



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

Beatriz de Carvalho Guimarães


Rastreamento de mutações no gene *GBA* como fator de risco ao desenvolvimento da doença de Parkinson na população brasileira

Rio de Janeiro

2012

Beatriz de Carvalho Guimarães

**Rastreamento de mutações no gene *GBA* como fator de risco ao desenvolvimento da
doença de Parkinson na população brasileira**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, 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

2012

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

G963 Guimaráes, Beatriz de Carvalho.
Rastreamento de mutações no gene *GBA* como fator de risco ao desenvolvimento da doença de Parkinson na população brasileira / Beatriz de Carvalho Guimaráes. – 2012.
108 f.

Orientadora: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel.
Coorientadora: Cíntia Barros Santos-Rebouças.
Dissertação (Mestrado) – 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. Glucosilceramidase. 3. Mutação – Teses. I. Pimentel, Marica 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 dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Beatriz de Carvalho Guimarães

**Rastreamento de mutações no gene *GBA* como fator de risco ao desenvolvimento da
doença de Parkinson na população brasileira**

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

Aprovada em 09 de fevereiro de 2012.

Orientadora:

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

Coorientadora:

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

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Gisele Lobo Hajdu
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Enrique Medina Acosta
Centro de Biociências e Biotecnologia - UENF

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro
2012

AGRADECIMENTOS

À Deus, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, me ajudando a erguer a cabeça e nunca desistir.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida e luta, pelos valores que me ensinaram, por todo apoio moral e financeiro, por acreditarem no meu potencial e pelo amor incondicional. E um agradecimento em especial à minha mãe que é meu alicerce, minha pedra fundamental.

À minha “mãedrintia” Helena, pelas lições de vida, suporte emocional, carinho e dedicação.

À Prof^a. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este projeto, pela paciência, pelo apoio e orientação ao longo destes quatro anos de convívio.

À Prof^a. Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças, pela orientação e confiança durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Mário, primeiramente pela imensa paciência principalmente durante o primeiro semestre de 2011 e por ser um amigo sempre disposto a ouvir e ajudar. Pelos excelentes conselhos e ensinamentos, e por ser uma companhia fiel de laboratório nos momentos mais tensos desse mestrado.

Aos meus presentes do SERVGEM, amigas queridas, Adriana, Andressa, Juliana e Natalia por todo apoio emocional e profissional, e por tornarem meus dias mais agradáveis e especiais.

Ao Jean, pelo amor, dedicação, confiança, paciência, compreensão e por ter o poder de me acalmar nas piores “tempestades emocionais” tornando minha vida mais feliz e serena.

Aos queridos amigos, presentes da UERJ, Bruna, Juliana, Nathy Ramos, Madu, Jorge e Carol, por todo apoio, força, torcida, pela companhia e por proporcionarem os melhores momentos de descontração durante os últimos anos.

À Cláudia, por todos os ensinamentos na bancada, pela paciência e pela ajuda indispensáveis para meu crescimento dentro do laboratório.

Ao Fábio, Richard, Cris e Karen que mesmo não fazendo mais parte do grupo, foram importantes no desenvolvimento deste projeto e passaram pela minha vida trazendo, principalmente, alegrias.

À Jussara, à Juciara e à Flávia, por todo apoio técnico nesses anos de convivência, além das risadas e da companhia durante os momentos do “cafézinho”.

Às queridas amigas mineiras, Marcelle, Mayara, Samila, Paulinha, Fabrícia, Luciana, Gisele, Ádna que mesmo tão longe sempre torceram por mim, me apoiaram, me deram força e compreenderam a minha ausência.

Às ICs Gabriela, Karine e Thainá, pelo agradável convívio diário.

À Karla, Fabíola e Ana Carolina, que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Aos médicos Dr. João Santos Pereira, Dr^a. Ana Lúcia Zuma de Rosso, Dr^a. Denise Hack Nicaretta e Dr. Delson, pela importante colaboração.

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

Ao CNPq, a FAPERJ e a CEPUERJ, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste projeto, muito obrigada!

RESUMO

GUIMARÃES, Beatriz de Carvalho. *Rastreamento de mutações no gene GBA como fator de risco ao desenvolvimento da doença de Parkinson na população brasileira*. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, depois da doença de Alzheimer, com uma incidência de aproximadamente 3,3% na população brasileira acima dos 60 anos. Ela é caracterizada por uma perda dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra e pela presença de inclusões protéicas intracelulares denominadas corpúsculos de Lewy nos neurônios sobreviventes. A DP tem uma etiologia complexa que envolve interações genes-ambiente e múltiplos genes de susceptibilidade. Nesse contexto, mutações de perda de função no gene da glicocerebrosidase (*GBA*) têm sido bem validadas como importantes fatores de risco para a DP. Esse gene está localizado na região 1q21 e compreende 11 exons que codificam a enzima lisossômica glicocerebrosidase. O principal objetivo deste estudo foi investigar se alterações no gene *GBA* constituem um fator de predisposição para o desenvolvimento da DP na população brasileira. Para isso, um grupo de 126 pacientes brasileiros, não-aparentados, com DP (24 casos familiares e 102 isolados; idade média $66,4 \pm 11,4$) foram analisados para mutações no *GBA* através do seqüenciamento completo de todos os exons e alguns íntrons. Sete alterações e um alelo recombinante, anteriormente encontrados em pacientes com a DP analisados em outros estudos, foram detectados (K(-)27R, IVS2+1G>A, N370S, L444P, T369M, A456P, E326K e RecNciI), assim como, uma variante nunca antes identificada associada à DP (G325G) e uma nova mutação (W378C), num total de 18 pacientes (14,3%). Além disso, foram encontradas três alterações intrônicas (c.454+47G>A, c.589-86A>G e c.1225-34C>A), que constam do banco de SNPs, entretanto, não foram associadas a nenhuma doença. Dentre todas as variantes identificadas, três são comprovadamente patogênicas (IVS2+1G>A, L444P e N370S) e foram encontradas em 5,5% da amostra, não sendo detectadas na amostra controle, indicando uma frequência significativamente alta dessas mutações em pacientes com DP quando comparadas aos controles ($P=0,0033$). Esses resultados reforçam a associação entre o gene *GBA* e a DP na população brasileira, além de apoiar a hipótese de que alterações nesse gene representam um importante fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Gene *GBA*. Fator de risco. Glicocerebrosidase.

ABSTRACT

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder, after Alzheimer's disease, with an incidence of 3.3% in Brazilian population over the age of 60 years. It's characterized by the degeneration of dopaminergic neurons within the substantia nigra *pars compacta* and the presence of intracellular protein inclusions called Lewy bodies in the surviving neurons. PD has a complex etiology which may involve gene-environment interactions and multiple susceptibility genes. In this context, loss-of-function mutations in the glucocerebrosidase gene (*GBA*) have been well-validated as important susceptibility factors for PD. This gene is located on 1q21 and comprises 11 exons that encode the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. The main objective of our study was to investigate if alterations in the *GBA* gene constitute a predisposing factor for the development of PD in the Brazilian population. For this, a Brazilian cohort of 126 unrelated PD patients (24 familial and 102 sporadic cases; mean age: 66.4 ± 11.4) were screened for *GBA* mutations by complete sequencing of the gene's exons and some introns. Seven alterations and one recombinant allele, previously found in PD patients performed in other studies, were detected (K(-)27R, IVS2+1G>A, N370S, L444P, T369M, A456P, E326K e Rec*Nci*I), as well as, a variant never identified in PD patients (G325G) and one newly identified variant (W378C), in a total of 18 patients (14.3%). In addition, were found three intronic changes (c.454 +47 G>A, c.589-86A>G and c.1225-34C>A), which are present in the database of SNPs, however, were not associated with any disease. Among all the variants identified, three are proven pathogenic (IVS2 +1 G>A, N370S and L444P) and were found in 5.5% of the sample and not detected in the control sample, indicating a significantly higher frequency of these mutations in patients with PD compared to controls ($P = 0.0033$). Our results, have strengthened the association between the *GBA* gene and PD in the Brazilian population, in addition to support the hypothesis that alterations in this gene represent a significant genetic susceptibility factor for the development of PD.

Keywords: Parkinson's disease. *GBA* gene. Risk factor. Glucocerebrosidase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1-	Proporção de idosos (em porcentagem) de 60 e 65 anos ou mais de idade no Brasil de 1999 a 2009.	18
Figura 1 -	Distribuição das alterações gênicas associadas à DP de acordo com o efeito e a frequência alélica	22
Figura 2 -	Vias comuns ligadas à patogênese da DP. Mutações em determinados genes comprometem vias importantes da sobrevivência celular e da função neuronal	24
Figura 3 -	Esquema do gene <i>GBA</i> , mostrando sua localização cromossômica, e da proteína glicocerebrosidase.	28
Figura 4 -	Substratos e produtos da enzima glicocerebrosidase.	29
Figura 5 -	Comparação entre o gene funcional <i>GBA</i> e o pseudogene <i>GBAP</i> de humanos	30
Figura 6-	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 2, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.38A>G (K(-)27R) (B)	55
Figura 7 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do íntron 2, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.115+1G>A (IVS2+1G>A)(B)	55
Figura 8 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do íntron 4, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A), a alteração c.454+47G>A em heterozigose (B) e a alteração c.454+47G>A em homozigose (C)	56
Figura 9 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do íntron 5, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A), a alteração c.589-86A>G em heterozigose (B) e a alteração c.589-86A>G em homozigose (C)	56
Figura 10 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1223C>T (T369M) (B)	57
Figura 11 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração	

	c.1092G>A (G325G) (B)	57
Figura 12 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1093G>A (E326K) (B)	58
Figura 13 -	Heredograma da família do paciente PAR1648.	58
Figura 14 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do íntron 8, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A), a alteração c.1225-34C>A em heterozigose (B) e a alteração c.1225-34C>A em homozigose (C)	59
Figura 15 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1226A>G (N370S) (B)	59
Figura 16 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1251G>C (W378C) (B)	60
Figura 17 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1448T>C (L444P) (B)	60
Figura 18 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e as alterações c.1448T>C (L444P), c.1483G>C (A456P) e c.1497G>C (V460V) - <i>RecNciI</i> (B)	61
Figura 19 -	Heredograma da família do paciente PAR1156.	61
Figura 20 -	Eletoferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a sequência selvagem do gene <i>GBA</i> (A) e a alteração c.1483G>C (A456P) (B)	62
Figura 21 -	Representação do gene <i>GBA</i> e as alterações identificadas em nosso estudo.	65
Gráfico 2 -	Distribuição dos pacientes analisados no presente estudo segundo a idade de manifestação da DP.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e loci descritos envolvidos na doença de Parkinson familiar.....	21
Tabela 2 - Classificação da DG em seus três tipos.	34
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de todos os éxons do gene <i>GBA</i>	46
Tabela 4 - Condições utilizadas na PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes aos éxons 1-4, 5-7 e 8-11.	47
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento de todos os éxons do gene <i>GBA</i>	49
Tabela 6 - Dados sobre a amostra de pacientes com DP idiopática estudada.	53
Tabela 7 - Variantes de sequências encontradas no gene <i>GBA</i> , com as respectivas localizações e frequências.	54
Tabela 8 - Resultados das análises in silico das alterações exônicas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
aa	aminoácido
Ala/A	alanina
AD	autossômica dominante
AR	autossômica recessiva
Asn/N	Asparagina
<i>ATP13A2</i>	gene <i>ATPase type 13A2</i>
<i>BST1</i>	gene <i>Bone marrow stromal cell antigen 1</i>
C	citossina
°C	grau Celsius
C-terminal	carboxiterminal
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Cys/C	cisteína
del	deleção
DG	doença de Gaucher
<i>DJ-1</i>	<i>oncogene DJ-1</i>
DLB	demência com corpúsculos de Lewy
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos tri fosfatos
DP	Doença de Parkinson
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
<i>EIF4G1</i>	gene <i>Eukaryotic translation initiation factor 4 Gamma 1</i>
<i>FBX07</i>	gene <i>F-box protein 7</i>
G	guanina
<i>GAK</i>	gene <i>Cyclin G-associated Kinase</i>
<i>GBA</i>	gene da glicocerebrosidase

<i>GBAP</i>	pseudogene da glicocerebrosidase
<i>GIGYF2</i>	gene <i>GRB10-interacting GYF protein 2</i>
Gli	glicina
Glu/E	ácido glutâmico
Gly/G	glicina
GWAS	Genome-wide association studies
<i>HLA-DR</i>	gene <i>Major histocompatibility complex, classe II DR</i>
<i>HTRA2</i>	gene <i>HTRA serine peptidase 2</i>
IC	intervalo de confiança
IM	idade de manifestação
kb	quilobase
kDa	quilodalton
Leu/L	leucina
<i>LRRK2</i>	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
Lys/K	lisina
M	molar
<i>MAPT</i>	gene <i>Microtubule-associated Protein Tau</i>
Met/M	metionina
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
N.	Normal
<i>NciI</i>	enzima de restrição <i>Neisseria cinerea</i>
N-terminal	amino-terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
OR	<i>odds ratio</i>
p	braço curto de um cromossomo

P	probabilidade
pb	par de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
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>
Pro/P	prolina
q	braço longo de um cromossomo
Rec	alelo recombinante
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
seg	segundos
Ser/S	serina
SERVGEN	Serviço de Genética Humana da UERJ
<i>SNCA</i>	<i>α-Synuclein</i>
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
T	timina
TBE	tampão tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N' tetrametiletlenodiamina
Tris	trihidroximetil aminometano
Trp/W	triptofano
U	unidade
<i>UCHL1</i>	<i>ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

V	volt
ng	nanograma
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
pmol	picomol

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	42
2	METODOLOGIA	43
2.1	Pacientes e controles	43
2.2	Extração do DNA genômico	44
2.3	Estimativa da concentração e da integridade do DNA	45
2.4	Rastreamento de mutações no gene <i>GBA</i>	46
2.4.1	<u>Reação em cadeia da polimerase</u>	46
2.4.2	<u>Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação de PCR</u>	48
2.4.3	<u>Sequenciamento automático</u>	48
2.4.4	<u>Purificação dos produtos de PCR</u>	48
2.4.5	<u>Reação de sequenciamento</u>	49
2.4.6	<u>Análise do sequenciamento</u>	50
2.5	Ferramentas eletrônicas	51
2.6	Análise estatística	52
3	RESULTADOS	53
3.1	Alterações identificadas	53
3.2	Características das variantes encontradas	55
3.2.1	<u>Variantes identificadas no exon 2 e íntron 2</u>	55
3.2.2	<u>Variantes identificadas no íntron 4</u>	56
3.2.3	<u>Variantes identificadas no íntron 5</u>	56
3.2.4	<u>Variantes identificadas no exon 8 e íntron 8</u>	57
3.2.5	<u>Variantes identificadas no exon 9</u>	59
3.2.6	<u>Variantes identificadas no exon 10</u>	60
3.3	Resultados das análises <i>in silico</i>	62
3.4	Análise da amostra controle	63
3.5	Análise estatística	64
4	DISCUSSÃO	65
4.1	Estudos do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP na população brasileira	66
4.2	Alterações identificadas no gene <i>GBA</i>	68

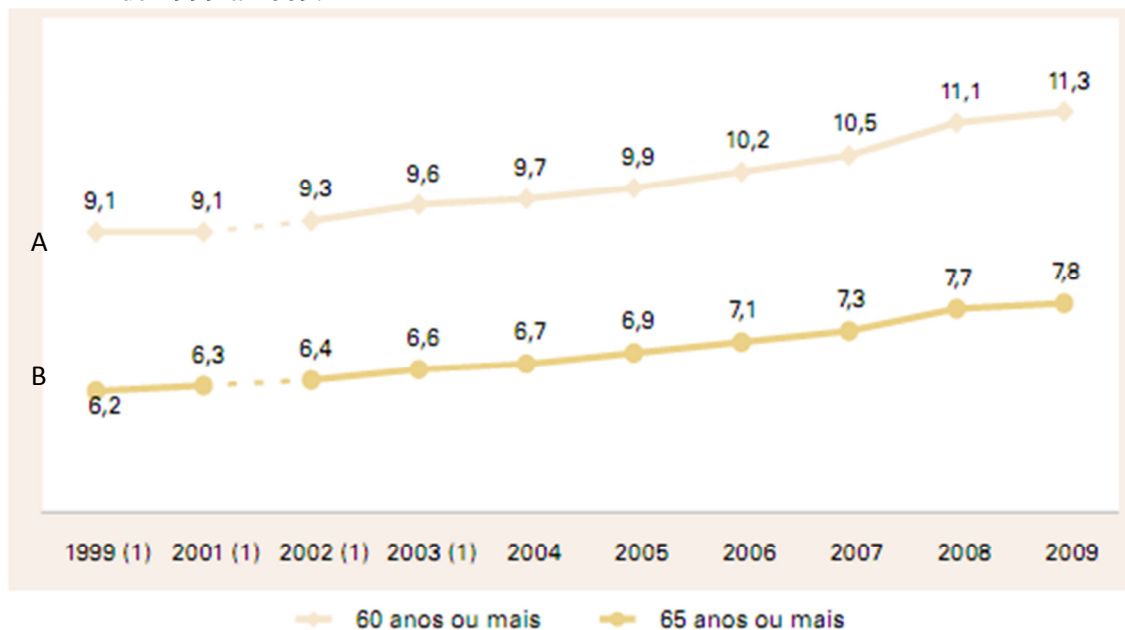
4.2.1	<u>Variantes de sentido trocado identificadas nos exons 2, 8, 9 e 10</u>	68
4.2.2	<u>Variantes intrônicas identificadas nos íntrons 2, 4, 5 e 8</u>	72
4.2.3	<u>Variantes silenciosas identificadas nos exons 8 e 10</u>	72
4.3	Idades de manifestação e história familiar da DP	74
5	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A - Características dos pacientes analisados: idade, idade de manifestação, caso familiar ou isolado e sexo	90
	APÊNDICE B - Resultados da análise molecular dos exons do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP	92
	APÊNDICE C - Resultados da análise molecular dos íntrons analisados do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP	96
	APÊNDICE D - Resultados da análise molecular do gene <i>GBA</i> em indivíduos saudáveis (amostra controle)	100
	APÊNDICE E – Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson´s disease in Brazilian patients	104
	ANEXO A - Termo de consentimento para pacientes com DP	106
	ANEXO B - Termo de consentimento para controles sem DP	107
	ANEXO C - Carta do Comitê de Ética em pesquisa da UERJ com a aprovação do projeto	108

INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson

Descrita pela primeira vez em 1817 pelo físico britânico James Parkinson, a doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) é a segunda desordem neurodegenerativa mais frequente, depois da Doença de Alzheimer (De Lau *et al.*, 2006), com aproximadamente seis milhões de pessoas afetadas no mundo (Lesage & Brice, 2009). Devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial, espera-se que a prevalência da DP aumente consideravelmente (Lin *et al.*, 2009). No Brasil, a proporção de idosos (pessoas com 60 anos ou mais) aumentou de 9,1% para 11,3%, entre os anos de 1999 e 2009, somando um contingente atual de cerca de 21 milhões (**Gráfico 1**) (IBGE: 2010).

Gráfico 1 - Proporção de idosos (em percentagem) de 60 e 65 anos ou mais de idade no Brasil de 1999 a 2009.



A) Peso relativo dos idosos (60 anos ou mais de idade) no conjunto da população passou de 9,1% para 11,3%. B) Evolução do peso relativo das pessoas 65 anos ou mais de idade, faixa etária considerada para fins de estudos demográficos e, também, como limite da condição de velhice nos países mais desenvolvidos. (Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 1999/2009.)

A prevalência da DP é associada à idade e aumenta de aproximadamente 1% da população aos 65 anos para cerca de 5% aos 85 anos (Fahn, 2003). Um estudo epidemiológico

realizado por Barbosa e colaboradores (2006) mostrou que a prevalência da DP no Brasil é de aproximadamente 3,3% em indivíduos com 60 anos ou mais (Barbosa *et al.*, 2006). Esta condição acomete todos os grupos étnicos e ambos os sexos, porém alguns estudos indicam que os homens são cerca 1,5 vezes mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença do que as mulheres e 4% dos pacientes desenvolvem a DP antes dos 50 anos (Belin & Westerlund, 2008).

A DP é uma doença crônica e progressiva do sistema nervoso central, cujas principais características patológicas incluem a despigmentação da parte compacta da substância negra do mesencéfalo devido à perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos e a presença de inclusões proteicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes (Forno, 1996). Acredita-se que os corpos de Lewy são formados como resposta citoprotetora aos níveis excessivos de proteínas anormais potencialmente tóxicas nos neurônios (Andrade *et al.*, 2010). A perda de neurônios e a presença de inclusões proteicas também são observadas em outras regiões do sistema nervoso central e periférico, incluindo o bulbo olfatório, o núcleo da medula oblonga, a ponte, o *locus* cerúleo, a amígdala, o núcleo basal de Meynert, e nos estágios avançados da doença, o estriato e o córtex cerebral (Para revisão: (Shulman *et al.*, 2011).

Neurônios dopaminérgicos se projetam principalmente para o estriato, por isso, a presença de corpúsculos de Lewy associada à perda de células da substância negra resultam na depleção de dopamina estriatal, levando a um aumento da rede inibitória do globo pálido até o tálamo e, indiretamente, ao córtex motor, reprimindo a iniciação dos movimentos resultando nas manifestações clínicas da DP (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009). Dentre estas, destacam-se quatro sintomas motores principais: (i) tremor de repouso, (ii) bradicinesia (lentidão na iniciação e execução dos movimentos), (iii) rigidez e (iv) instabilidade postural, os quais podem ser controlados com a administração de um precursor exógeno da dopamina, o levodopa (L -3,4-dihidroxifenilalanina). Entretanto, esta substância é ineficaz no tratamento de sintomas não motores, que também podem ser observados em pacientes com DP e, muitas vezes, precedem os sintomas motores. Os dados prospectivos relacionados aos sintomas não motores são ainda raros, mas apontam que constipação, hiposmia (disfunção olfativa) e distúrbio do sono REM podem preceder as manifestações motoras da DP. A perda da sensibilidade olfativa, por exemplo, ocorre em 70 a 90% dos pacientes com DP (Andrade *et al.*, 2010). Dentre outros sintomas não motores, destacam-se depressão, ansiedade, distúrbios do humor, incontinência urinária, déficit cognitivo e perda de peso (Alves *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010; Dauer & Ho, 2010; Shulman *et al.*, 2011). Contudo, um diagnóstico

definitivo da doença requer a confirmação pós-morte de análises histopatológicas de tecido cerebral (Alves *et al.*, 2008), pois a presença de inclusões é um critério utilizado para diferenciar a DP de outras desordens associadas ao parkinsonismo (Forno, 1996).

