genetic analysis of *PARKIN* and *PINK1* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease

Table(s)

Table 3: Frequency of point mutations in *PARKIN* gene in different populations

Population [References]	Sample N ^a	Clinical phenotype	Frequency (%)
Brazilians [our study]	136	EOPD	3
Brazilians [28]	72	EOPD	5.5
Brazilians [29]	45	EOPD	11.1
North Americans [18]	420	familial PD	3.1
Belgians [20]	310	PD	3.5
Hispanics and non-hispanics [19]	956	EOPD	3.2
Chinesees [25]	66	EOPD	3
Italians [27]	65	EOPD	3

^a Number of individuals analysed

ANEXO A – Termo de consentimento dos pacientes



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

TERMO DE CONSENTIMENTO

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*, *GIGYF2*, *MAPT* e *SAT1* 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 PACIENTE: _____ DN: _____

REGISTRO: _____ PROCEDÊNCIA: _____

Você está sendo convidado a participar 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*, *GIGYF2*, *MAPT* e *SAT1* 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. 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 três 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 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 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 – PHLC - sala 501F
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 / 23340499 - 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 – Carta do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Sr2

Comissão de Ética em Pesquisa – COEP

Rua São Francisco Xavier, 524, bloco E, 3º andar, sala 3018 - Maracanã

CEP 20550-900 – Rio de Janeiro, RJ.

E - mail: etica@uerj.br - Telefone: (21) 2569-3490

PARECER COEP 004/2009

A Comissão de Ética em Pesquisa – COEP, em sua 11ª Reunião Ordinária em 11 de dezembro de 2008, analisou o protocolo de pesquisa nº. 032.2.2008, segundo as normas éticas vigentes no país para pesquisa envolvendo sujeitos humanos e emite seu parecer.

Projeto de pesquisa: “Fatores Genéticos de risco para a Doença de Parkinson dos genes SNCA, PARKIN, UCH-L 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2 e GIGYF2 em pacientes brasileiros.”

Pesquisador Responsável: Profa Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Instituição Responsável: IBRAG/UERJ

Área do Conhecimento: 2.00- Ciências Biológicas – 2.02- Genética

Palavras-chave: Doença de Parkinson, fatores genéticos, disfunção mitocondrial, sistema ubiquitina-proteossomo.

Sumário: Nos dias de hoje, o envelhecimento populacional é um dos maiores desafios para a saúde pública e em decorrência deste fato, a incidência de doenças neurodegenerativas tem aumentado significativamente. Esta pesquisa pretende estudar os genes SNCA, PARKIN, UCH-L 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2 e GIGYF2 em pacientes brasileiros com DP, de forma a avaliar se estes fatores genéticos desempenham um papel relevante na etiologia desta doença em nossa população, bem como identificar seus mecanismos de atuação, aumentando o conhecimento nesta área.

Objetivo: Estudar os genes SNCA, PARKIN, UCL-H 1, PINK1, DJ-1, LRRK2, GBA, ATP13A2, HTRA2, e GIGYF2 em brasileiros com Doença de Parkinson (DP), de forma a avaliar se estes fatores genéticos desempenham um papel relevante na etiologia desta doença na população, bem como, identificar seus mecanismos de atuação. Espera-se que os dados gerados por este projeto trarão contribuição relevante para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta neuropatologia.

Considerações Finais: A COEP considerou o projeto bem fundamentado, apresentado de forma clara e organizada. O currículo da pesquisadora responsável demonstra que a mesma possui competência comprovada no tema da pesquisa. A metodologia utilizada está adequada aos objetivos propostos.

Após o atendimento à solicitação do Parecer COEP nº063/2008, a Comissão deliberou pela aprovação do projeto.

Faz-se necessário apresentar Relatório Anual - previsto para março de 2010, para cumprir o disposto no item VII.13.d da RES. 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: Projeto Aprovado

Rio de Janeiro, 05 de março de 2009.


Prof. Dr. Olinto Pegoraro

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa - UERJ

Olinto Pegoraro
Coordenador
Comissão de Ética em Pesquisas - UE