Atualmente não há cura para a doença e as vias moleculares envolvidas nesta patologia ainda são obscuras. Durante muitos anos, a DP foi vista como uma doença não genética, sendo inúmeros fatores ambientais apontados como causa desta doença, tais como, a utilização de drogas sintéticas, doenças infecciosas, exposição a substâncias tóxicas, exposição a determinados herbicidas e pesticidas, vida rural, consumo de água de poço e traumas na cabeça (Hardy, 2006). Porém, na última década, a DP tem deixado de ser considerada uma doença não hereditária e essencialmente esporádica, para ser considerada uma desordem complexa com um forte componente genético bem estabelecido num subgrupo considerável de pacientes (Shulman *et al.*, 2011).

Os estudos de ligação em famílias com um claro padrão Mendeliano de herança da doença identificaram 15 *loci* associados à DP e neles mapeiam 11 genes associados a formas monogênicas da doença (Tabela 1), incluindo os genes *SNCA*, (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 2003), *PRKN* (Matsumine *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998), *DJ-1* (Bonifati *et al.*, 2003), *PINK1* (Valente *et al.*, 2004), *LRRK2* (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004), *HTRA2* (Strauss *et al.*, 2005), *UCHL1* (Leroy *et al.*, 1998), *ATP13A2* (Ramirez *et al.*, 2006; Di Fonzo *et al.*, 2007), *GIGYF2* (Pankratz *et al.*, 2002; Pankratz *et al.*, 2003a; Pankratz *et al.*, 2003b; Lautier *et al.*, 2008), e mais recentemente, *PLA2G6* (Paisan-Ruiz *et al.*, 2009) e *FBXO7* (Ho *et al.*, 2008; Shojaae *et al.*, 2008), foram identificados em famílias com formas atípicas da DP (Lesage & Brice, 2009). Mutações em seis desses genes (*SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *DJ-1*, *PINK1* e *ATP13A2*) tem sido descritas como causas familiares da DP (Lesage & Brice, 2009). Além disso, recentes estudos de associação genômica (GWAS) identificaram polimorfismos comuns nos genes *SNCA* e *LRRK2* e variantes em dois outros genes que não mapeiam no *locus* PARK, *MAPT* e *GBA* que, são atualmente, considerados fatores de risco bem estabelecidos para DP (Bekris *et al.*, 2010)(Figura 1).

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

<i>Locus</i>	<i>Gene*</i>	<i>Proteína</i>	<i>Modo de herança**</i>	<i>Idade de Manifestação da DP</i>	<i>OMIM®***</i>
PARK1 (=PARK4) (4q21)	<i>SNCA</i>	α -sinucleína	AD e fator de risco	38-65 anos 24-48 anos	163890
PARK2 (6q25.2-q27)	<i>PRKN</i>	Parkin	AR	~30 anos (16-72 anos)	602544
PARK3 (2p13)	-	-	AD	~60 anos	602404
PARK5 (4p14)	<i>UCHL1</i>	UCHL1	AD	30-50 anos 55-58 anos	191342
PARK6 (1p35-p36)	<i>PINK1</i>	PINK1	AR	20-40 anos	605909
PARK7 (1p36)	<i>DJ-1</i>	DJ-1	AR	20-40 anos	606324
PARK8 (12q12)	<i>LRRK2</i>	LRRK2/ Dardarina	AD e fator de risco	50-70 anos	607007
PARK9 (1p36)	<i>ATP13A2</i>	ATP13A2	AR	20-40 anos	606693
PARK10 (1p32)	-	-	-	50-60 anos-	606852
PARK11 (2q36-q37)	<i>GIGYF2</i>	GIGYF2	AD	tardio	607688
PARK12 (Xq21-25)	-	-	Ligado ao X	tardio	300557
PARK13 (2p13)	<i>Omi/HTRA2</i>	Omi/ HtrA2	AD	tardio	606441
PARK14 (22q13.1)	<i>PLA2G6</i>	-	AR	juvenil	603604
PARK15 (22q12-q13)	<i>FBXO7</i>	-	AR	precoce	605648
PARK16 (1q32)	-	-	Fator de risco	tardio	-
PARK17 (4p16)	<i>GAK</i>	GAK	Fator de risco	tardio	602052
PARK18 (6p21)	<i>HLA-DR</i>	HLA DRA e DRB	Fator de risco	tardio	142860
- (3q27)	<i>EIF4G1</i>	EIF4G1	AD	tardio	600495

continua

continuação

- (1q21)	<i>GBA</i>	<i>GBA</i>	Fator de risco	Precoce e tardio	606463
- (17q21)	<i>MAPT</i>	-	Fator de risco	tardio	157140
- (4p15)	<i>BST1</i>	ADP-ribosil ciclase 2	Fator de risco	tardio	600387

* *SNCA* - α -Synuclein; *PRKN* - Parkin; *UCHL1* - ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; *PINK1* - PTEN-induced putative kinase 1; *DJ-1* - oncogene DJ-1; *LRRK2* - Leucine-Rich Repeat Kinase 2; *ATP13A2* - ATPase type 13A2; *GIGYF2* - GRB10-interacting GYF protein 2; *HTRA2* - HTRA serine peptidase 2; *PLA2G6* - group VI phospholipase A2; *FBXO7* - F-box only protein 7; *GAK* - Cyclin G-associated Kinase; *HLA-DR* - Major histocompatibility complex, Classe II DR; *EIF4G1* - Eukaryotic translation initiation factor 4Gamma 1; *GBA* - β -glucocerebrosidase; *MAPT* - Microtubule-associated Protein Tau; *BST1* - Bone marrow stromal cell antigen 1.

** AD- autossômica dominante / AR - autossômica recessiva.

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

(Fonte: Schulte & Gasser, 2011, com modificações).

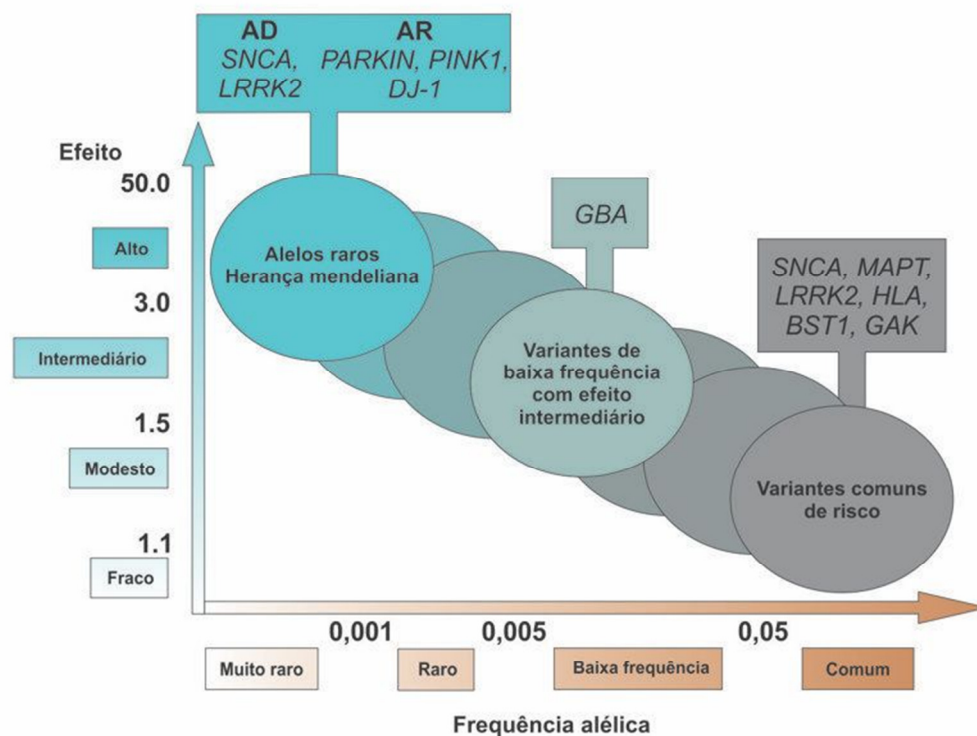


Figura 1: Distribuição das alterações gênicas associadas à Doença de Parkinson de acordo com o efeito e a frequência alélica (Mário Campos Júnior).

Dos genes identificados, cinco estão associados com formas dominantes de parkinsonismo, *SNCA*, *UCHL1*, *LRRK2*, *GIGYF2* e *HTRA2* e outros seis, *PRKN*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2*, *PLA2G6* e *FBXO7* estão associados com formas recessivas da doença. Contudo, mutações nestes genes também têm sido identificadas em casos esporádicos da doença, demonstrando que estes casos também podem possuir um importante componente genético (Gosal *et al.*, 2006; Belin & Westerlund, 2008; Biskup *et al.*, 2008).

Os mecanismos moleculares que causam a DP ainda não são totalmente conhecidos, porém os diversos genes e fatores de risco descritos até o momento têm proporcionado grandes avanços nessa direção. Tem sido sugerido que a degradação anormal de proteínas mal enoveladas pelos sistemas ubiquitina-proteossomo e de autofagia-lisossômica, o aumento do estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e lisossômicas e outras disfunções patogênicas contribuem para o aparecimento desta doença (Schulte & Gasser, 2011).

As proteínas codificadas pelos genes já associados à DP exercem papéis principalmente em determinadas vias metabólicas, incluindo a dinâmica de vesículas e lipídios (α -sinucleína), o sistema ubiquitina-proteossomo (*Parkin*, *DJ-1* e *UCHL1*), a via de sinalização celular (*LRRK2*), o estresse oxidativo, o funcionamento mitocondrial (*DJ-1*, *PINK1*, *Parkin* e *HTRA2*), a via lisossômica (*GBA*), e a manutenção da estabilidade dos microtúbulos (*MAPT*). (Figura 2) (Shulman *et al.*, 2011).

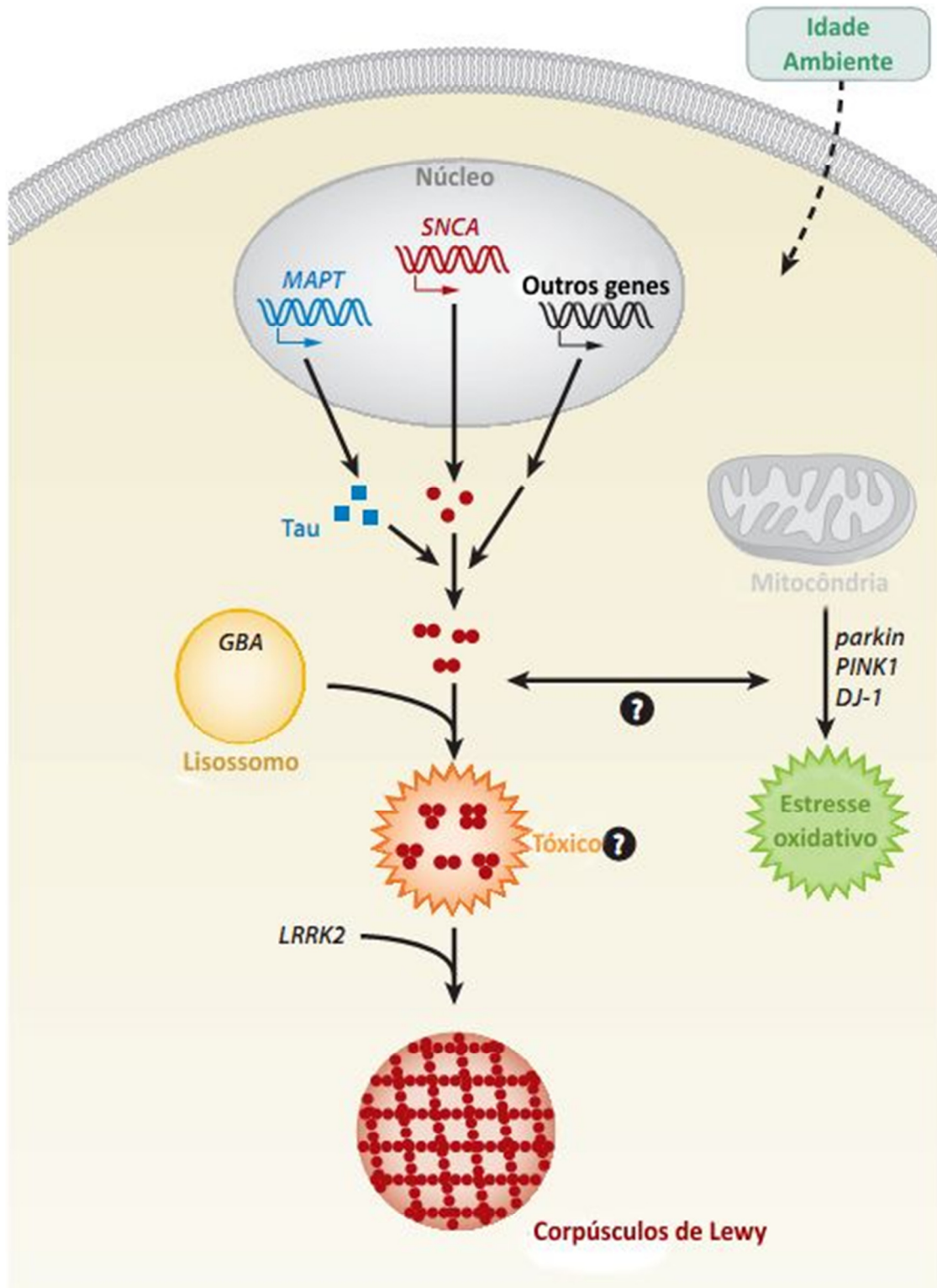


Figura 2: Vias comuns ligadas à patogênese da Doença de Parkinson. A agregação da α -sinucleína é proposta como via central que leva a neurotoxicidade na Doença de Parkinson. Além disso, outros genes de susceptibilidade para a doença, incluindo o gene do microtúbulo associado à proteína Tau (*MAPT*), o gene da glicocerebrosidase (*GBA*) e o gene da proteína quinase rica em repetições de leucina 2 (*LRRK2*), podem participar ou modificar a progressão desta cascata, hipóteses ainda não confirmadas. A via culmina na deposição de fibrilas de α -sinucleína e consequente formação dos corpúsculos de Lewy. As vias dos genes *Parkin*, quinase induzida pela PTEN 1 (*PINK1*) e *DJ-1* coordenadamente podem influenciar na dinâmica mitocondrial e na resposta ao estresse oxidativo, contribuindo para a morte do neurônio. (Fonte: Schulman, 2011).

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

O citoesqueleto e a manutenção da estabilidade dos microtúbulos são também essenciais para a remoção dos agregados citoplasmáticos. A proteína Tau, codificada pelo gene *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*) estabiliza a rede de microtúbulos, promovendo o transporte e a sinalização intracelular nos neurônios. Seu funcionamento é comprometido pela fosforilação aberrante, levando à formação de emaranhados neurofibrilares que favorecem a agregação da α -sinucleína (Farrer, 2006). Estudos desse gene têm associado certos alelos de Tau a um risco aumentado da DP, indicando que este pode ser mais um fator de risco para esta desordem (Martin *et al.*, 2001) (Figura 2).

A proteína *Leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2 ou dardarina), codificada pelo gene *LRRK2*, é uma proteína quinase multifuncional, predominantemente citoplasmática, mas que também encontra-se associada a várias organelas, incluindo o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático, lisossomos e a membrana externa da mitocôndria (Smith *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006). Seu envolvimento na patogênese da DP ainda não está claro, porém esta proteína parece desempenhar um papel central nos eventos de organização celular, integrando o tráfico celular, a fosforilação e a sinalização intracelular (Smith *et al.*, 2005; Di Fonzo *et al.*, 2006; Farrer, 2006; Gloeckner *et al.*, 2006). O papel fisiológico e os substratos da proteína LRRK2 ainda são desconhecidos, porém estudos sugerem que a maioria das mutações patogênicas identificadas no gene *LRRK2* estão associadas a um ganho da atividade

quinase dessa proteína, que pode levar ao aumento da agregação de Tau e de α -sinucleína (Singleton, 2005; Smith *et al.*, 2005; Gloeckner *et al.*, 2006; West *et al.*, 2007).

A proteína *Omi/HtrA serine peptidase 2* (HtrA2), codificada pelo gene *HTRA2*, é uma serina protease localizada na mitocôndria (onde atua na proteção contra o estresse oxidativo interno) e liberada no citosol durante um estímulo apoptótico, onde se liga a proteínas inibidoras da apoptose e parece proteger a célula do estresse oxidativo (Suzuki *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 2005; Alnemri, 2007). Mutações no gene *HTRA2* prejudicam a atividade de HtrA2 e, conseqüentemente, a resposta celular e a proteção da mitocôndria ao estresse (Strauss *et al.*, 2005). Estudos indicam ainda que a ativação da atividade de HtrA2 na mitocôndria depende de sua interação com PINK1 e, portanto, mutações no gene *PINK1* também poderiam prejudicar o funcionamento dessa proteína (Valente *et al.*, 2004; Strauss *et al.*, 2005).

Uma importante organela envolvida no processo de envelhecimento e cujas disfunções estão associadas à DP e a outras doenças neurodegenerativas é o lisossomo (Rajawat & Bossis, 2008). O uso de inibidores lisossômicos leva ao aumento dos níveis intracelulares de α -sinucleína, demonstrando que esta proteína é degradada não somente pela via proteossômica, mas também pela via lisossômica (Webb *et al.*, 2003; Cuervo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Cuervo e colaboradores (2004) demonstraram que a α -sinucleína, em sua forma selvagem, mas não na forma mutada, é degradada pela via lisossômica de autofagia mediada por chaperonas. Por essa via, a α -sinucleína se liga a receptores na membrana do lisossomo e é seletivamente translocada para dentro dele. Quando mutada ou com alguns tipos de modificação pós-traducional, esta proteína, apesar de se ligar aos receptores, não é translocada e pode bloquear sua própria entrada no lisossomo, bem como, a entrada de outros substratos, inibindo assim sua degradação e levando a seu acúmulo no citosol. A inibição dessa via de degradação (e da via proteossômica) leva à ativação compensatória de outra via lisossômica de degradação, a macroautofagia, um tipo de autofagia pela qual grandes porções do citoplasma são englobadas e levadas ao lisossomo (Cuervo *et al.*, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008). Além disso, a forma selvagem da α -sinucleína e seus agregados também podem ser degradados pela via da macroautofagia (Webb *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2008). Sendo assim, duas vias lisossômicas, a autofagia mediada por chaperonas e a macroautofagia, atuam no controle dos níveis de α -sinucleína em células neuronais, sugerindo que defeitos em qualquer uma dessas vias ou no funcionamento geral do lisossomo podem ser um fator inicial no acúmulo de α -sinucleína e, conseqüentemente, na cascata patológica da DP (Vogiatzi *et al.*, 2008; Xilouri *et al.*, 2008). O lisossomo é, portanto, uma importante via para a degradação

desta e de outras proteínas citoplasmáticas e seu mau funcionamento pode contribuir para a agregação de proteínas no citosol e para o aumento do estresse celular, participando assim na patogênese da DP (Cuervo *et al.*, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008).

A proteína ATP13A2, codificada pelo gene *ATP13A2*, é uma ATPase tipo P do grupo 5 localizada na membrana lisossômica e expressa predominantemente no cérebro. Sua função ainda é desconhecida, porém, ela é uma proteína de transporte lisossômica e acredita-se que seja responsável pela manutenção do pH ideal dentro do lisossomo (Klein & Lohmann-Hedrich, 2007; Bras *et al.*, 2008). Mutações neste gene podem levar a retenção da proteína ATP13A2 no retículo endoplasmático e sua degradação pela via proteossômica, ao invés de sua inserção na membrana lisossômica (Ramirez *et al.*, 2006). O gene *ATP13A2* é um dos genes cujo estudo deve ajudar a elucidar ainda mais a ligação entre a patogênese da DP e o mecanismo lisossômico de degradação proteica (Klein & Lohmann-Hedrich, 2007).

Outro gene recentemente associado à DP e cujas mutações vêm sendo caracterizadas como os mais importantes fatores de risco para esta desordem (Schapira, 2009), podendo levar a disfunções no lisossomo, interferindo na degradação e nos níveis citoplasmáticos da proteína α -sinucleína e, assim, contribuindo para a patogênese da DP, é o gene *GBA*.

O gene *GBA*

O gene *GBA* humano (OMIM 606463) está localizado em 1q21 (Shafit-Zagardo *et al.*, 1981; Barneveld *et al.*, 1983), uma região com grande densidade gênica no cromossomo 1 (Winfield *et al.*, 1997). Este gene possui 7,6 Kb e é composto por 11 exons, que codificam a enzima lisossômica glicocerebrosidase (EC 3.2.1.45) (Figura 3) (Horowitz *et al.*, 1989).

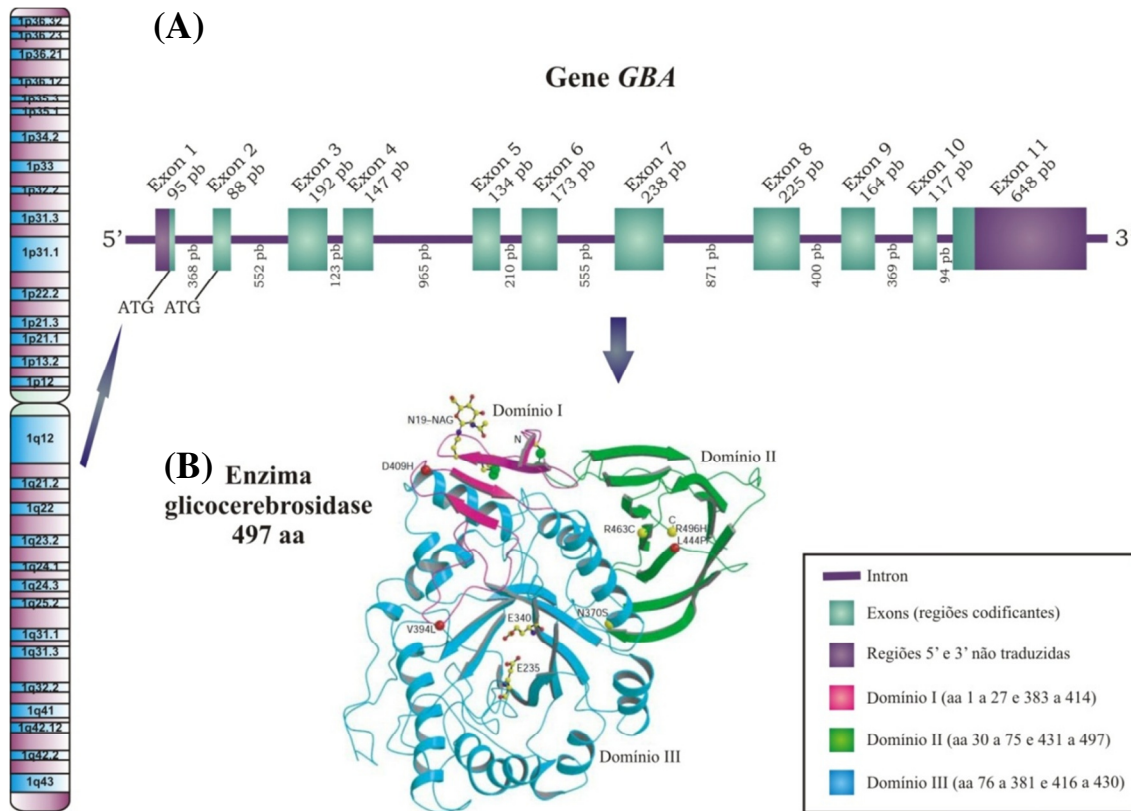


Figura 3: Esquema do gene *GBA*, mostrando sua localização cromossômica, e da proteína glicocerebrosidase. (A) Estrutura do gene *GBA*, em exons e introns, com seus respectivos tamanhos em pb. (B) Estrutura tridimensional da enzima glicocerebrosidase, demonstrando a localização de seus 3 domínios. As bolas verdes representam as pontes dissulfeto no domínio I; os resíduos catalíticos E235 e E340 do sítio ativo estão destacados no centro da enzima; e as 6 mutações mais comuns estão representadas como bolas vermelhas (severas) e amarelas (brandas) (Fonte da estrutura e dos dados da proteína: Dvir *et al.*, 2003).

O cDNA codificado pelo gene *GBA* possui aproximadamente 2 Kb, porém diferentes RNAm já foram detectados, sendo este fato atribuído a variações de encadeamento, a sítios alternativos de início de transcrição e de poliadenilação e à transcrição do pseudogene (Graves *et al.*, 1988; Reiner *et al.*, 1988; Sorge *et al.*, 1990; Imai *et al.*, 1993; Hruska *et al.*, 2008).

O gene *GBA* possui dois sítios ATG de início de tradução, um localizado no exon 1 e um no exon 2 (Figura 3). Ambos são eficientemente traduzidos e produzem polipeptídios com peptídeo sinal de tamanhos diferentes, que são removidos da proteína madura (Sorge *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1987; Pasmanik-Chor *et al.*, 1996). A iniciação no primeiro ATG produz uma proteína com um peptídeo sinal de 39 resíduos e no segundo ATG produz uma proteína com peptídeo sinal de 19 resíduos, porém ambas são processadas em uma enzima de 497 aminoácidos, a glicocerebrosidase (EC 3.2.1.45), também conhecida como glicosilceramidase ou β -glicosidase ácida (Figura 3). Esta enzima possui 55,5 kDa (Dinur *et al.*, 1986; Mistry & Cox, 1993) e estudos que revelaram sua estrutura tridimensional mostraram que seu enovelamento forma 3 domínios (Dvir *et al.*, 2003). O domínio I, formado pelos aminoácidos

1 a 7 e 383 a 414, contém duas pontes dissulfeto (aminoácidos 4 a 16 e 18 a 23), que parecem ser requeridas para o correto enovelamento da proteína (Dvir *et al.*, 2003). O domínio II é formado pelos aminoácidos 30 a 75 e 431 a 497 e se assemelha em estrutura a uma imunoglobulina. Os domínios I e II parecem desempenhar um papel regulatório ou estrutural, enquanto que o domínio III, formado pelos aminoácidos 76 a 381 e 416 a 430, contém o sítio catalítico (Figura 3). Os domínios II e III parecem estar conectados por um alça flexível, enquanto que o domínio I interage estreitamente com o domínio III (Dvir *et al.*, 2003).

A enzima glicocerebrosidase está localizada na membrana do lisossomo, onde catalisa a hidrólise da ligação β -glicosídica do glicolípido glicocerebrosídeo (glicosilceramida ou ceramida β -glicosídeo), um esfingolípido presente na membrana plasmática das células de mamíferos, originando ceramida e glicose (Dinur *et al.*, 1986; Mistry & Cox, 1993; Sidransky, 2004; Hruska *et al.*, 2008). Outro substrato desta enzima é o glicolípido glicosilesfingosina, um composto altamente citotóxico (Figura 4) (Sidransky, 2004). Na maioria dos tecidos de mamíferos, o glicocerebrosídeo é um metabólito intermediário nas vias anabólicas e catabólicas de glicosfingolípídios complexos, e o intermediário final na degradação desses lipídios (Grabowski & Horowitz, 1997). Além de componentes da membrana celular, os esfingolípídios desempenham diversos papéis em vias envolvidas na sinalização celular, tráfego intracelular e apoptose (Hannun & Bell, 1987; Grabowski & Horowitz, 1997).

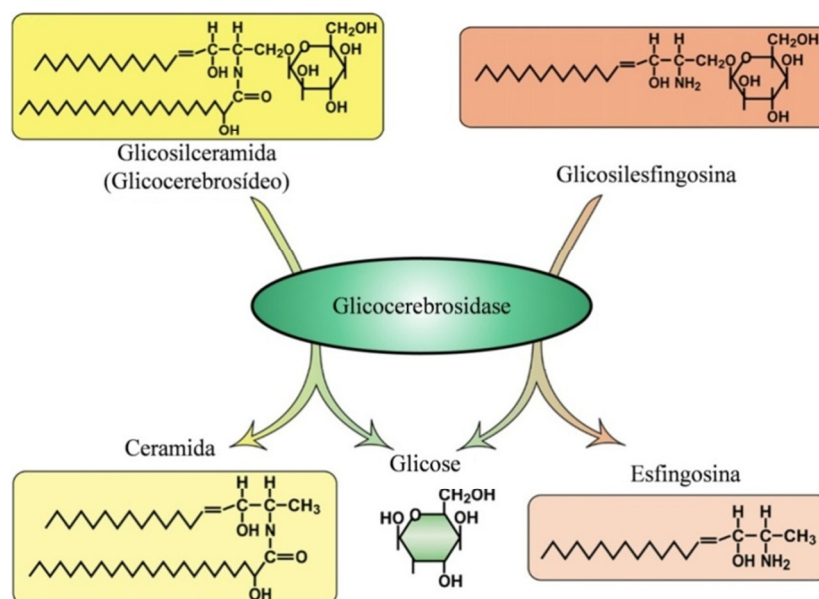


Figura 4: Substratos e produtos da enzima glicocerebrosidase. (Fonte: Sidransky *et al.*, 2004)

A glicocerebrosidase está presente em todos os tecidos, porém os níveis de expressão do RNAm e a atividade enzimática variam consideravelmente entre diferentes tecidos e linhagens celulares (Reiner *et al.*, 1987; Reiner & Horowitz, 1988; Reiner *et al.*, 1988; Wigderson *et al.*, 1989; Grabowski & Horowitz, 1997; Dodson & Guo, 2007; Hruska *et al.*, 2008). Essa especificidade celular parece estar associada às diferentes necessidades das células de metabolizar a glicosilceramida (Grabowski & Horowitz, 1997). Estudos de expressão também revelaram diferenças na habilidade das linhagens celulares de traduzir eficientemente o RNAm ou de processar o produto da tradução em uma enzima ativa, indicando que existe um sistema de controle coordenado para a expressão da glicocerebrosidase nos níveis de transcrição, tradução e modificações pós-traducionais e transporte (Grabowski & Horowitz, 1997; Hruska *et al.*, 2008).

No mesmo *locus* cromossômico do *GBA*, a aproximadamente 16 kb a jusante deste gene, encontra-se um pseudogene altamente homólogo, o *GBAP*, que apresenta 96% de similaridade com a sequência do gene funcional (Horowitz *et al.*, 1989; Zimran *et al.*, 1990; Winfield *et al.*, 1997). Este pseudogene possui 5,7 kb de extensão e a mesma organização em éxons e íntrons que o gene funcional. A diferença no tamanho entre os dois genes resulta principalmente da inserção de sequências *Alu* nas regiões intrônicas do gene *GBA* (Figura 5) (Horowitz *et al.*, 1989; Hruska *et al.*, 2008), enquanto que a falta de funcionalidade do *GBAP* é atribuída, em parte, a duas deleções exônicas, uma no exon 4 (de 4 pb) e uma no exon 9 (de 55 pb) (Figura 5) (Horowitz *et al.*, 1989; Winfield *et al.*, 1997).

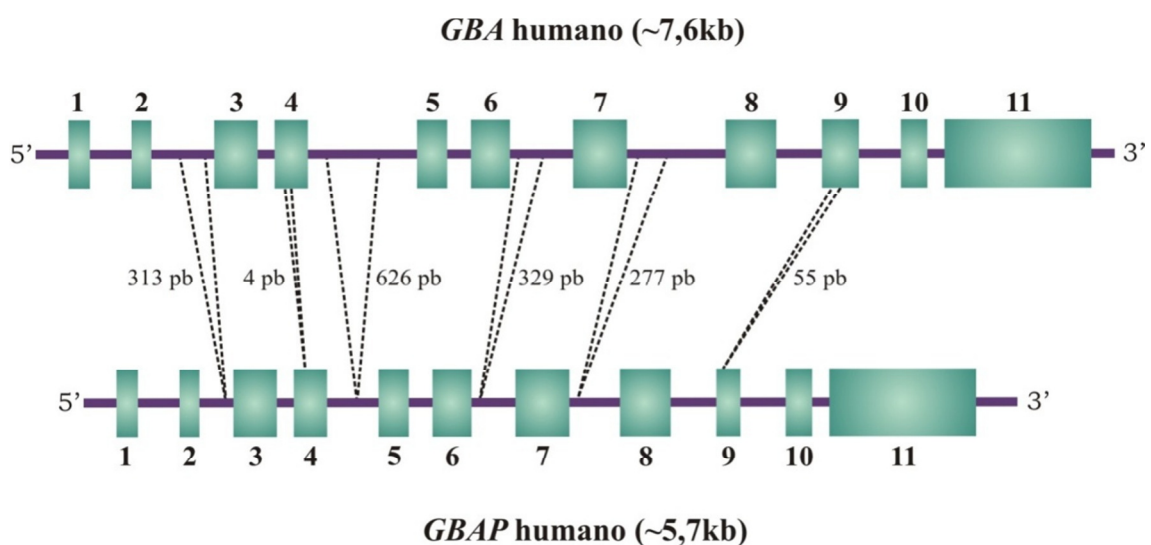


Figura 5: Comparação entre o gene funcional *GBA* e o pseudogene *GBAP* de humanos. Ambos possuem 11 éxons e os limites exon/intron são idênticos. As sequências ausentes no pseudogene estão delimitadas por linhas pontilhadas, com seus respectivos tamanhos em pb. (Fonte: Wafaei & Choy, 2005, com modificações)

Comparado com o gene *GBA* humano, os genes de cães e de camundongos apresentam 88% e 84% de similaridade com a sequência exônica humana e 92% e 87% de similaridade na sequência de aminoácidos, respectivamente. Além disso, as junções exon/intron são idênticas entre humanos e camundongos (Grabowski & Horowitz, 1997). Apesar da sequência exônica do gene *GBA* ser conservada entre humanos e outras nove espécies de mamíferos (Hruska *et al.*, 2008) o pseudogene está ausente em espécies não-primatas, tendo sido sugerido que ele resultou de uma duplicação da região cromossômica contendo o gene *GBA* ocorrido há cerca de 25-40 milhões de anos (Horowitz *et al.*, 1989; Winfield *et al.*, 1997; Martinez-Arias *et al.*, 2001), visto que o gene mais próximo a ele, o gene *MTX1*, também possui um pseudogene (Winfield *et al.*, 1997; Martinez-Arias *et al.*, 2001). Recentemente, esta hipótese foi apoiada por um estudo sobre a evolução molecular do gene *GBA* e de seu pseudogene entre diferentes espécies de primatas, incluindo gorilas, chimpanzés e orangotangos (primatas que divergiram de seu ancestral comum com os humanos há menos de 40 milhões de anos) e macacos-de-cheiro (que divergiu há mais de 40 milhões de anos) (Wafaei & Choy, 2005).

Mutações no gene *GBA*

As duas primeiras mutações no gene *GBA* foram descritas no final dos anos 80 (Tsuji *et al.*, 1987; Tsuji *et al.*, 1988) e estes dois alelos, c.1448T>C (L444P ou p.Leu483Pro) e c.1226A>G (N370S ou p.Asn409Ser), continuam a ser as mutações mais prevalentes na maioria das populações (Beutler *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2008). Desde então, mais de 300 mutações diferentes já foram identificadas no gene *GBA*, incluindo mutações *missense*, mutações *nonsense*, pequenas inserções e deleções que levam a mutações *frameshift* ou alterações *in-frame*, mutações em sítios de encadeamento e alelos complexos com duas ou mais mutações em *cis* (Beutler *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2008). Além disso, diferentes mutações resultantes de eventos de recombinação entre o gene *GBA* e o pseudogene *GBAP* já foram identificadas, sendo estas, consequência de conversões, fusões ou duplicações gênicas (Eyal *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 1990; Latham *et al.*, 1990; Zimran *et al.*, 1990; Latham *et al.*, 1991; Koprivica *et al.*, 2000; Tayebi *et al.*, 2003a; Beutler *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2008). Estima-se que cerca de 10-20% do total de mutações presentes nos gene *GBA* sejam causadas por recombinação ou conversão gênica entre esses dois genes (Latham *et al.*, 1990; Tayebi *et al.*, 2003a).

A prevalência das diferentes mutações encontradas neste gene varia consideravelmente de acordo com a etnia da população. Por exemplo, o alelo mutante N370S (c.1226A>G) geralmente não é encontrado nas populações asiáticas, porém é bastante prevalente nas Américas e na Europa, e é responsável por aproximadamente 70% das alterações identificadas em judeus *Ashkenazi* (Hruska *et al.*, 2008). Em geral, a maioria das mutações identificadas no gene *GBA* está presente em um número restrito de pacientes e são raramente encontradas, contudo, algumas alterações específicas, incluindo N370S (c.1226A>G), L444P (c.1448T>C) e IVS2+1G>A (c.115+1G>A), são mais comuns, sendo identificadas com uma frequência significativa em vários grupos étnicos e geográficos (Grabowski & Horowitz, 1997; Sidransky, 2004; Hruska *et al.*, 2008).

A maioria das mutações identificadas no gene *GBA* é do tipo *missense* e afeta aminoácidos altamente conservados em diferentes espécies de mamíferos (Hruska *et al.*, 2008). Apesar das mutações neste gene estarem distribuídas ao longo de toda a sua extensão, uma grande parte das variantes patogênicas parece se concentrar na região C-terminal, que codifica o domínio catalítico. Mutações nesta região podem acabar por abolir completa ou parcialmente a atividade da enzima glicocerebrosidase (Meivar-Levy *et al.*, 1994; Hruska *et al.*, 2008). Além disso, algumas alterações afetam também a estabilidade e o enovelamento da enzima glicocerebrosidase durante sua tradução no retículo endoplasmático, levando à degradação da proteína mutante ao invés de seu transporte até o lisossomo (Grace *et al.*, 1994; Butters, 2007).

Os efeitos das diversas mutações descritas até o momento no gene *GBA* sobre seu produto gênico variam consideravelmente, porém foi sugerido que estas poderiam ser categorizadas em: (i) mutações nulas, quando não há produção de uma proteína; (ii) mutações brandas, quando a enzima produzida é estável e possui elevada atividade residual; e (iii) mutações severas, quando a proteína produzida é instável e seu funcionamento encontra-se altamente prejudicado (Beutler *et al.*, 2005). Independente de sua classificação, mutações no gene *GBA*, que afetam a atividade enzimática da glicocerebrosidase ou seu transporte para o lisossomo, resultam no catabolismo incompleto de seu substrato e na Doença de Gaucher.

A Doença de Gaucher

A Doença de Gaucher (DG; OMIM 230800, 230900, 231000) é uma glicosíngolipidose pertencente ao grupo das doenças de armazenamento dos lisossomos.

Esta desordem apresenta um padrão de herança autossômico recessivo e é causada pela deficiência da enzima glicocerebrosidase, codificada pelo gene *GBA* (Brady *et al.*, 1966). A deficiência desta enzima leva a falhas na hidrólise de seu substrato e o consequente acúmulo de glicolipídios nos lisossomos, resultando na má função celular e nas consequências patológicas da doença (Beutler, 1995). Apesar de presente em todas as células do corpo, os efeitos da deficiência da glicocerebrosidase são mais evidentes no sistema retículo-endotelial (mononuclear fagocitário), com o acúmulo de glicocerebrosídeo ocorrendo principalmente nos macrófagos, que, quando repletos de glicolipídios, passam a ter uma aparência diagnóstica característica e são denominados “células de Gaucher” (Beutler, 1995; Guggenbuhl *et al.*, 2008).

A DG possui uma incidência de 1:40.000 a 1:60.000 na população em geral, sendo a doença de armazenamento dos lisossomos mais comum. Apesar de afetar todos os grupos étnicos, é a desordem hereditária mais frequente entre os judeus *Ashkenazi*, sendo a frequência de portadores de alelos mutantes de aproximadamente 3,43% (Sidransky, 2004; Grabowski, 2008; Hruska *et al.*, 2008). As cinco mutações mais comuns, responsáveis por 70-98% de todos os casos de DG em diferentes populações, são N370S, L444P, 84GG, IVS2+1G>A e alelos recombinantes entre *GBA* e *GBAP* (Beutler & Gelbart, 1996; Koprivica *et al.*, 2000). No Brasil, não existem estimativas da prevalência desta doença, porém estudos indicam a existência de aproximadamente 400 casos diagnosticados, sendo as mutações N370S, L444P (isolada ou em alelos recombinantes) e G377S (c.1246G>A; p.Gli416Ser) encontradas com maior frequência (Michelin *et al.*, 2005; Rozenberg *et al.*, 2006a).

A DG é caracterizada por uma heterogeneidade fenotípica vasta, incluindo desde crianças que sofrem de doença neurológica devastadora até adultos assintomáticos (Hruska *et al.*, 2008). Clinicamente, esta desordem apresenta manifestações multissistêmicas, que incluem principalmente o envolvimento do fígado, baço, medula óssea, pulmões e sistema nervoso (Sidransky, 2004; Hruska *et al.*, 2008).

Baseado nos sinais clínicos, na progressão da doença, na idade de manifestação e principalmente no grau de envolvimento do sistema nervoso e na gravidade dos sintomas neurológicos, esta desordem é, classicamente, dividida em três tipos (Tabela 2) (Beutler, 1995; Elstein *et al.*, 2001; De Fost *et al.*, 2003; Sidransky, 2004; Grabowski, 2008; Guggenbuhl *et al.*, 2008).

Tabela 2: Classificação da DG em seus três tipos

	DG tipo 1 (adulta e não-neuropática)	DG tipo 2 (infantil e neuropática aguda)	DG tipo 3 (juvenil e neuropática crônica)
Incidência	forma mais comum, contribuindo para ~95% dos casos (1:10.000)	forma mais severa e mais rara, contribuindo para <1% dos casos (1:100.000)	forma rara (1:50.000)
Sintomas	variam amplamente, abrangendo desde sua ausência completa até o envolvimento severo de órgãos	manifestam-se nos primeiros meses de vida	variam amplamente, apresentando gravidade intermediária entre os tipos 1 e 2
Principais manifestações	aumento do baço e do fígado, anemia e o desenvolvimento de lesões ósseas	severa e progressiva deterioração neurológica, além de distúrbios sistêmicas	variado grau de envolvimento sistêmico e início dos sintomas neurológicos em torno dos 10 anos, sendo estes menos severos que os apresentados no tipo 2 da doença
Progressão	geralmente lenta	Rápida	lenta, porém tornando-se mais severa no final da infância
Sobrevivência	normalmente não é afetada	abaixo dos 2 anos de idade	não é severamente afetada, ficando em torno dos 40 anos de idade

Apesar do grande número de mutações identificadas no gene *GBA* em pacientes com DG, foi sugerido que sua classificação em brandas, severas e nulas também poderia ser feita de acordo com os efeitos fenotípicos (Beutler *et al.*, 2005). Por essa divisão, a presença de mutações brandas resultaria em DG tipo 1, mesmo quando uma segunda mutação severa ou nula estivesse presente. A presença de mutações severas em homozigose, ou em combinação com uma mutação nula, resultaria em DG tipos 2 e 3. Já a presença de mutações nulas em homozigose é considerada incompatível com a vida (Beutler *et al.*, 2005).

Revisões recentes relatam que está se tornando cada vez mais difícil categorizar pacientes em uma dessas três formas da doença, devido a observação de fenótipos similares apresentando variados genótipos (Sidransky *et al.*, 1992) e que indivíduos com o mesmo genótipo podem apresentar diferentes manifestações da doença (Sidransky, 2004), sendo sugerido que a DG seria caracterizada mais corretamente como um espectro contínuo de fenótipos, com a distinção mais relevante sendo a presença ou não de manifestações neurológicas (Sidransky, 2004; Hruska *et al.*, 2008).

Além disso, essa classificação também tem sido desafiada pela observação de que dentro desse espectro fenotípico existem sintomas que fogem a classificação, incluindo um

subgrupo de pacientes com a DG, principalmente do tipo 1, que desenvolvem sintomas de parkinsonismo na vida adulta (Neudorfer *et al.*, 1996; Tayebi *et al.*, 2001; Sidransky, 2004).

As primeiras indicações de uma relação entre a DG e a DP veio de relatos clínicos que descreviam pacientes com a DG que desenvolveram variado grau de manifestações parkinsonianas (Neudorfer *et al.*, 1996; Tayebi *et al.*, 2001; Bembi *et al.*, 2003; Tayebi *et al.*, 2003b; Varkonyi *et al.*, 2003). Os primeiros estudos descreviam pacientes com brandas manifestações da DG e com sintomas clássicos de parkinsonismo (incluindo tremor, rigidez e bradicinesia) de início precoce, progressão rápida e de difícil tratamento (Neudorfer *et al.*, 1996; Tayebi *et al.*, 2001; Tayebi *et al.*, 2003b). Posteriormente, foram descritos pacientes que diferiam bastante quanto às idades de manifestação, progressão da doença, resposta ao levodopa e a presença de alterações cognitivas (Bembi *et al.*, 2003; Varkonyi *et al.*, 2003; Goker-Alpan *et al.*, 2008). Juntamente com estes estudos, também houve relatos de pacientes em que o parkinsonismo precedeu as manifestações clínicas da DG (Machaczka *et al.*, 1999).

Além das similaridades clínicas, estudos *post-mortem* realizados em alguns pacientes com DG e parkinsonismo, demonstraram uma perda considerável da pigmentação de neurônios da substância negra (Tayebi *et al.*, 2003b) e a presença de inclusões de α -sinucleína semelhantes a corpúsculos de Lewy, características típicas da DP, sugerindo a existência de um mecanismo citotóxico comum ligando a atividade anormal da glicocerebrosidase, a citotoxicidade neuronal e a formação de corpúsculos de Lewy (Wong *et al.*, 2004).

A história familiar dos probandos que apresentavam tanto a DG quanto parkinsonismo foi outro aspecto marcante que reforçou ainda mais a associação entre esta desordem e a DP. Estudos familiares demonstraram que inúmeros desses pacientes possuíam parentes próximos (portadores obrigatórios de mutação no gene *GBA*) com DP (Tayebi *et al.*, 2003b). Análises posteriores, para avaliar a incidência de parkinsonismo em parentes de pacientes com DG, revelaram uma incidência acima da esperada, com cerca de 25% das famílias entrevistadas apresentando uma história familiar positiva de DP, incluindo grandes genealogias com múltiplas gerações afetadas (Goker-Alpan *et al.*, 2004; Halperin *et al.*, 2006).

Um recente estudo retrospectivo, de pacientes franceses com DG e parkinsonismo e de casos similares publicados na literatura, demonstrou que estes pacientes compartilhavam algumas características clínicas com a DP idiopática, como início assimétrico dos sintomas, acinesia, rigidez e tremores de repouso (Kraoua *et al.*, 2009).

Sendo assim, a presença de aspectos clínicos e neuropatológicos compartilhados entre pacientes com a DG e com a DP, a ocorrência de parkinsonismo em portadores de alelos para a DG e a frequência acima da esperada de DP em parentes de primeiro-grau de pacientes com

esta desordem, levantaram à possibilidade de que mutações no gene *GBA*, mesmo em heterozigose, poderiam atuar como um fator de risco genético para o parkinsonismo e contribuir para o desenvolvimento da DP idiopática (Sidransky, 2006).

O gene *GBA* na DP

O primeiro estudo envolvendo a triagem do gene *GBA* em pacientes com DP foi realizado por Lwin e colaboradores em 2004. Neste estudo, amostras de tecido cerebral de pacientes com DP idiopática confirmada clinicamente ou patologicamente através de análises *post-mortem*, provenientes de diferentes bancos de cérebro dos Estados Unidos, foram avaliadas para a presença de mutações no gene *GBA*. O sequenciamento direto de todo o gene revelou a presença de alelos mutantes em 14% das amostras, e considerando que não havia estudos anteriores deste gene em pacientes com DP esta frequência de alterações estava acima da esperada, dada a frequência de portadores da DG de aproximadamente 0,6% na população geral, reforçando a hipótese inicial de uma associação deste gene com a DP (Lwin *et al.*, 2004).

Subsequentemente, inúmeros estudos avaliaram a presença de alterações no gene *GBA* em pacientes com DP idiopática provenientes de diferentes populações, encontrando uma frequência inesperada de mutações neste gene. Esses dados culminaram numa meta-análise publicada recentemente envolvendo 16 centros de pesquisa, sendo cinco da América Latina e do Norte, seis da Europa, dois de Israel e três da Ásia, que permitiu a comparação dos resultados genotípicos entre 5691 pacientes com DP e 4898 controles (Sidransky *et al.*, 2009). Por causa do efeito fundador, mutações no *GBA* são mais comuns em judeus *Ashkenazi*, sendo N370S e L444P as mais comuns encontradas em 15% dos pacientes e 3% dos controles. Em indivíduos não *Ashkenazi*, as mesmas foram identificadas em 3% dos pacientes e 1% dos controles. Entretanto, o sequenciamento completo do gene *GBA* leva a identificação de muitas outras variantes, aumentando a frequência alélica para 7% dentre os pacientes não-*Ashkenazi*.

Nos primeiros estudos do gene *GBA* em pacientes com DP foi constatado que a frequência de alterações identificada neste gene seria mais alta do que a incidência de mutações relatada para outros genes ligados à predisposição para a DP (Nussbaum & Ellis, 2003; Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004; Sidransky, 2005; 2006; Ziegler *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2009). Num recente estudo, Neumann e colaboradores (2009) afirmaram que a frequência de mutações identificada no gene *GBA* representaria a mais alta

frequência de mutações em um único gene relacionado ao desenvolvimento da forma idiopática desta desordem na população inglesa. Apesar de estudos anteriores na mesma amostra de pacientes terem demonstrado que genes como *PINK1*, *LRRK2* e *DJ-1* também podem desempenhar um papel na forma esporádica da DP (Abou-Sleiman *et al.*, 2003; Gilks *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006), mutações no gene *GBA* teriam a maior prevalência, com ~3,7% de todos os casos de DP esporádica sendo afetados, comparado com ~1,6% para o gene *LRRK2*, ~1,2% para o gene *PINK1* e ~1% para o gene *DJ-1* (Neumann *et al.*, 2009). Esses dados, além de reforçar a hipótese de que mutações no gene *GBA* representam um fator de susceptibilidade significativo para o desenvolvimento da DP, sugerem que este possa ser o fator de risco genético mais comum identificado nesta doença (Neumann *et al.*, 2009).

Com relação às características clínicas, diversos estudos concluíram que os pacientes com DP portadores de mutação no gene *GBA* apresentam a forma típica da doença, pois suas manifestações clínicas gerais (incluindo o início assimétrico e a extensão dos sintomas motores), a presença de história familiar e a resposta ao tratamento com levodopa não diferiam significativamente dos pacientes com DP que não apresentavam mutações neste gene (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Aharon-Peretz *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Toft *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2008; Spitz *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2009).

Por outro lado, desde os primeiros estudos do gene *GBA* em pacientes com DP foi sugerido que alterações neste gene estariam associadas a uma idade de manifestação mais precoce da doença, pois dentro da amostra de pacientes aqueles que possuíam mutações neste gene tendiam a ser mais jovens e ter manifestado os sintomas da doença mais cedo em relação aos indivíduos não mutados (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Gan-Or *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009).

Clark e colaboradores (2007) demonstraram que alterações no gene *GBA* além de associadas à DP, são mais frequentes em casos que manifestaram a doença com idade ≤ 50 anos quando comparados com casos de idade > 50 anos. Portadores de mutações apresentavam idade de manifestação 1,7 anos menor do que os não portadores, e dentre os casos com idade de manifestação ≤ 50 anos a manifestação da doença ocorria em média 2,5 anos antes em portadores de mutações do que em não portadores, o que não foi visto no grupo com idade de manifestação > 50 anos. Esses dados levaram os autores a sugerir que o *GBA* pode ser um gene de susceptibilidade a DP e que mutações neste gene atuariam como modificadores da idade de manifestação da doença (Clark *et al.*, 2007). Ao contrário desses autores, Nichols e

colaboradores (2009) apesar de observarem que pacientes com mutação manifestavam a doença até 6,04 anos mais cedo que pacientes sem mutação, afirmaram que entre pacientes com idade de manifestação >50 anos, aqueles com alterações no *GBA* manifestavam a doença significativamente mais cedo (61,6 anos) quando comparados com aqueles sem alterações (65,4 anos), mas não observaram diferença no grupo com idade de manifestação <50 anos (Nichols *et al.*, 2009).

Num recente estudo do gene *GBA*, Neumann e colaboradores (2009) afirmaram que seus achados corroboram os resultados previamente publicados, indicando que os aspectos clínicos de pacientes com DP portadores de mutações neste gene incluem uma idade precoce (<50 anos) de manifestação da doença e uma boa resposta ao tratamento com L-dopa. Além disso, análises neuropatológicas desses pacientes demonstraram que as alterações morfológicas apresentadas estavam dentro do espectro normal da DP clássica (idiopática) e não representavam uma forma atípica da doença (Neumann *et al.*, 2009). Sendo assim, os dados clínicos e neuropatológicos nestes pacientes enfatizam que os casos de parkinsonismo com mutações no gene *GBA* são indistinguíveis daqueles normalmente considerados como casos idiopáticos e esporádicos da DP (Neumann *et al.*, 2009; Schapira, 2009).

Apesar dos grandes avanços no entendimento da patogênese da DP, os mecanismos que levam à agregação e aos efeitos tóxicos da α -sinucleína, assim como, as vias celulares envolvidas na sua remoção, ainda não estão totalmente esclarecidos (Sidransky, 2006). Os resultados de estudos genéticos, como aqueles que vêm demonstrando uma associação de mutações no gene *GBA* com a DP, têm motivado a busca pelas potenciais vias patológicas para tal associação (Neumann *et al.*, 2009). Os mecanismos pelos quais mutações neste gene exercem seus efeitos e atuam como fatores de risco ainda são desconhecidos, porém o espectro de sinucleinopatias exibida por portadores de alterações no *GBA* sugerem um papel da glicocerebrosidase na agregação da α -sinucleína e diversas tentativas para explicar essa associação têm surgido nos últimos anos (Bras & Singleton, 2009; Depaolo *et al.*, 2009; Westbroek *et al.*, 2011).

Já no primeiro estudo de triagem mutacional do gene *GBA* em pacientes com DP, os autores especularam que a glicocerebrosidase alterada atuaria como um fator de risco para o desenvolvimento de parkinsonismo devido a uma perda de função, na qual a atividade enzimática diminuída levaria ao aumento focal de glicosilceramida em regiões específicas do cérebro (Lwin *et al.*, 2004). Entretanto, um estudo recente revelou que diferentes mutações no *GBA* podem, por outro lado, levar a um ganho de função da proteína glicocerebrosidase

contribuindo diretamente para a agregação da α -sinucleína e subsequente formação dos corpúsculos de Lewy (Cullen *et al.*, 2011).

A proteína α -sinucleína tem pouca ou nenhuma estrutura secundária em solução, porém sua ligação a inúmeras proteínas altera seu estado nativo e leva a conformações parcialmente enoveladas (Uversky *et al.*, 2002). Sendo assim, alternativamente, é possível que a interação da α -sinucleína com outras proteínas mutadas, tais como a glicocerebrosidase, poderia contribuir para sua agregação (Sidransky, 2006; Depaolo *et al.*, 2009).

Considerando ainda que a α -sinucleína é degradada tanto por autofagia quanto pelo proteossomo (Webb *et al.*, 2003) duas outras hipóteses foram sugeridas. A primeira seria de que o mau enovelamento da enzima glicocerebrosidase afetaria seu transporte para o lisossomo podendo, conseqüentemente, sobrecarregar o sistema de degradação via ubiquitina-proteossomo e comprometer sua habilidade de remover outras proteínas acumuladas no citosol, incluindo a α -sinucleína (Lwin *et al.*, 2004; Sidransky, 2006; Depaolo *et al.*, 2009). A segunda seria de que a presença de mutações no gene *GBA*, resultando em deficiência enzimática, poderiam causar uma disfunção lisossômica ou interferir na ligação da α -sinucleína com seu receptor na membrana do lisossomo, levando a degradação imprópria dessa proteína e/ou acarretando falhas na remoção do material agregado, que já foi demonstrado ser degradado pela via lisossômica (Cuervo *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004; Sidransky, 2004; Hruska *et al.*, 2006; Sidransky, 2006; Depaolo *et al.*, 2009).

Outro mecanismo proposto para a associação entre o gene *GBA* e as sinucleinopatias envolve um papel em potencial dos lipídios (Hruska *et al.*, 2006), com estudos em modelos animais e tecido *post-mortem* de humanos sugerindo que essas moléculas poderiam ser um fator crucial na toxicidade da α -sinucleína (Scherzer & Feany, 2004). Wong e colaboradores (2004) observaram que perturbações na síntese e no metabolismo de lipídios poderiam contribuir para efeitos citotóxicos, acúmulo de glicocerebrosídeo e formação de corpúsculos de Lewy. O conteúdo de fosfolipídios na membrana afeta a atividade da glicocerebrosidase, sendo que lipídios negativamente carregados aumentam sua atividade, enquanto que fosfolipídios neutros não possuem essa habilidade (Dale *et al.*, 1976; Sarmientos *et al.*, 1986; Vaccaro *et al.*, 1989). Apesar do efeito preciso de mutações no gene *GBA* sobre a composição de lipídios de membrana não estar clara, foi demonstrado que o acúmulo de glicocerebrosídeo pode produzir um aumento de fosfolipídios neutros, que por sua vez diminui ainda mais a atividade enzimática da glicocerebrosidase (Wong *et al.*, 2004). Além disso, a forma funcional da α -sinucleína é ligada a lipídios (Bussell & Eliezer, 2004), sendo que esta adota uma conformação helicoidal quando associada com membranas lipídicas, o que inibe sua

conversão em formas fibrilares (Zhu *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que a α -sinucleína possui pouca afinidade de ligação por fosfolipídios neutros (Davidson *et al.*, 1998; Jo *et al.*, 2000) e que se liga à glicosfingolipídios cerebrais que contém glicocerebrosídeo em sua estrutura, proporcionando um possível elo bioquímico entre a atividade enzimática da glicocerebrosidase e sinucleinopatias, como na DP (Schlossmacher *et al.*, 2005). Portanto, mudanças na estrutura lipídica da membrana devido ao acúmulo de glicocerebrosídeo e/ou glicosfingosina podem interferir na afinidade e na ligação da α -sinucleína aos lipídios de membrana. Livre no citosol esta proteína apresenta maior propensão a agregar, aumentando sua citotoxicidade e levando a formação dos corpúsculos de Lewy, e possivelmente a uma patologia associada com mutações no *GBA* (Feany, 2004; Wong *et al.*, 2004; Aharon-Peretz *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2006; Depaolo *et al.*, 2009).

Um resultado interessante a cerca da participação do lisossomo, da glicocerebrosidase, e de outras enzimas lisossômicas em geral, na patogênese da DP vem do estudo de Balducci e colaboradores (2007), no qual a atividade de diversas hidrolases lisossômicas foi testada no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP e controles. Estes autores demonstraram que a atividade de várias dessas enzimas, incluindo a glicocerebrosidase, estava significativamente reduzida em pacientes com DP, refletindo uma possível disfunção lisossômica e apoiando ainda mais uma associação entre os mecanismos patofisiológicos da DP e hidrolases lisossômicas (Balducci *et al.*, 2007).

Um maior número de estudos que explorem os mecanismos moleculares e patofisiológicos por trás da associação entre alterações no gene *GBA* e a DP levarão a um melhor entendimento desta desordem e são de extrema importância para a elucidação do papel deste gene em sua patogênese (Depaolo *et al.*, 2009).

Atualmente, o elo entre a DG e a DP é claramente reconhecido e mutações no gene *GBA* parecem representar um dos mais importantes fatores de risco para DP (Schapira, 2009; Bekris *et al.*, 2010). Apesar disso, deve ser lembrado que a maioria dos pacientes com DG e grande parte dos portadores de alelos mutantes para esta doença nunca desenvolverão DP, e mesmo em famílias onde o parkinsonismo está presente, sua penetrância é incompleta, pois nem todos os portadores desenvolvem doenças neurodegenerativas (Goker-Alpan *et al.*, 2004; Sidransky, 2004).

Sendo assim, apesar da crescente complexidade e da diversidade dos mecanismos envolvidos na patogênese da DP, a investigação de fatores de risco genéticos permanece como uma importante maneira de proporcionar novas evidências que poderão levar ao futuro desenvolvimento de terapias direcionadas ao tratamento desta desordem. Assim, o grande

número de pacientes com DP identificados com alterações no gene *GBA*, os diversos estudos demonstrando a associação deste gene com variadas formas de sinucleinopatias, e o fato de ainda ser difícil estimar o risco de se desenvolver parkinsonismo devido a suas alterações tornam evidente a necessidade de mais investigações deste gene em indivíduos com DP, principalmente em populações onde estes estudos ainda são escassos.

1 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal investigar se mutações no gene *GBA* constituem um fator genético de predisposição para o desenvolvimento da DP na população brasileira. Com esta finalidade, temos como objetivos específicos:

- Rastrear mutações no gene *GBA* em uma amostra de pacientes brasileiros com DP;
- Gerar dados relativos à frequência das alterações encontradas entre pacientes com DP, de forma a contribuir para um melhor entendimento do papel deste gene na etiologia desta desordem;
- Comparar a frequência das alterações encontradas na amostra de pacientes com a frequência destas em uma amostra de indivíduos controle, de forma a analisar se a presença de mutações no gene *GBA* está associada a um risco maior de desenvolvimento de parkinsonismo;

2 METODOLOGIA

2.1 Pacientes e controles

Foram selecionados durante os anos de 2006 a 2010, para compor a amostra deste estudo, 126 indivíduos com DP não aparentados, de ambos os sexos (75 homens e 51 mulheres; faixa etária: 34 a 88 anos - idade média: $66,4 \pm 11,3$ anos) com idade de manifestação variando de 20 a 83 anos ($59,7 \pm 11,5$ anos). Dentre estes pacientes, 24 (19%) relataram possuir história familiar da DP e 102 (81%) eram casos isolados da doença.

Todos foram provenientes de ambulatórios de distúrbios do movimento de importantes hospitais públicos dos Estados do Rio de Janeiro (121 pacientes) e de Goiás (5 pacientes). Eles foram encaminhados ao Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN/UERJ) após serem avaliados por médicos neurologistas especialistas em distúrbios do movimento ligados a estes hospitais. Estes médicos procederam à análise clínica, seguindo os critérios clínicos/patológicos aceitos para a DP (Hughes *et al.*, 2001) e levantaram a história familiar dos probandos. Foram incluídos na pesquisa somente os pacientes com DP idiopática, tendo sido excluídos os casos de parkinsonismo secundário.

Além dos pacientes com DP, participaram deste estudo 152 indivíduos voluntários saudáveis (66 homens e 86 mulheres; faixa etária: 50 a 95 anos - idade média: $61,2 \pm 9,4$ anos), que não apresentavam sinais ou sintomas da DP ou de qualquer outra desordem neurodegenerativa. Todos estes indivíduos eram brasileiros e residentes no Estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos participantes foram esclarecidos com relação aos objetivos da pesquisa e convidados a fazer parte do estudo. A coleta do material biológico para a análise molecular teve início somente após a autorização destes indivíduos, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido próprio para pacientes e controles (Anexos A e B). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo nº 032.2.2008 - parecer 004/2009) (Anexo C) e todas as condutas adotadas seguiram as normas éticas do CNS/Ministério da Saúde (Resolução 196/96), que regem as pesquisas envolvendo seres humanos.

2.2 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico ou de saliva, utilizando-se dois kits comerciais. A extração do DNA genômico a partir de sangue periférico foi realizada utilizando-se o Kit comercial *illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Para esta extração, 5 mL de sangue periférico foram coletados por um técnico em análises clínicas, sob condições de plena assepsia, utilizando tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA. Em um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf* são adicionados 300 uL de sangue, 20 uL de proteinase K (20 mg/mL) e 400uL de *lysis buffer type 10* (1-2mg/mL). À temperatura ambiente, durante 10 minutos, essa solução é misturada em vórtex por aproximadamente 4 vezes até adquirir uma cor marrom escuro. Em seguida, esta é centrifugada e o sobrenadante é transferido para uma coluna que é novamente centrifugada por um minuto a 11.000 rpm e o sobrenadante é descartado. Na coluna é acrescentado 500 uL de *lysis buffer type 10* (1-2mg/mL) e centrifugado novamente por um minuto a 11.000 rpm, ao final descartando o sobrenadante. Em seguida, é adicionado 500 uL de *wash buffer type 6* (24 mL de etanol absoluto em 120 mL de *wash buffer type 6*) à coluna e centrifugado a 3 minutos a 11.000 rpm, ao final descartando o sobrenadante. A coluna é, então, transferida para um novo tubo tipo *ependorf* adicionando-se 200 uL de *elution buffer 5* (10 mM de KHCO_3 ; 155 mM de NH_4Cl ; 0,1 mM de EDTA) a 70°C, incubado por um minuto à temperatura ambiente. Em seguida centrifugado por um minuto à 11.000 rpm para retirar o DNA da coluna. Todas as centrifugações foram realizadas em uma centrífuga *ependorf* modelo 5417R com rotor de 6 cm de raio.

A extração de DNA a partir da coleta de saliva foi feita utilizando-se o Kit *ORAGENE™ DNA self-collection* (DNAGENOTEK). No momento da coleta, a amostra de saliva é misturada delicadamente com a solução *Oragene*. A amostra é incubada a 50°C no banho-maria por no mínimo 1 hora. A seguir, 500 uL do conteúdo da solução misturada é transferido para um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*. A essa solução adiciona-se 20 uL de *Oragene Purifier* (fornecido pelo fabricante) que é misturada em vórtex por alguns segundos. Essa solução é incubada em gelo por 10 minutos e em seguida centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante é transferido cuidadosamente para um novo tubo de 1,5 mL tipo *ependorf* descartando o *pellet* com as impurezas. Para cada 500 uL de sobrenadante, adiciona-se 500 uL de etanol 95-100% à temperatura ambiente misturando-se delicadamente. A amostra é incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para a precipitação do DNA. Em seguida, o tubo é centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. O

sobrenadante é removido delicadamente para não revolver o *pellet* e é descartado. Adiciona-se ao *pellet* 100 μ L de tampão TE [Tris 10 mM (GE Healthcare)-HCl (MERCK); EDTA 1 mM (GE Healthcare); pH 7,4]. Algumas recomendações para a coleta adequada da saliva consistiram em não beber, fumar ou mastigar 30 minutos antes da utilização do frasco coletor.

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

2.3 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

Para avaliar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Life Technologies) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (GE Healthcare), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE Healthcare)]. As amostras foram preparadas adicionando-se 1 μ L da alíquota de DNA a 1 μ L de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (GE Healthcare); xileno cianol 0,25% (GE Healthcare); glicerol 30% (ISOFAR)], 1 μ L de GelRedTM diluído previamente em 500 μ L de água destilada (UNISCIENCE) e 8 μ L de água deionizada (MilliQ). A eletroforese foi realizada a 60 V, por 1 hora em cuba horizontal [Horizon 58 (Life Technologies)], utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (GE Healthcare), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE Healthcare)]. Após a corrida eletroforética, 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 foram comparadas com o padrão de DNA de Bacteriófago λ (Life Technologies) de 100 η g/ μ L.

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

2.4 Rastreamento de mutações no gene *GBA*

A presença de mutações em todos os 11 exons do gene *GBA* foi avaliada através da técnica de sequenciamento direto dos produtos da PCR e foram confirmadas a partir de uma segunda reação da PCR.

2.4.1 Reação em cadeia da polimerase

Para avaliar a presença de alterações no gene *GBA* foi realizada, a amplificação do DNA dos pacientes para todo o gene, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida por sequenciamento direto.

A amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes aos 11 éxons, assim como das regiões de limite éxon/íntron, que incluem os sítios doadores e receptores de encadeamento, foi realizada utilizando-se 3 pares de oligonucleotídeos (Life Technologies) (tabela 3). As condições finais, nas quais as reações foram conduzidas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de todos os éxons do gene *GBA*

Éxons	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento amplificado	Referências
1 - 5	F 5' CCTAAAgTTgTCACCCATAC 3' R 5' gCAgAgTgAgATTCTgCCTC 3'	1.895 pb	Mitsui et al., 2009
5 - 7	F 5' gACCTCAAATgATATACCTg 3' R 5' AgTTTgggAgCCAgTCATTT 3'	2.049 pb	Mitsui et al., 2009
8 - 11	F 5' TgTgTgCAAggTCCAggATCAg 3' R 5' ACCACCTAgAggggAAAgTg 3'	1.682 pb	Mitsui et al., 2009

Tabela 4: Condições utilizadas na PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes aos éxons 1-4, 5-7 e 8-11.

Reagentes	Éxons		
	1 - 4	5 - 7	8 - 11
Tampão de reação 10X (BIOTOOLS)*	1X	1X	1X
dNTPs 5 mM (GE Healthcare)	300 µM	400 µM	200 µM
MgCl ₂ 50 mM (BIOTOOLS)	2,0 mM	3,0 mM	2,0 mM
Oligonucleotídeo F 10 µM (Life Technologies)	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Oligonucleotídeo R 10 µM (Life Technologies)	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
<i>Tth</i> DNA polimerase 1U/µL (BIOTOOLS)	1,0 U	2,0 U	1,0 U
DNA ~50 ηg/µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Volume final	25,0 µL	25,0 µL	25,0 µL

*Tampão de reação 10X [KCl 50 mM, Tris HCl 75 mM - pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 20 mM].

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

Análise dos éxons 1 - 4

94°C – 10'
 94°C – 30''
 55°C - 1' 30''
 72°C – 2'
 72°C – 10''

} 35 ciclos

Análise dos éxons 5 - 7

94°C – 2'
 94°C – 30''
 59°C – 1' 30''
 72°C – 2'
 72°C – 10''

} 40 ciclos

Análise dos éxons 8 - 11

94°C – 2'
 94°C – 30''
 61°C – 1' 30''
 72°C – 2'
 72°C – 10''

} 35 ciclos

2.4.2 Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação de PCR

Os fragmentos resultantes da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Life Technologies), diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (GE Healthcare), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE Healthcare)]. As amostras foram preparadas adicionando-se 3,0 µL da alíquota da reação de PCR a 1,0 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (GE Healthcare), xileno cianol 0,25% (GE Healthcare), glicerol 30% (ISOFAR)] e 1 µL de GelRed™ diluído previamente em 500 µL de água destilada (UNISCIENCE).

A eletroforese foi realizada a 100 V por, aproximadamente, 30 minutos em cuba horizontal [Horizon 58 (Life Technologies)], utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (GE Healthcare); ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE Healthcare)]. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)]. Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado foi utilizado o padrão de peso molecular 1 kb DNA ladder (Life Technologies).

A análise da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação foi feita por estimativa visual da intensidade das bandas, levando-se em consideração se a reação apresentava apenas uma única banda, mostrando que não houve amplificação inespecífica.

2.4.3 Sequenciamento automático

Todas as amostras amplificadas através da técnica de PCR foram submetidas ao sequenciamento direto, as mutações encontradas foram confirmadas a partir de uma nova reação de amplificação.

2.4.4 Purificação dos produtos de PCR

Antes de serem utilizados na reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados para a remoção de resíduos resultantes dos reagentes utilizados na reação de amplificação. Para isso, foi utilizado um kit de purificação [AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER)]. Adiciona-se a coluna 20µl de produto da PCR e 100 uL de *binding buffer*,

centrifugando por um minuto à 13.000 rpm. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 500 uL de *washing buffer* (100 mL de etanol absoluto adicionado a *washing buffer* fornecida pelo fabricante) e centrifuga-se por um minuto a 13.000 rpm. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se novamente 500 uL de *washing buffer* e centrifuga-se por 1 minuto a 13.000 rpm. Descarta-se o sobrenadante e centrifuga a coluna vazia por 2 minutos a 13.000 rpm para remover qualquer resíduo de etanol e transfere a coluna para um novo tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*. Adiciona-se a coluna 30 uL de *elution buffer* e centrifuga-se por 1 minuto a 13.000 rpm para eluir o DNA purificado. Todas as centrifugações foram realizadas em uma centrífuga *ependorf* modelo 5417R com rotor de 6 cm de raio.

2.4.5 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos purificados da PCR foram realizadas utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies). A condição final na qual as reações foram conduzidas foi a mesma para as onze regiões analisadas. Foram utilizados na reação: 50 ng do DNA purificado; 3,2 pmol do oligonucleotídeo senso ou antisenso para cada exon separadamente (tabela); 1,0 µL de tampão (Life Technologies), 0,5 µL do Kit (Life Technologies) e água para um volume final de 10 µL de reação.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento de todos os éxons do gene *GBA*.

Ex.	Senso	Antisenso
1	5' TAGTGGATCCTCTATCCTTC 3'	5' AAATTCCAGTGCCAGGATTC 3'
2	5' AAAGGCAGCTAAGCCCTGCC 3'	5' GCTACCAAAGGACTATGAGG 3'
3	5' AGTCTCTCCTAGCAGATGTG 3'	5' TCCATGGTGATCACTGACAC 3'
4	5' AAATGGTGTCAGTGATCACC 3'	5' GCAGAGTGAGATTCTGCCTC 3'
5	5' GCAAGTGATAAGCAGAGTCC 3'	5' CAAGCAGACCTACCCTACAG 3'
6	5' AATGGCTGAACCGGATGCAC 3'	5' AAGTGGAAGTAGGTTGAGGG 3'
7	5' TCAAGTGATCCACCTGCCTC 3'	5' AGTTTGGGAGCCAGTCATTT 3'
8	5' TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG 3'	5' GCTTCTGTCAGTCTTTGGTG 3'
9	5' ACCTTACCTACACTCTCTG 3'	5' GTGATGTAAGCCATCCGATG 3'
10	5' GGGTGACTTCTTAGATGAGG 3'	5' AGCTGAGAGTGTGATCCTGC 3'
11	5' GGAAGTGGGCTGAAGACAGC 3'	5' TTAGTCACAGACAGCGTGT 3'

As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (Life Technologies). 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.

Após a ciclagem, o excesso de reagentes não incorporados na reação foi removido através da precipitação dos produtos do sequenciamento. Para isso, foram adicionados ao produto da reação 80 µL de isopropanol 75%, em seguida a placa foi centrifugada a 3.000 rpm por 50 minutos (EPPENDORF). O sobrenadante foi descartado e a placa com o precipitado foi novamente centrifugada de forma invertida a 900 rpm por 1 minuto. A placa com as amostras foi levada ao termociclador Veriti modelo 9902 (Life Technologies) por 5 minutos a 75°C para a secagem. As amostras secas foram conservadas à -20°C até a aplicação no sistema de sequenciamento.

O material precipitado foi ressuspenso em 10 µL de solução de formamida [Hi Di Formamida (Life Technologies)], e foi levado ao termociclador Veriti modelo 9902 (Life Technologies) por 5 minutos a 95°C para desnaturação. Em seguida, a placa com as amostras foi submetida à centrifugação 900 rpm por 1 minuto e foi levada ao sequenciador automático ABI Prism 3130 (Life Technologies) para o processamento das amostras.

2.4.6 Análise das sequências

A análise das sequências foi realizada através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (Isis Pharmaceuticals, Inc) (Hall, 1999). As sequências obtidas foram alinhadas com o fragmento correspondente à sequência selvagem do gene *GBA*, obtidas acessando o banco de dados Ensembl (endereço eletrônico: “http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000177628;r=1:155204244-155214488;t=ENST00000368373”). Os indivíduos que apresentaram variação em suas sequências tiveram o seu DNA novamente analisado através de sequenciamento, a partir de uma nova reação de PCR, para a confirmação da presença da mutação.

2.5 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 (Sunyaev *et al.*, 2001), 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.fhrc.org/sift/SIFT.html>) fornece um *score* que prediz se a mutação é deletéria ou tolerável. Substituições de aminoácidos com valores menores que 0,05 são preditos serem deletérios.

A ferramenta eletrônica NNSPLICE versão 0.9 foi utilizada para a avaliação do impacto de variantes intrônicas em sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA. Este programa é baseado 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 NNSPLICE, no endereço eletrônico: “http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html”.

2.6 Análise estatística

Após a análise molecular do gene *GBA*, a frequência de mutações identificadas nos pacientes com DP foi comparada com a frequência identificada na amostra controle através do teste exato de Fisher, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Alterações identificadas

A triagem de mutações ao longo do gene *GBA* foi conduzida em 126 pacientes, não aparentados, com DP idiopática, provenientes de ambulatórios do Rio de Janeiro e Goiás. Dentre estes pacientes, o número de casos isolados foi maior do que o número de casos familiares, sendo a idade média de manifestação semelhante nos dois grupos (Tabela 6). O número de homens foi duas vezes maior que o número de mulheres dentre os casos familiares e semelhante entre os casos isolados (Tabela 6). As características principais desses pacientes (idade, idade de manifestação, sexo, caso familiar ou esporádico) constam no apêndice A. As análises moleculares conduzidas nesses pacientes estão disponíveis nos apêndices B e C. Nesses pacientes, foram identificadas 13 variantes de sequência: 7 variantes de sentido trocado (exons 2, 8, 9 e 10), 4 variantes intrônicas (íntrons 2, 4, 5 e 8) e 2 variantes silenciosas (exons 8 e 10) (tabela 6). Não foram encontradas alterações nos exons 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 11, assim como, nos demais íntrons (Apêndices B e C, respectivamente).

Tabela 6: Dados sobre a amostra de pacientes com DP idiopática estudada

	Casos Familiares	Casos Isolados	Total
Número de casos	24 (19,0%)	102 (81,0%)	126
Número de homens e mulheres	16 (66,7%) ♂ e 8 (33,3%) ♀	59 (57,8%) ♂ e 43 (42,2%) ♀	75 (59,5%) ♂ e 51 (40,5%) ♀
Faixa etária	41 a 87 anos	34 a 88 anos	34 a 88 anos
Idade média	65,0 ± 11,9 anos	66,7 ± 11,2 anos	66,4 ± 11,3 anos
Idade média de manifestação da DP	60,3 ± 12,2 anos (38 a 80 anos)	59,4 ± 11,4 anos (20 a 83 anos)	59,6 ± 11,5 anos (20 a 83 anos)

Tabela 7: Variantes de seqüências encontradas no gene *GBA*, com as respectivas localizações e frequências.

<i>Alteração na seqüência</i>		<i>Localização</i>	<i>Frequência da variante em DP - N(%)</i>
<i>DNA</i>	<i>Proteína*</i>		
c.38A>G	K(-)27R	Exon 2	3 (2,4)
c.115+1G>A (IVS2+1G>A)	-	Intron 2	1 (0,8)
c.454+47G>A	-	Intron 4	62 (49,2)
c.589-86A>G	-	Intron 5	40 (31,7)
c.1092G>A	G325G	Exon 8	2 (1,6)
c.1093G>A	E326K	Exon 8	4 (3,2)
c.1223C>T	T369M	Exon 8	2 (1,6)
c.1225-34C>A	-	Intron 8	120 (95,2)
c.1226A>G	N370S	Exon 9	3 (2,4)
c.1251G>C	W378C	Exon 9	1 (0,8)
c.1448T>C	L444P	Exon 10	3 (2,4)
c.1483G>C	A456P	Exon 10	4 (3,2)
c.1497G>C	V460V	Exon 10	2 (1,6)

3.2 Características das variantes encontradas

3.2.1 Variantes identificadas no exon 2 e íntron 2

A alteração K(-)27R (c.38A>G) (Figura 6) foi identificada, no exon 2, em três pacientes heterozigotos (2,4%) (PAR1190, PAR1461 e PAR2300). Dentre esses, dois são do sexo feminino e um do sexo masculino, e relataram não possuir história familiar da DP (Apêndices A e B).

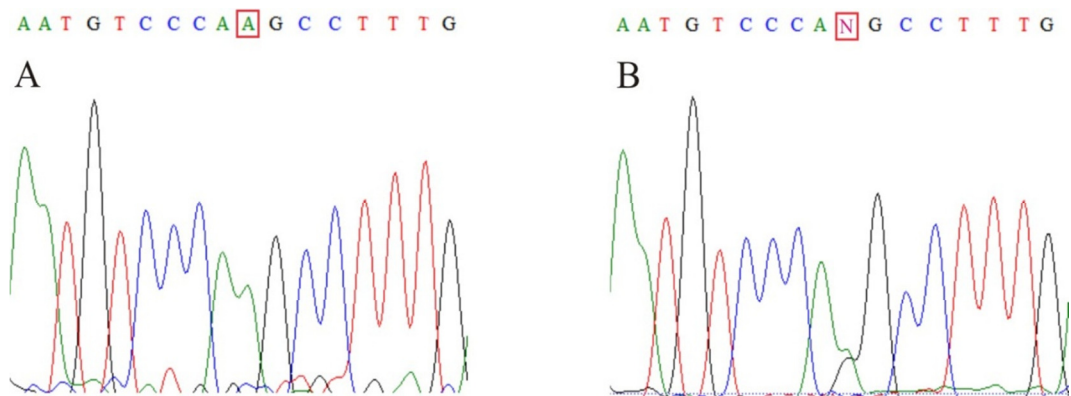


Figura 6 – Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.38A>G (K(-)27R).

A alteração intrônica IVS2+1G>A (c.115+1G>A) foi identificada em heterozigose (Figura 7) em um paciente (0,8%) (PAR1344), dentre os 126 indivíduos analisados. A paciente PAR1344, é um caso isolado, do sexo feminino, que manifestou a doença aos 52 anos de idade (apêndices A e B).

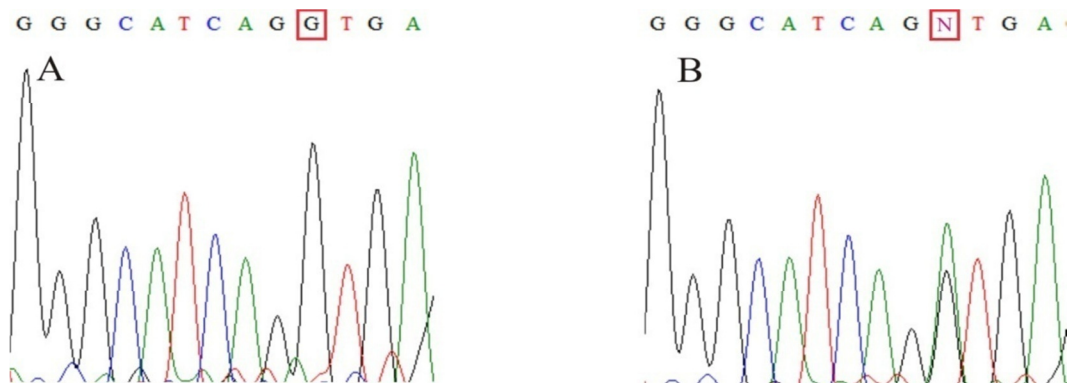


Figura 7 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.115+1G>A (IVS2+1G>A).

3.2.2 Variante identificada no íntron 4

A alteração no íntron 4, c.454+47G>A (Figura 8), foi identificada em 62 pacientes (14 casos familiares e 48 casos esporádicos), dos quais 18 pacientes são homozigotos (apêndice C).

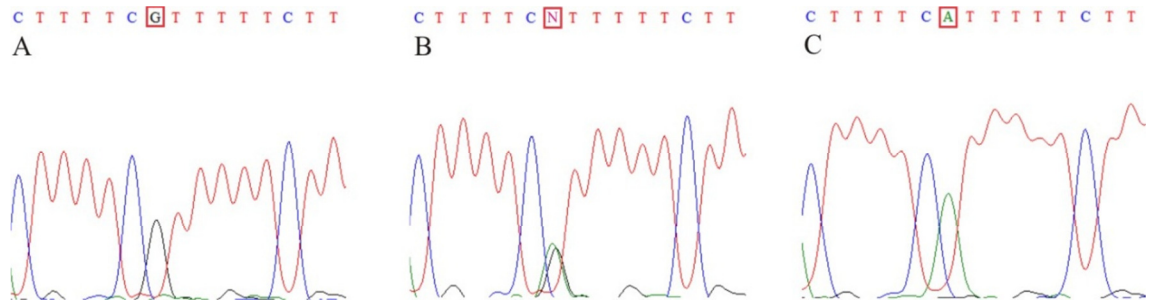


Figura 8 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.454+47G>A. C) Alteração c.454+47G>A em homozigose.

3.2.3 Variante identificada no íntron 5

A alteração no íntron 5, c.589-86A>G (Figura 9), foi identificada em 40 pacientes (10 casos familiares e 30 casos esporádicos), dos quais 11 são homozigotos (apêndice C).

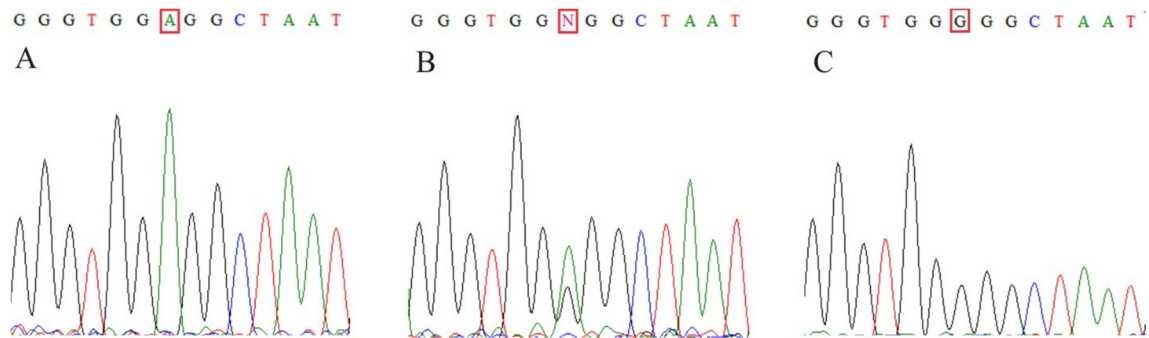


Figura 9 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.589-86A>G. C) Alteração c.589-86A>G em homozigose.

3.2.4 Variantes identificadas no exon 8 e no íntron 8

Três alterações foram identificadas no exon 8 (T369M, G325G e E326K). A variante T369M (c.1223C>T) foi identificada em heterozigose (Figura 10) em dois pacientes (1,6%) (PAR1164 e PAR1224) (apêndices B e C).

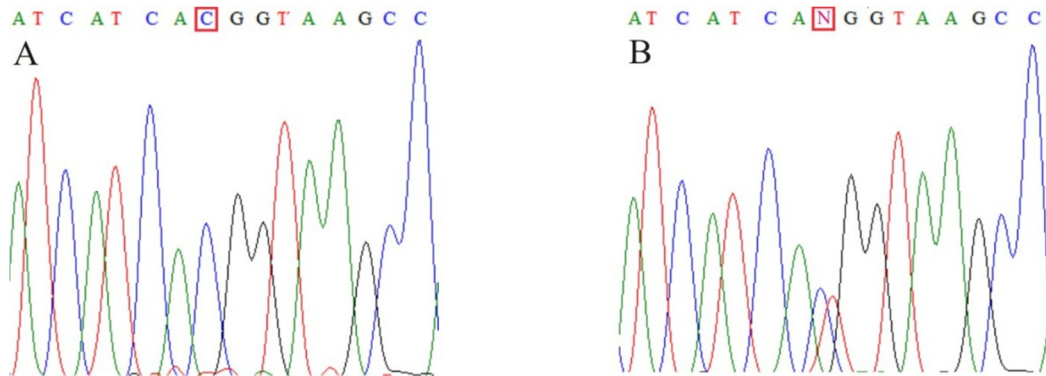


Figura 10 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1223C>T (T369M).

A alteração G325G foi identificada em heterozigose (Figura 11) em dois pacientes (1,6%) (PAR1359 e PAR1449), sendo ambos casos isolados (apêndices A e B).

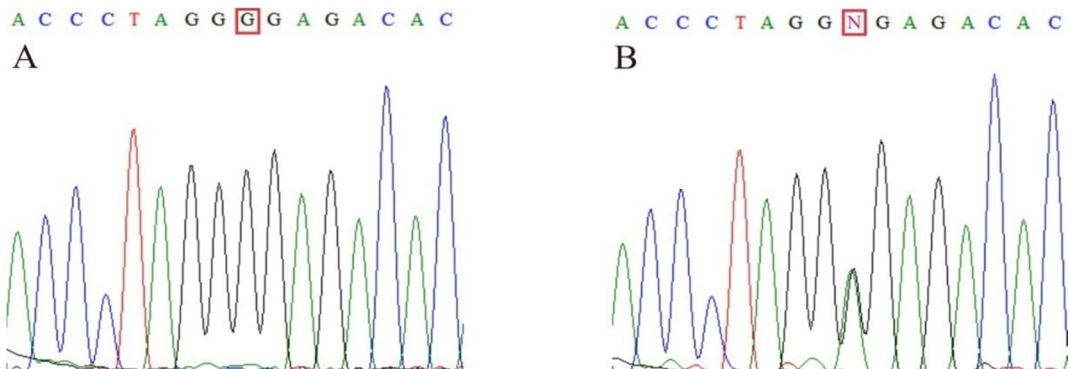


Figura 11 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1092G>A (G325G).

A mutação E326K (c.1093G>A) foi identificada em quatro pacientes (3,2%) (PAR1648, PAR2057, PAR2257 e PAR2266) (Figura 12), sendo três do sexo masculino e um do sexo feminino. Destes, dois relataram possuir história familiar de DP (apêndices A e B).

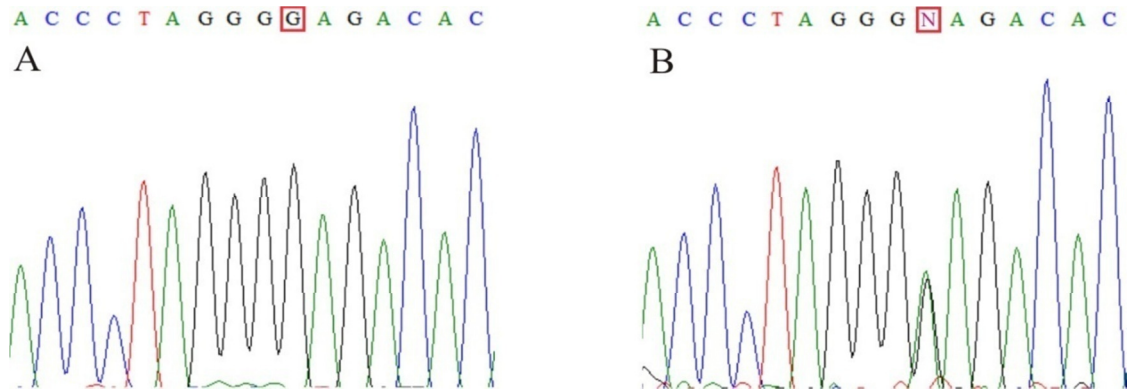


Figura 12 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1093G>A (E326K).

O paciente PAR1648, heterozigoto para a alteração E326K, é um caso familiar, do sexo masculino, que manifestou a doença aos 56 anos de idade. Ele é brasileiro, natural do Rio de Janeiro, porém possui ascendência portuguesa por parte dos bisavós paternos. Sua avó paterna e seu pai, já falecidos, foram diagnosticados com DP aos 70 anos de idade (Figura 13).

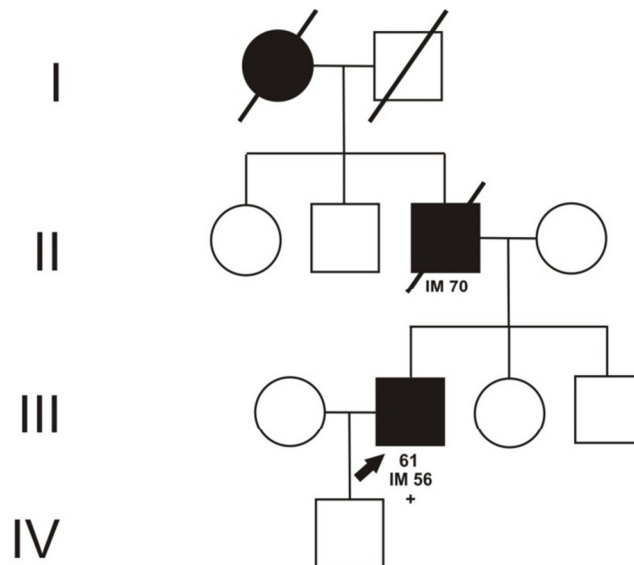


Figura 13 - Heredograma da família do paciente PAR1648 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a alteração c.1093G>A (E326K).

A alteração c.1225-34C>A, localizada no íntron 8, foi identificada em 120 pacientes (24 casos familiares e 96 casos esporádicos) (Figura 14), dos quais 84 pacientes são homozigotos (apêndice C).

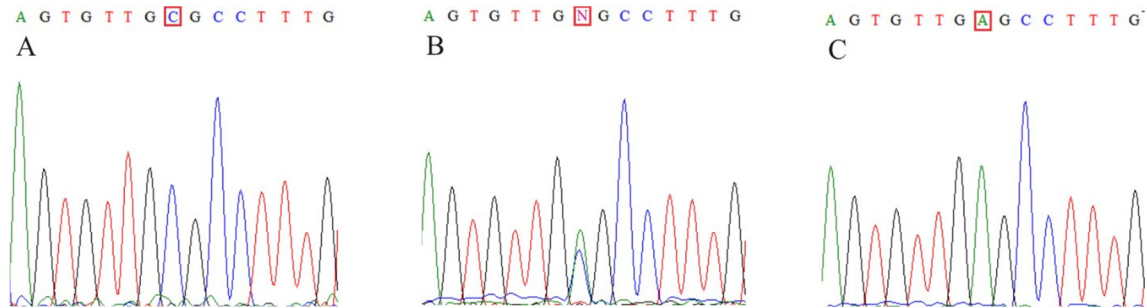


Figura 14 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1225-34C>A. C) Alteração c.1225-34C>A em homozigose.

3.2.5 Variantes identificadas no exon 9

Duas alterações foram identificadas no exon 9 (N370S e W378C). A mutação N370S (c.1226A>G) foi identificada em três pacientes heterozigotos (2,4%) (PAR1154, PAR1461 e PAR2353) (Figura 15). Dois são do sexo masculino e uma do sexo feminino e relataram não possuir história familiar da DP (apêndices A e B).

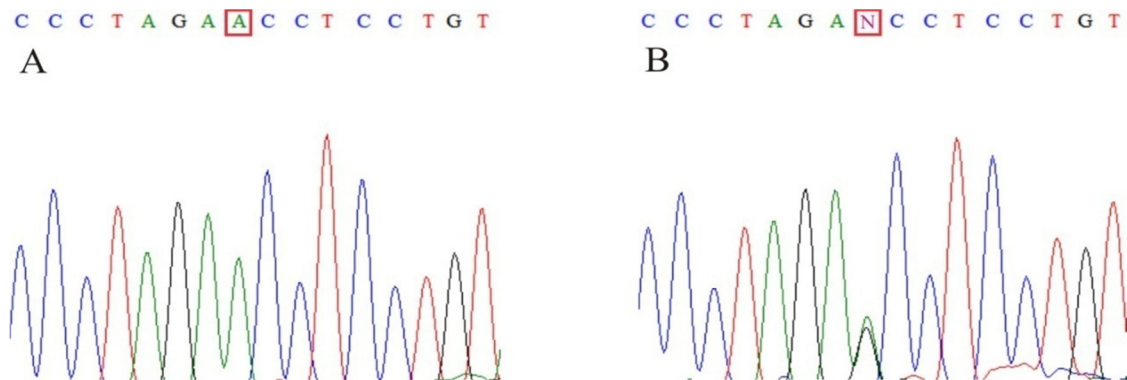


Figura 15 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1226A>G (N370S).

A mutação W378C (c.1251G>C), nunca antes descrita na literatura, foi identificada em uma paciente do sexo feminino (0,8%) (PAR2285) (Figura 16), natural de São Paulo, sem história familiar da doença (apêndices A e B).

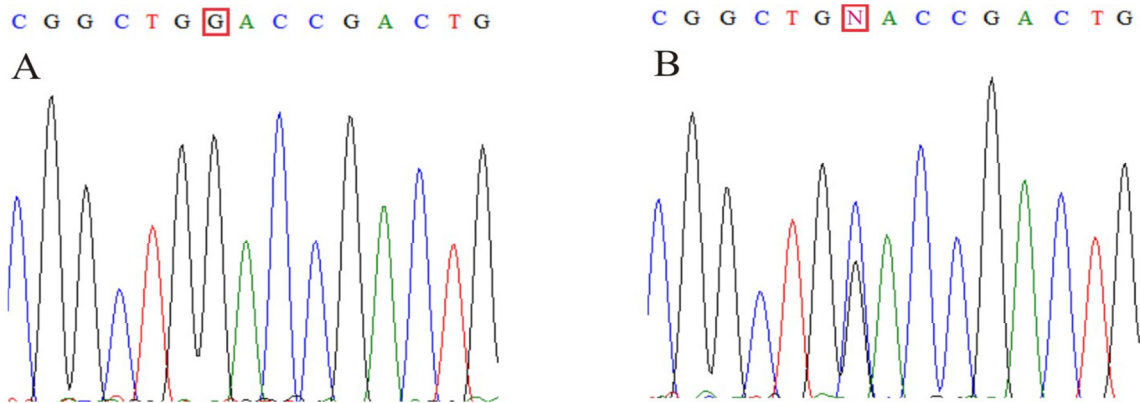


Figura 16 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1251G>C (W378C).

3.2.6 Variantes identificadas no exon 10

Três alterações foram identificadas no exon 10 (L444P, A456P e V460V). A mutação L444P (c.1448T>C) foi identificada em heterozigose em três pacientes (2,4%) (PAR1156, PAR2080 e PAR2257) (Figura 17), sendo dois casos isolados e um caso familiar. Além da L444P, identificamos também as alterações A456P e V460V em ambos os pacientes, que já foram descritas anteriormente e a presença delas juntas em um único indivíduo pode ser resultado de uma recombinação entre o gene *GBA* e seu pseudogene *GBAP*, o que caracterizaria um alelo recombinante, neste caso o alelo *RecNciI* (Figura 18).

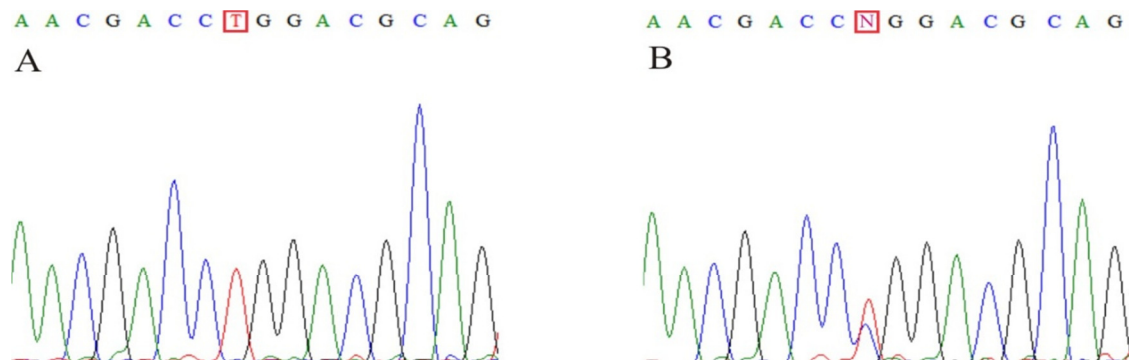


Figura 17 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1448T>C (L444P).

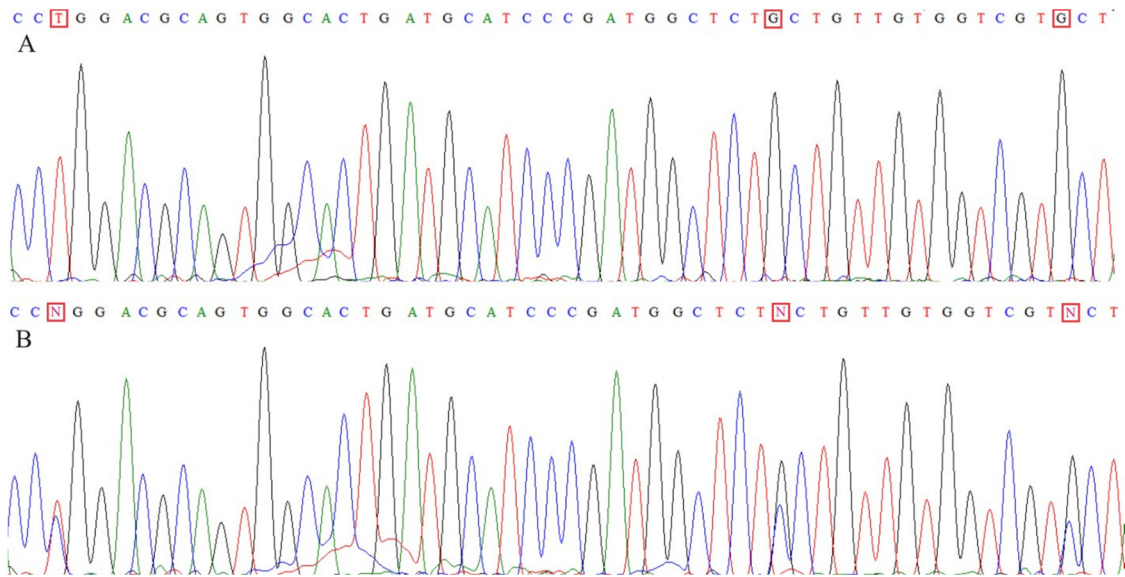


Figura 18 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alterações c.1448T>C (L444P), c.1483G>C (A456P) e c.1497G>C (V460V) - *RecNciI*.

Os pacientes PAR1156 e PAR2080 manifestaram a DP, respectivamente, aos 52 e 60 anos de idade. O paciente PAR1156 (Figura 19) é natural do Rio de Janeiro, porém relatou possuir ascendência portuguesa por parte do bisavô. Seus pais e seus 5 irmãos não apresentam sinal de DP, entretanto uma de suas irmãs mais velhas foi diagnosticada com doença de Alzheimer. O paciente PAR2080 é natural do Rio de Janeiro e também relatou possuir ascendência portuguesa por parte dos avós paternos.

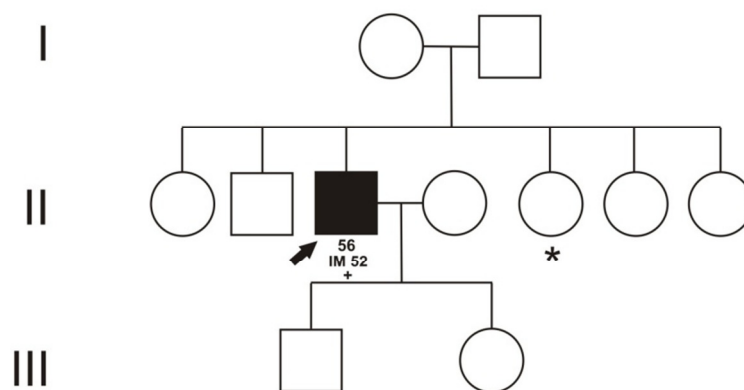


Figura 19 - Heredograma da família do paciente PAR1156 (seta). IM, idade de manifestação da DP; +, indivíduo positivo para a alteração *RecNciI*; *, irmã diagnosticada com Doença de Alzheimer.

A paciente PAR2257, heterozigota para a mutação L444P, também possui a alteração E326K em heterozigose (item 3.2.4).

Ainda no exon 10 a alteração A456P (c.1483G>C) foi encontrada em outros dois pacientes (1,8%) (PAR1461 e PAR2143) (Figura 20), ambos sendo do sexo masculino, casos esporádicos da doença (apêndices A e B).

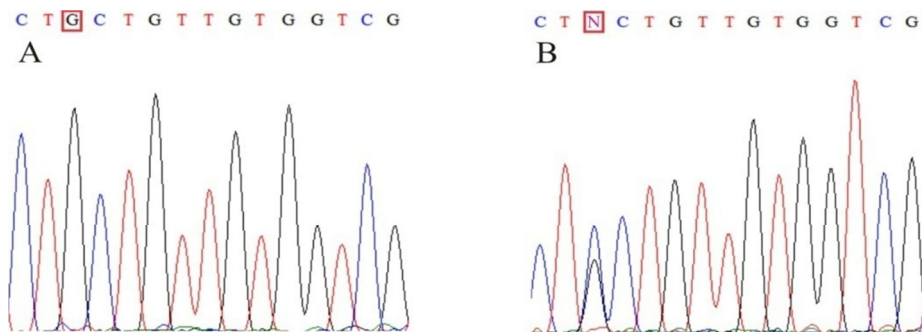


Figura 20 - Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do produto da PCR. A) Sequência selvagem do gene *GBA*. B) Alteração c.1483G>C (A456P).

O paciente PAR1461 apresentou a alteração A456P em heterozigose e, além dessa, também mostrou-se heterozigoto para as alterações K(-)27R e N370S (itens 3.2.1 e 3.2.5 respectivamente).

3.3 Resultados das análises *in silico*

As análises *in silico* feitas através dos programas *PolyPhen*, *Pmut* e *SIFT* estão resumidas na tabela 7. Para estas análises foram utilizadas as alterações *missense*, com valor patogênico desconhecido, identificadas neste estudo.

Tabela 8 – Resultados das análises *in silico* das alterações exônicas

Alteração	Programa PolyPhen	Programa PMut ^a	Programa SIFT ^b
c.38A>G (K(-)27R)	Predição: Benigna	Predição: Neutra <i>NN output</i> : 0,0269 Confiança: 9	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0,71
c.1093G>A (E326K)	Predição: Benigna	Predição: Neutra <i>NN output</i> : 0,2963 Confiança: 4	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0,45
c.1223C>T (T369M)	Predição: Benigna	Predição: Neutra <i>NN output</i> : 0,3664 Confiança: 2	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0,14
c.1251G>C (W378C)	Predição: Provavelmente prejudicial	Predição: Patológica <i>NN output</i> : 0,8299 Confiança: 6	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0,16
c.1483G>C (A456P)	Predição: Benigna	Predição: Patológica <i>NN output</i> : 0,7094 Confiança: 4	Predição: Tolerável <i>Score</i> : 0,21

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

^bA alteração é classificada como deletéria (quando o *score* é menor que 0,05) ou como tolerável.

Além das análises *in silico* feitas para as alterações *missense*, o programa NNSPLICE foi utilizado para avaliar se as alterações intrônicas e silenciosas, com papel patogênico ainda não definido, podem alterar os sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA. Segundo as ferramentas utilizadas, as alterações intrônicas c.454+47G>A, c.589-86A>G e c.1225-34C>A e a alteração silenciosa c.1092G>A (G325G) não afetam o reconhecimento dos sítios doadores e dos sítios receptores de encadeamento selvagens.

3.4 Análise da amostra controle

Para fins comparativos, as mutações N370S, L444P e IVS2+1G>A e as com patogenicidade desconhecida (K(-)27R, E326K, A456P e W378C) identificadas na amostra de pacientes, foram rastreadas numa amostra controle, composta por 152 indivíduos saudáveis

(66 homens e 86 mulheres; faixa etária: 50 a 95 anos; idade média: $61,2 \pm 9,4$ anos) sem sinais de DP ou de qualquer outra doença neurodegenerativa (apêndice D).

A análise desses 152 voluntários saudáveis revelou somente a presença das alterações K(-27)R, E326K e A456P em 10 indivíduos (apêndice D).

3.5 Análise estatística

A frequência de mutações no gene *GBA* com patogenicidade conhecida (N370S, L444P e IVS2+1G>A) encontrada na amostra de pacientes com DP (5,5% ou 7/126) foi significativamente maior do que a frequência observada nos controles saudáveis (0% ou 0/152) ($P=0,0033$).

Parte dos resultados alcançados neste estudo somados aos resultados do trabalho em paralelo da aluna de iniciação científica Ana Carolina Pereira, deram origem a um artigo científico publicado na revista *Parkinsonism and Related disorders* (apêndice E).

4 DISCUSSÃO

Inúmeros estudos têm identificado uma frequência aumentada de mutações no gene *GBA* em pacientes com parkinsonismo sugerindo uma forte associação entre alterações neste gene e a DP, reforçando a ideia de que o *GBA* atua como um fator de risco para o desenvolvimento da doença (Sidransky *et al.*, 2009). No presente estudo, examinamos a possível associação do gene *GBA* com a DP na população brasileira através do sequenciamento completo do gene *GBA*. Foram identificadas 13 variantes em 18 pacientes de nossa casuística (14,3%) (apêndices B e C). Dentre essas, sete variantes de sentido trocado (exons 2, 8, 9 e 10), uma variante intrônica (íntron 2) e uma variante silenciosa (exon 8) (Figura 21). Identificamos outras três variantes intrônicas numa frequência muito alta em pacientes não sendo associada à doença e a variante silenciosa V460V (c.1497G>C) só foi encontrada compondo o alelo recombinante *RecNciI* (Figura 21) (apêndices B e C).

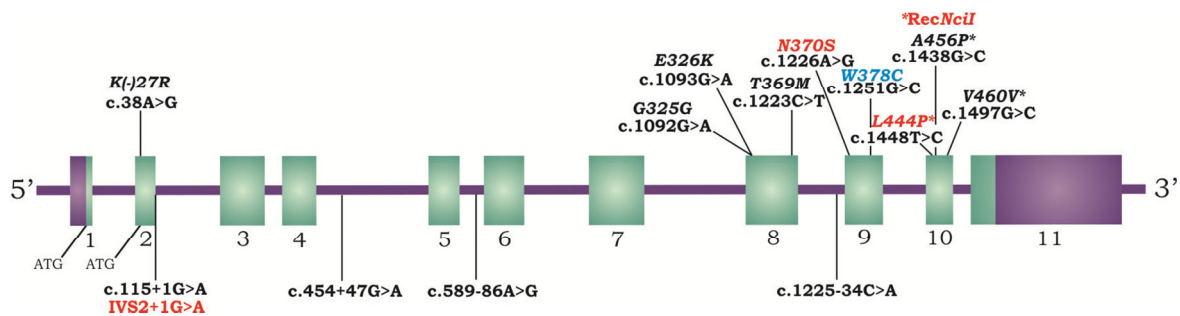


Figura 21 - Representação do gene *GBA* e as alterações identificadas em nosso estudo. Variantes de sentido trocado: c.38A>G (K(-)27R); c.1093G>A (E326K); c.1223C>T (T369M); c.1226A>G (N370S); c.1251G>C (W378C); c.1448T>C (L444P); c.1483G>C (A456P).

Variantes intrônicas: c.115+1G>A (IVS2+1G>A); c.454+47G>A; c.589-86A>G; c.1225-34C>A

Variantes silenciosas: c.1092G>A (G325G); c.1497G>C (V460V)

Representado em itálico as alterações nas proteínas. Em vermelho as alterações comprovadamente patogênicas e em azul a nova alteração encontrada neste estudo.

*Alelo recombinante *RecNciI* (L444P+A456P+V460V).

Dentre as 13 alterações causadas por substituições de nucleotídeos encontradas, três são patogênicas (IVS2+1G>A, N370S e L444P). Essas foram encontradas em 7 pacientes (apêndices B e C), o que representa 5,5% da amostra analisada. Esses resultados, quando comparados à amostra controle normal, na qual nenhuma delas foi identificada, indicam uma frequência significativamente maior dessas mutações nos pacientes com DP em relação aos controles ($P=0,0033$). Além disso, se considerarmos a variante nunca antes descrita pela literatura (W378C) como potencialmente patogênica, essa associação se mantém ($P=0,0014$), e a frequência de mutações patogênicas em nossa casuística sobe para 6,4%, valor muito

semelhante ao encontrado em uma análise completa do gene *GBA* realizada em pacientes portugueses com DP (6,1%) (Bras *et al.*, 2009).

Até o momento, aproximadamente 50 diferentes mutações patogênicas já foram identificadas no gene *GBA* em pacientes com DP, sendo que a frequência e a distribuição destas alterações variam entre as diferentes populações (Sidransky *et al.*, 2009). A frequência de mutações heterozigotas no gene *GBA* varia entre 10,7% a 31,3% em judeus *Ashkenazi* com DP e de 2,3% a 9,4% em pacientes não-*Ashkenazi* (Velayati *et al.*, 2010). Alguns estudos descrevem uma frequência relativamente baixa de mutações no *GBA* comparada às encontradas em pacientes não-*Ashkenazi* (Tan *et al.*, 2007), enquanto outros apresentam resultados estatisticamente insignificantes (Toft *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Essa discrepância pode ser atribuída a mutações específicas rastreadas nos respectivos estudos, e pelo fato de a frequência de mutações no gene *GBA* terem uma variação muito grande entre diferentes grupos étnicos (Gutti *et al.*, 2008). Um recente estudo colaborativo do gene *GBA* envolvendo 16 centros de pesquisa ao redor do mundo mostrou que até 45% dos alelos mutantes identificados nos pacientes não judeus podem não ser detectados através da triagem limitada às alterações N370S e L444P (Sidransky *et al.*, 2009). Além disso, análises baseadas no rastreamento de apenas algumas mutações não conseguem detectar alelos raros (Hruska *et al.*, 2008; Mitsui *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009).

Inúmeros estudos deste gene em pacientes com DP realizaram o sequenciamento completo do gene e muitos enfatizaram a importância desse tipo de análise para corretamente estabelecer a frequência de mutações no *GBA* e para fortalecer o papel das variantes identificadas na susceptibilidade à DP (Lwin *et al.*, 2004; Eblan *et al.*, 2005; Eblan *et al.*, 2006; Goker-Alpan *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007; Gutti *et al.*, 2008; Bras *et al.*, 2009; Kalinderi *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009). Ao realizarem a análise completa do gene *GBA* esses estudos foram capazes de identificar numerosas outras mutações e a frequência total de alterações identificadas variou entre 3,6% e 17,5%.

4.1 Estudos do gene *GBA* em pacientes com DP na população brasileira

O rastreamento de mutações no gene *GBA* em pacientes brasileiros com DP ainda são escassos. Até o momento, apenas três estudos, além do nosso, avaliaram mutações neste gene

como causa da doença em nossa população (Spitz *et al.*, 2008; Socal *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2010).

O primeiro deles foi realizado na cidade de São Paulo por Spitz e colaboradores (2008), no qual foi analisada a presença de três diferentes mutações (N370S, L444P e G377S) em uma amostra de 65 pacientes não aparentados, que manifestaram a DP antes dos 55 anos de idade. Foram identificados 2 probandos (3%) heterozigotos para a mutação L444P (idades de manifestação 46 e 42 anos). Ambos os pacientes portadores de alterações no gene *GBA* eram do sexo masculino e possuíam história familiar da doença, porém os autores afirmaram que não foi possível realizar análises de segregação da mutação, pois os familiares recusaram-se a participar ou não puderam ser contatados. A frequência de alterações encontrada neste estudo foi comparada a um grupo controle composto por 267 indivíduos sem sintomas da DP, nos quais nenhuma alteração foi encontrada, e a diferença foi estatisticamente significativa ($P=0,0379$). Com base nestes dados, este estudo concluiu que mutações no gene *GBA* parecem constituir um raro, porém provável fator hereditário de susceptibilidade para DP no Brasil (Spitz *et al.*, 2008).

Posteriormente, um estudo analisou a presença de quatro diferentes mutações no gene *GBA* (N370S, L444P, IVS2+1G>A e 84GG) em 62 pacientes não aparentados com DP (idade média de manifestação da doença $41,4 \pm 10$ anos), provenientes de Porto Alegre (Socal *et al.*, 2009). Neste estudo foi encontrado um paciente portador heterozigoto da mutação N370S e um paciente heterozigoto para a mutação L444P (idades de manifestação da doença 34 e 40 anos), representando uma frequência de alterações (3,5%) semelhante à frequência observada por Spitz e colaboradores (2008). Os autores concluíram que os resultados eram comparáveis àqueles previamente descritos e confirmaram a taxa de 3% de heterozigose entre pacientes brasileiros com DP (Socal *et al.*, 2009).

Mais recentemente, um estudo realizado por nosso grupo em pacientes com DP (Dos Santos *et al.*, 2010), no qual foi analisada a presença de cinco diferentes mutações no gene *GBA* (N370S, G377S, L444P, 84GG e IVS+1G>A) identificou alterações em 5,4% dos pacientes, frequência esta semelhante à encontrada no atual estudo, considerando-se somente as mutações patogênicas encontradas (5,5%). Com relação a essa diferença, é importante ressaltar que dentro de um país com dimensões continentais, como é o caso do Brasil, a composição populacional varia amplamente entre as diversas regiões e, portanto, não podemos excluir a possibilidade de que as diferentes frequências de mutações identificadas possam ser devido a diversidades regionais presentes em nossa população.

4.2 Alterações identificadas no gene *GBA*

4.2.1 Variantes de sentido trocado identificadas nos exons 2, 8, 9 e 10

A alteração atípica K(-)27R, foi descrita pela primeira vez em um estudo realizado em 40 pacientes brasileiros com DG (Rozenberg *et al.*, 2006b). Essa alteração foi encontrada em três pacientes e oito controles. Ela é decorrente da troca de uma adenina na posição 38 do cDNA por uma guanina (c.38A>G), o que leva a troca de uma lisina (Lys/K) por uma arginina (Arg/R) na sequência líder da proteína GBA. Essa alteração ocorre no peptídeo sinal de 39 resíduos que é removido da proteína madura durante o processamento pós-traducional (Rozenberg *et al.*, 2006b). Mutações na sequência líder não são comumente encontradas em pacientes com DG (Cormand *et al.*, 1998; Rozenberg *et al.*, 2006b).

Pelo fato desta variante alterar um aminoácido do peptídeo sinal, acredita-se que o transporte citoplasmático da glicocerebrosidase possa estar comprometido (Rozenberg *et al.*, 2006b), entretanto, as análises *in silico* através de três ferramentas (Polyphen, Pmut e SIFT) indicaram que esta alteração aparentemente não afeta a estrutura do peptídeo sinal já que esta alteração não é conservada entre as espécies. Além disso, nossas análises identificaram essa alteração numa frequência maior em controles (8/152 = 5,2%) (apêndice D) comparado aos pacientes (3/126 = 2,4%) (apêndice B). Devido à alta frequência identificada nos controles em comparação aos pacientes acreditamos que K(-)27R é um provável polimorfismo.

A variante E326K, resulta da troca de uma guanina na posição 1093 do cDNA por uma adenina (c.1093G>A), o que provoca a mudança do aminoácido glutamina (Glu/E) por uma lisina (Lys/K) na posição 326 da proteína madura (ou na posição 365 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 aminoácidos; p.Glu365Lys) (Beutler *et al.*, 2005; Hruska *et al.*, 2008). Por essa alteração ocorrer em um aminoácido não conservado e ter sido identificado em diversos estudos numa frequência semelhante tanto em pacientes quanto em controles, esta variante tem sido considerada um polimorfismo (Park *et al.*, 2002; Sidransky *et al.*, 2009). Em nosso estudo, esta alteração foi encontrada em heterozigose numa frequência maior em pacientes (4/126) (apêndice B) que em controles (1/152) (apêndice D), entretanto, este resultado não foi estatisticamente significativo (P=0,1771). Além disso, as análises *in silico* através de três ferramentas (Polyphen, Pmut e SIFT) indicaram que esta alteração não altera a atividade proteína.

O resíduo E326 está localizado no domínio I da proteína, porém distante do sítio ativo central, reforçando a teoria de que esta alteração não causa efeitos significativos na atividade enzimática da glicocerebrosidase (Dvir *et al.*, 2003). Entretanto, quando associada a mutações severas, por exemplo, a L444P, ela pode atuar como um alelo modificador de fenótipo sendo considerada uma mutação severa (Montfort *et al.*, 2004; Horowitz *et al.*, 2011). Um dentre os quatro probandos portadores da alteração E326K também apresentou a mutação L444P em heterozigose. Este paciente teve manifestação precoce da doença, aos 38 anos, e relatou história familiar da doença, entretanto, não foi possível o contato com a família.

A alteração T369M é consequência da troca de uma citosina na posição 1223 do cDNA por uma timina (c.1223C>T), o que provoca a mudança do aminoácido treonina (Thr/T) por uma metionina (Met/M) na posição 369 da proteína madura (ou na posição 408 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 aminoácidos; p.Thr408Met) (Hruska *et al.*, 2008). Esta variante, descrita na literatura como um polimorfismo não patogênico em pacientes com DG (Sidransky *et al.*, 2009), foi encontrada em dois pacientes e ausente na amostra controle, entretanto, não apresentou significância estatística (P=0,2002). As análises *in silico* através das ferramentas Polyphen, Pmut e SIFT indicaram que esta alteração não prejudica a atividade proteína.

A mutação N370S, classificada como branda (Beutler *et al.*, 2005), é decorrente da troca da adenina na posição 1226 do cDNA por uma guanina (c.1226A>G), o que leva à mudança do aminoácido asparagina (Asn/N) por uma serina (Ser/S) na posição 370 da proteína madura (ou na posição 409 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 pb; p.Asn409Ser) (Tsuji *et al.*, 1988; Hruska *et al.*, 2008). Estudos da glicocerebrosidase indicam que esta alteração localiza-se na interface dos domínios II e III, porém distante do sítio ativo para participar diretamente na catálise e, portanto, causa mudanças relativamente mínimas na estrutura e na estabilidade da enzima e em sua atividade catalítica, que já foi demonstrada ser similar a da enzima normal (Grace *et al.*, 1994; Pasmanik-Chor *et al.*, 1997; Dvir *et al.*, 2003; Horowitz *et al.*, 2011).

Em nossa casuística a alteração N370S foi identificada em três pacientes, o que corresponde a uma frequência de 2,4%. Comparado aos demais estudos do gene *GBA* realizados em pacientes com DP, esta frequência é semelhante àquelas observadas nos estudos brasileiros realizados em pacientes provenientes de Porto Alegre (1,6%) (Socal *et al.*, 2009) e ao realizado anteriormente por nosso grupo (1,8%) (Dos Santos *et al.*, 2010) e é consistente com a prevalência desta mutação encontrada em Portugal (2,2%) (Bras *et al.*, 2009) e em pacientes de origem não judaica e de descendência européia dos Estados Unidos - 2% (Clark

et al., 2007) e 1,5% (Mata *et al.*, 2008). Estudos conduzidos em séries de pacientes de origem judaica, tanto em Israel quanto nos Estados Unidos, encontraram as maiores frequências da mutação N370S, variando de 10,7% a 26%, enquanto que estudos realizados em séries de probandos de origem não judaica identificaram uma prevalência bem menor desta alteração, variando entre 0%, principalmente nas populações asiáticas (Eblan *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007; Gutti *et al.*, 2008; Spitz *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009) e 8,8% (Lwin *et al.*, 2004).

Um dos pacientes identificados com a mutação N370S em nossa amostra também apresentou as alterações K(-)27R e A456P, porém não foi possível verificar se essas variantes em conjunto alteravam o fenótipo do paciente, bem como não foi possível analisar membros da família do probando.

A alteração W378C, nunca antes descrita pela literatura, foi identificada em um paciente e estava ausente nos 152 controles analisados. Ela é decorrente da troca de uma guanina na posição 1251 do cDNA por uma citosina, levando a uma mudança no aminoácido altamente conservado triptofano (Trp/W) por uma cisteína (Cys/C) na posição 378 da proteína madura (ou na posição 417 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 aminoácidos; p.Trp417Cys). O resíduo W378 está localizado no domínio III que tem um tipo de dobradura altamente conservada (α/β)₈ onde contém o sítio catalítico da glicocerebrosidase (Henrissat & Bairoch, 1996; Fabrega *et al.*, 2002; Dvir *et al.*, 2003). De acordo com Chi e colaboradores (1999), uma cadeia constituída por sete aminoácidos aromáticos (F128, W179, Y244, F246, Y313, **W381** e F397) situados neste domínio forma o arcabouço do sítio ativo da enzima glicocerebrosidase, sugerindo que estes possam estar envolvidos no reconhecimento do substrato (Chi *et al.*, 1999).

Tendo em vista a importância do domínio III e o fato de a alteração W378C estar localizada muito proximamente ao sítio ativo da enzima glicocerebrosidase, acreditamos que esta alteração pode ser patogênica e representar um fator de risco significativo ao desenvolvimento da DP. Além disso, esta mutação estava ausente em indivíduos saudáveis de nossa população e duas ferramentas indicaram que ela pode alterar a estrutura ou a função da proteína. Portanto, a soma das evidências sinaliza que a variante W378C possui uma alta probabilidade de ser patogênica. Contudo, as análises funcionais são importantes para comprovar se esta alteração está definitivamente associada ao desenvolvimento da DP.

A mutação L444P, classificada como severa (Beutler *et al.*, 2005), é consequência da troca da timina na posição 1448 do cDNA por uma citosina (c.1448T>C), o que resulta na troca do aminoácido leucina (Leu/L) por uma prolina (Pro/P) na posição 444 da proteína

madura (ou na posição 483 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 aminoácidos; p.Leu483Pro) (Tsuji *et al.*, 1987; Hruska *et al.*, 2008). Estudos de expressão demonstram que esta alteração, localizada no domínio II da glicocerebrosidase e que provavelmente resulta em mudanças na conformação da proteína, leva à produção de uma enzima com estabilidade significativamente reduzida e com atividade enzimática consideravelmente diminuída em relação à enzima selvagem (Grace *et al.*, 1994; Pasmanik-Chor *et al.*, 1997; Dvir *et al.*, 2003).

Em nossa amostra, a alteração L444P foi identificada em três pacientes (2,4%). Todos os probandos apresentaram, além da mutação L444P, outras alterações exônicas, A456P e V460V correspondentes à sequência do pseudogene, sugerindo a presença do alelo recombinante RecNciI e E326K, que em conjunto com a L444P é classificada como severa (Grace *et al.*, 1999). Estudos da enzima glicocerebrosidase indicam que o alelo recombinante RecNciI, assim como a mutação L444P, leva à produção de uma enzima com estabilidade reduzida e que apresenta atividade enzimática muito baixa quando comparada à enzima normal (Pasmanik-Chor *et al.*, 1997).

Eventos de recombinação entre sequências homólogas do DNA podem gerar mutações patogênicas como resultado do pareamento desigual entre os cromossomos, sendo a frequência com que isso ocorre influenciada pelo grau de homologia entre essas sequências. No gene *GBA* um importante grupo de mutações resulta da recombinação entre este gene e seu pseudogene (Tayebi *et al.*, 2003a), e esta classe de alterações não é restrita ao gene *GBA*. De fato, inúmeros estudos deste gene em pacientes com DP também têm identificado a alteração L444P como parte de alelos recombinantes (Eblan *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Eblan *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Gan-Or *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2008; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009). Nessas análises, a frequência da alteração L444P identificada como parte de alelos recombinantes variou de 0% (Lwin *et al.*, 2004; Toft *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Gutti *et al.*, 2008; Bras *et al.*, 2009; Kalinderi *et al.*, 2009) a 6% (Eblan *et al.*, 2006). Em nossa série de pacientes a frequência observada da mutação L444P como parte de um alelo recombinante foi de 0,9%, semelhante à encontrada por dois estudos conduzidos na população norte americana: 0,7% (Clark *et al.*, 2007) e 1% (Nichols *et al.*, 2009).

A variante A456P, identificada isoladamente em um paciente e um controle, resulta da troca de uma guanina na posição 1483 do cDNA por uma citosina, levando à mudança de uma alanina (Ala/A) por uma prolina (Pro/P) na posição 456 da proteína madura (ou na posição 495 da proteína ainda com o peptídeo sinal de 39 pb; p.Ala495Pro) (Germain *et al.*, 1998; Hruska *et al.*, 2008). Esta alteração isoladamente tem seu valor patogênico desconhecido,

entretanto, quando em associação com outras mutações em alelos recombinantes, como por exemplo *RecNciI* (L444P+A456P+V460V) e o *RecA456P* (L444P+A456P), ela é considerada severa.

4.2.2 Variantes intrônicas identificadas nos íntrons 2, 4, 5 e 8

A mutação intrônica IVS2+1G>A, classificada como nula (Beutler *et al.*, 2005), resulta da mudança de uma guanina por uma adenina no primeiro nucleotídeo do intron 2 do gene *GBA* (c.115+1G>A). Apesar do efeito desta alteração sobre a proteína ainda não ter sido totalmente determinado, foi sugerido que ela destroi o sítio doador de encadeamento no intron 2, o que poderia resultar na remoção do exon 2, ou do exon 2 e parte do exon 3 durante o processamento do RNAm, levando à mudança no quadro de leitura, com consequente formação da enzima glicocerebrosidase truncada e não funcional (Beutler & Gelbart, 1992; He & Grabowski, 1992; Hruska *et al.*, 2008).

Em nossa amostra, foi identificado um paciente com a alteração IVS2+1G>A, representando uma frequência de 0,8%. Esta frequência foi bastante parecida àquelas identificadas em dois outros estudos do gene *GBA* em pacientes com DP, até o momento: 0,95% (Gan-Or *et al.*, 2008) e 0,9% (Dos Santos *et al.*, 2010).

Além da mutação IVS2+1G>A, foram identificadas as alterações c.454+47G>A, c.589-86A>G e c.1225-34C>A, nos íntrons 4, 5 e 8 respectivamente. Essas variantes estão descritas no banco de SNPs, entretanto, não foram associadas a nenhum tipo de doença. Considerando que todas estas variantes intrônicas parecem não afetar o reconhecimento dos sítios de encadeamento selvagens, segundo as análises realizadas utilizando a ferramenta NNSPLICE, concluímos que estas alterações não são patogênicas.

4.2.3 Variantes silenciosas identificadas nos exons 8 e 10

A alteração silenciosa G325G (c.1092G>A) encontrada no exon 8, foi descrita pela primeira vez por Rozenberg e colaboradores (2006) em pacientes brasileiros com DG (Rozenberg *et al.*, 2006b), entretanto, não existem dados na literatura sobre a presença dessa alteração em pacientes com DP. Em nossa casuística esta variante foi identificada em dois pacientes e em três indivíduos saudáveis. A análise *in silico* através do programa NNSPLICE

revelou que a G325G parece não afetar o reconhecimento dos sítios doadores e dos sítios receptores de encadeamento selvagens.

Outra alteração silenciosa encontrada nos exon 10 foi a V460V (c.1497G>C). Esta variante faz parte do alelo recombinante *RecNciI* e não foi identificada isoladamente em nossa casuística.

Considerando as alterações encontradas descritas acima, observamos que a frequência de mutações em nossa amostra (14,3%) é semelhante à de outros estudos que também analisaram todo o gene *GBA* (Lwin *et al.*, 2004; Eblan *et al.*, 2005; Eblan *et al.*, 2006; Goker-Alpan *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007; Gutti *et al.*, 2008; Bras *et al.*, 2009; Kalinderi *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009). Se tivéssemos analisado somente as mutações mais comuns, N370S e L444P, 54% das alterações não teriam sido detectadas, e não teria sido possível a identificação do alelo recombinante *RecNciI* e da nova variante W378C.

Apesar de a frequência de portadores de mutações no gene *GBA* variar consideravelmente entre populações de diferentes origens geográficas, resultados combinados de um recente estudo colaborativo internacional, no qual foram analisados 5.691 pacientes e 4.898 controles de quatro continentes, indicaram não somente uma associação existente entre o gene *GBA* e a DP, mas também que este achado não é exclusivo de um grupo étnico nem de uma mutação específica (Sidransky *et al.*, 2009). Os autores afirmam que a alta frequência de mutações em coortes heterogêneos e etnicamente diversos de pacientes com DP tornam as mutações neste gene o fator de risco genético mais comum para esta desordem identificado até o momento (Sidransky *et al.*, 2009).

A conclusão do presente estudo reforça os dados analisados por Sidransky e colaboradores (2009) destacando uma importante associação entre mutações no gene *GBA* e o risco de desenvolvimento da DP em nossa população. Utilizando uma amostra de pacientes com DP da população brasileira identificamos uma frequência considerável de mutações no gene *GBA* e demonstramos que mutações neste gene são significativamente mais comuns em pacientes do que em indivíduos saudáveis. Sendo assim, nossos dados mostram que mutações no *GBA* são um fator risco importante para o desenvolvimento da DP na população brasileira.

4.3 Idades de manifestação e história familiar da DP

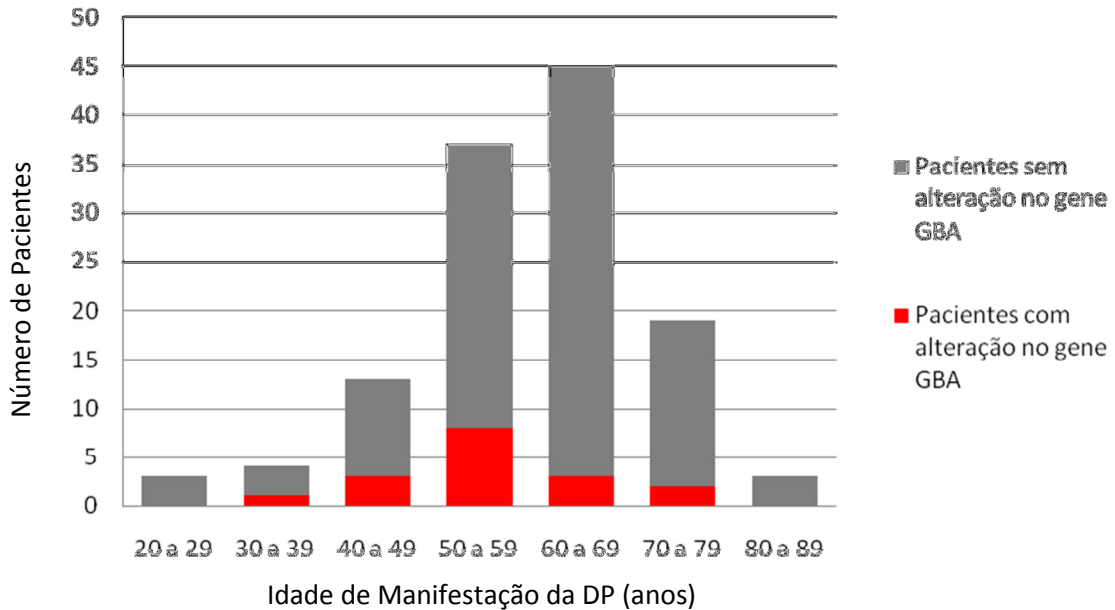
Os primeiros estudos do gene *GBA* em pacientes com DP observaram que a idade de manifestação da doença em indivíduos portadores de mutações neste gene era significativamente menor do que aquela dos pacientes não portadores e que a frequência de alterações era maior nos casos com idade de manifestação ≤ 50 anos quando comparado com os casos de idade de manifestação > 50 anos (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Lwin *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009). Estas observações levaram alguns autores a sugerirem que mutações no gene *GBA* poderiam atuar como modificadores da idade de manifestação em pacientes com DP (Clark *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Kalinderi *et al.*, 2009).

Apesar da maioria dos estudos concordarem que a manifestação da doença ocorre mais cedo (em média, 1,7 a 6,04 anos antes) nos pacientes portadores de alterações (Clark *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009), ainda há controvérsia se este fato ocorreria em todas as faixas etárias, pois já foram identificados pacientes com mutações no gene *GBA* que apresentaram idades de manifestação variando de 26 a 82 anos (Mata *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2009). Clark e colaboradores (2007) observaram que no grupo de pacientes com idade de manifestação ≤ 50 anos a doença se manifestava em média 2,5 anos antes em portadores de mutações quando comparados aos não portadores, o que não foi observado dentre os pacientes com idade de manifestação > 50 anos. Nichols e colaboradores (2009), por outro lado, relataram que dentre os pacientes com idade de manifestação > 50 anos, aqueles com alterações no gene *GBA* manifestavam a doença significativamente mais cedo (61,6 anos) quando comparados com aqueles sem alterações (65,4 anos), mas não observaram diferença no grupo com idade de manifestação < 50 anos (Nichols *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, foram analisados pacientes com idade de manifestação entre 20 e 83 anos e observamos que nos pacientes portadores de alterações no gene *GBA* a idade de manifestação da DP variou entre 38 e 75 anos de idade, sendo mais prevalente entre 50 e 59 anos (Gráfico 2). Além disso, a idade média de manifestação da doença dos pacientes portadores de alterações foi acima dos 50 anos e discretamente diferente ($P=0,05$) comparada aos pacientes não portadores de alterações ($55,6 \pm 10,1$ anos *versus* $60,3 \pm 11,6$ anos). Contudo, não podemos deixar de considerar que o número de pacientes identificados com alterações em nossa amostra ainda é limitado e que para tal análise foram consideradas todas as alterações encontradas, inclusive as sem caráter patogênico definido. Portanto, não foi

possível tirar uma conclusão definitiva com relação a influencia de mutações no gene *GBA* sobre a idade de manifestação da DP em nossa população, entretanto, essas alterações parecem ser um fator de risco ao desenvolvimento da DP independente da idade.

Gráfico 2: Distribuição dos pacientes analisados no presente estudo segundo a idade de manifestação da DP.



Ainda com relação à idade de manifestação, diversos autores observaram efeitos diferenciais de mutações brandas *versus* severas, com portadores de alterações classificadas como brandas apresentando uma idade média de manifestação maior do que portadores de mutações classificadas como severas (incluindo mutações nulas) (Gan-Or *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009).

Dentre os pacientes portadores de alterações no gene *GBA* em nossa amostra, três apresentaram a mutação N370S e quatro apresentaram mutações severas (L444P, IVS2+1G>A e RecNciI). Nossos achados corroboram os observados por outros autores pois, a idade média de manifestação dos três pacientes com alterações brandas foi significativamente maior ($64 \pm 4,4$ anos) do que aquela dos portadores de mutações severas ($50,5 \pm 9,1$ anos) ($P=0,03$).

A cerca da presença de história familiar para a DP, alguns estudos do gene *GBA* afirmaram não ter observado nenhuma diferença significativa na frequência de portadores de mutação entre os pacientes com e sem história familiar da doença (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Aharon-Peretz *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; De Marco *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2008). No

entanto, um recente estudo observou que comparados aos pacientes sem mutação, àqueles que possuíam alterações no gene *GBA* eram mais prováveis de apresentarem história familiar positiva da doença (24% dos pacientes com mutação possuíam parentes de primeiro e segundo grau com DP) (Sidransky *et al.*, 2009). Outros estudos recentes, no qual famílias com múltiplas gerações afetadas foram analisadas, também afirmaram que, além de apoiar a associação do gene *GBA* com a DP, seus resultados estendiam a associação para incluir casos familiares da doença, sugerindo que este gene também seria um fator de susceptibilidade para DP familiar (Mitsui *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009). Em nosso estudo, considerando-se somente as variantes comprovadamente patogênicas, encontramos uma frequência de mutações semelhante entre os casos familiares (4,1% - 1/24) quando comparada à incidência entre os casos isolados da DP (5,9% - 6/102), corroborando a possibilidade de que o gene *GBA* contribui para uma parcela considerável tanto dos casos esporádicos quanto familiares da DP.

Levando-se em consideração todas as alterações encontradas, 15,7% dos casos isolados e 8,3% dos casos familiares apresentaram variantes no gene *GBA*. Apesar de algumas dessas alterações ainda não terem tido seu papel patogênico elucidado na literatura, é de extrema importância a realização de estudos de segregação nas famílias desses pacientes para que possamos avaliar a penetrância das alterações identificadas e contribuir para, futuramente, determinar o risco de se desenvolver a DP devido a alterações específicas no gene *GBA*. Além de análises de segregação, é necessária também a realização de estudos funcionais que abordem as implicações biológicas das mutações no processo patofisiológico da DP. Somente assim será possível elucidar o papel de diferentes variantes no gene *GBA* para a patogênese desta desordem e determinar os mecanismos que contribuem para a associação de mutações neste gene como um fator de risco para o parkinsonismo (Clark *et al.*, 2007; Goker-Alpan *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2009; Sidransky *et al.*, 2009). Entender como alterações no gene *GBA* influenciam a susceptibilidade para a DP e avaliar se existem aspectos fenotípicos específicos em portadores de mutações será outro importante avanço para o conhecimento desta desordem (De Marco *et al.*, 2008; Nishioka *et al.*, 2009), além de oferecer possibilidades futuras para diagnóstico, prognóstico, estratégias terapêuticas e aconselhamento genético, podendo, até mesmo, tornar-se um recurso importante na prevenção da DP em indivíduos que apresentem genótipos de susceptibilidade.

Os resultados alcançados neste estudo corroboram a associação do gene *GBA* com a DP na população brasileira, tendo sido demonstrado que mutações neste gene são identificadas em pacientes com DP com uma frequência acima da esperada e

significativamente mais alta do que aquela encontrada em um grupo de indivíduos saudáveis. Além disso, demonstramos a importância do sequenciamento completo do gene *GBA* para estimar mais precisamente a frequência de mutações e identificar variantes raras nesse gene. Sendo assim, nossos resultados estão em concordância com os resultados de estudos de triagem de mutações do gene *GBA* realizados anteriormente, tanto no Brasil quanto em outras populações, e apóiam a hipótese de que alterações no *GBA* representam um fator significativo de susceptibilidade para o desenvolvimento da DP.

5 CONCLUSÕES

- O rastreamento de mutações no gene *GBA* em 126 pacientes com DP idiopática que manifestaram a doença com idade entre 20 e 83 anos revelou a presença de treze alterações diferentes em 18 pacientes (14,3%). Sete desses apresentavam mutações comprovadamente patogênicas (L444P, N370S, IVS2+1G>A e *RecNciI*) representando um total de 5,5% dos pacientes analisados. Além disso, esse rastreamento revelou uma nova mutação, W378C, classificada pelas ferramentas eletrônicas como potencialmente patogênica.
- A análise de uma amostra controle, composta por 152 indivíduos saudáveis revelou somente a presença das alterações K(-)27R, E326K e A456P. As mutações comprovadamente patogênicas e a nova alteração identificada em nosso estudo não foram encontradas na amostra controle, e a comparação desses resultados com àqueles obtidos para os pacientes, demonstrou que essas mutações no gene *GBA* são significativamente mais comuns nos pacientes com DP do que em controles neurologicamente saudáveis ($P=0,0033$).
- Permanece de extrema importância a realização de análises de segregação das mutações identificadas nas famílias dos pacientes, de forma a avaliar a penetrância destas mutações, bem como a realização de estudos funcionais que abordem as implicações biológicas das mutações no processo patofisiológico da DP, a fim de verificar a real influência dessas alterações no desenvolvimento da doença em nossa população.
- Nossos resultados reforçam a associação entre o gene *GBA* e a DP, e confirmam o papel significativo de alterações neste gene como fator de risco hereditário para o desenvolvimento desta doença na população brasileira.

REFERÊNCIAS

Abou-Sleiman P M, Healy D G, Quinn N, *et al.* The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003, 54: 283-286.

Abou-Sleiman P M, Muqit M M, Mcdonald N Q, *et al.* A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 2006, 60: 414-419.

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.

Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004, 351: 1972-1977.

Alnemri E S. HtrA2 and Parkinson's disease: think PINK? *Nat Cell Biol* 2007, 9: 1227-1229.

Alves G, Forsaa E B, Pedersen K F, *et al.* Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 2008, 255 Suppl 5: 18-32.

Andrade L a F, Barbosa E R, Cardoso F, *et al.* Doença de Parkinson, estratégias atuais de tratamento. 1ª ed. ed. São Paulo: Omnifarma; 2010. 2010.

Balducci C, Pierguidi L, Persichetti E, *et al.* Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007, 22: 1481-1484.

Barbosa M T, Caramelli P, Maia D P, *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). *Mov Disord* 2006, 21: 800-808.

Barneveld R A, Keijzer W, Tegelaers F P, *et al.* Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet* 1983, 64: 227-231.

Bekris L M, Mata I F, Zabetian C P. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010, 23: 228-242.

Belin a C, Westerlund M. Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J* 2008, 275: 1377-1383.

Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, *et al.* Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology* 2003, 61: 99-101.

Beutler E. Gaucher disease. *Adv Genet* 1995, 32: 17-49.

Beutler E, Gelbart T. Mutation analysis in Gaucher disease. *Am J Med Genet* 1992, 44: 389-390.

Beutler E, Gelbart T. Glucocerebrosidase (Gaucher disease). *Hum Mutat* 1996, 8: 207-213.

- Beutler E, Gelbart T, Scott C R. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2005, 35: 355-364.
- Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, *et al.* Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol* 2008, 255 Suppl 5: 8-17.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, *et al.* DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 2003, 24: 159-160.
- Brady R O, Kanfer J N, Bradley R M, *et al.* Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase-cleaving enzyme in Gaucher's disease. *J Clin Invest* 1966, 45: 1112-1115.
- Bras J, Paisan-Ruiz C, Guerreiro R, *et al.* Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiol Aging* 2009, 30: 1515-1517.
- Bras J, Singleton A, Cookson M R, *et al.* Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS J* 2008, 275: 5767-5773.
- Bras J M, Singleton A. Genetic susceptibility in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1792: 597-603.
- Bussell R, Jr., Eliezer D. Effects of Parkinson's disease-linked mutations on the structure of lipid-associated alpha-synuclein. *Biochemistry* 2004, 43: 4810-4818.
- Butters T D. Gaucher disease. *Curr Opin Chem Biol* 2007, 11: 412-418.
- Chi Y I, Martinez-Cruz L A, Jancarik J, *et al.* Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS Lett* 1999, 445: 375-383.
- Clark L N, Ross B M, Wang Y, *et al.* Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007, 69: 1270-1277.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, *et al.* Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 1998, 11: 295-305.
- Cuervo a M, Stefanis L, Fredenburg R, *et al.* Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004, 305: 1292-1295.
- Cullen V, Sardi S P, Ng J, *et al.* Acid beta-glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter alpha-synuclein processing. *Ann Neurol* 2011, 69: 940-953.
- Dale G L, Villacorte D G, Beutler E. Solubilization of glucocerebrosidase from human placenta and demonstration of a phospholipid requirement for its catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1976, 71: 1048-1053.

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

Davidson W S, Jonas A, Clayton D F, *et al.* Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998, 273: 9443-9449.

De Fost M, Aerts J M , Hollak C E. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth J Med* 2003, 61: 3-8.

De Lau L M, Koudstaal P J, Hofman A, *et al.* Subjective complaints precede Parkinson disease: the rotterdam study. *Arch Neurol* 2006, 63: 362-365.

De Marco E V, Annesi G, Tarantino P, *et al.* Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. *Mov Disord* 2008, 23: 460-463.

Depaolo J, Goker-Alpan O, Samaddar T, *et al.* The association between mutations in the lysosomal protein glucocerebrosidase and parkinsonism. *Mov Disord* 2009, 24: 1571-1578.

Di Fonzo A, Chien H F, Socal M, *et al.* ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007, 68: 1557-1562.

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

Dinur T, Osiecki K M, Legler G, *et al.* Human acid beta-glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83: 1660-1664.

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

Dos Santos a V, Pestana C P, Diniz K R, *et al.* Mutational analysis of GIGYF2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010, 485: 121-124.

Dvir H, Harel M, Mccarthy a A, *et al.* X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 2003, 4: 704-709.

Eblan M J, Nguyen J, Ziegler S G, *et al.* Glucocerebrosidase mutations are also found in subjects with early-onset parkinsonism from Venezuela. *Mov Disord* 2006, 21: 282-283.

Eblan M J, Walker J M , Sidransky E. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2005, 352: 728-731; author reply 728-731.

Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, *et al.* Gaucher's disease. *Lancet* 2001, 358: 324-327.

Eyal N, Wilder S , Horowitz M. Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene* 1990, 96: 277-283.

Fabrega S, Durand P, Mornon J P, *et al.* [The active site of human glucocerebrosidase: structural predictions and experimental validations]. *J Soc Biol* 2002, 196: 151-160.

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

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

Feany M B. New genetic insights into Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004, 351: 1937-1940.

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

Forno L S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996, 55: 259-272.

Gan-or Z, Giladi N, Orr-Urtreger A. Differential phenotype in Parkinson's disease patients with severe versus mild GBA mutations. *Brain* 2009, 132: e125.

Gan-or Z, Giladi N, Rozovski U, *et al.* Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology* 2008, 70: 2277-2283.

Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, *et al.* PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 2009, 33: 627-638.

Germain D P, Puech J P, Caillaud C, *et al.* Exhaustive screening of the acid beta-glucosidase gene, by fluorescence-assisted mismatch analysis using universal primers: mutation profile and genotype/phenotype correlations in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 1998, 63: 415-427.

Gilks W P, Abou-Sleiman P M, Gandhi S, *et al.* A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005, 365: 415-416.

Gloeckner C J, Kinkl N, Schumacher A, *et al.* The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 2006, 15: 223-232.

Goker-Alpan O, Giasson B I, Eblan M J, *et al.* Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. *Neurology* 2006, 67: 908-910.

Goker-Alpan O, Lopez G, Vithayathil J, *et al.* The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol* 2008, 65: 1353-1357.

Goker-Alpan O, Schiffmann R, Lamarca M E, *et al.* Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet* 2004, 41: 937-940.

Gosal D, Ross O A , Toft M. Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur J Neurol* 2006, 13: 616-627.

Grabowski G A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 2008, 372: 1263-1271.

Grabowski G A , Horowitz M. Gaucher's disease: molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillieres Clin Haematol* 1997, 10: 635-656.

Grace M E, Ashton-Prolla P, Pastores G M, *et al.* Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 gaucher disease. *J Clin Invest* 1999, 103: 817-823.

Grace M E, Newman K M, Scheinker V, *et al.* Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* 1994, 269: 2283-2291.

Graves P N, Grabowski G A, Eisner R, *et al.* Gaucher disease type 1: cloning and characterization of a cDNA encoding acid beta-glucosidase from an Ashkenazi Jewish patient. *DNA* 1988, 7: 521-528.

Guggenbuhl P, Grosbois B , Chales G. Gaucher disease. *Joint Bone Spine* 2008, 75: 116-124.

Gutti U, Fung H C, Hruska K S, *et al.* The need for appropriate genotyping strategies for glucocerebrosidase mutations in cohorts with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2008, 65: 850-851; author reply 851.

Halperin A, Elstein D , Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2006, 36: 426-428.

Hannun Y A , Bell R M. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. *Science* 1987, 235: 670-674.

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

He G S , Grabowski G A. Gaucher disease: A G+1----A+1 IVS2 splice donor site mutation causing exon 2 skipping in the acid beta-glucosidase mRNA. *Am J Hum Genet* 1992, 51: 810-820.

Henrissat B , Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 1996, 316 (Pt 2): 695-696.

Ho M S, Ou C, Chan Y R, *et al.* The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65: 1977-2000.

Hong C M, Ohashi T, Yu X J, *et al.* Sequence of two alleles responsible for Gaucher disease. *DNA Cell Biol* 1990, 9: 233-241.

- Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Ron I, *et al.* The enigma of the E326K mutation in acid beta-glucocerebrosidase. *Mol Genet Metab* 2011, 104: 35-38.
- Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, *et al.* The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics* 1989, 4: 87-96.
- Hruska K S, Goker-Alpan O, Sidransky E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *J Biomed Biotechnol* 2006, 2006: 78549.
- Hruska K S, Lamarca M E, Scott C R, *et al.* Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* 2008, 29: 567-583.
- Hughes a J, Ben-Shlomo Y, Daniel S E, *et al.* What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. 1992. *Neurology* 2001, 57: S34-38.
- Imai K, Nakamura M, Yamada M, *et al.* A novel transcript from a pseudogene for human glucocerebrosidase in non-Gaucher disease cells. *Gene* 1993, 136: 365-368.
- Jo E, McLaurin J, Yip C M, *et al.* alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J Biol Chem* 2000, 275: 34328-34334.
- Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Paisan-Ruiz C, *et al.* Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett* 2009, 452: 87-89.
- 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, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2007, 20: 453-464.
- Koprivica V, Stone D L, Park J K, *et al.* Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 1777-1786.
- Kraoua I, Stirnemann J, Ribeiro M J, *et al.* Parkinsonism in Gaucher's disease type 1: ten new cases and a review of the literature. *Mov Disord* 2009, 24: 1524-1530.
- Latham T, Grabowski G A, Theophilus B D, *et al.* Complex alleles of the acid beta-glucosidase gene in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 1990, 47: 79-86.
- Latham T E, Theophilus B D, Grabowski G A, *et al.* Heterogeneity of mutations in the acid beta-glucosidase gene of Gaucher disease patients. *DNA Cell Biol* 1991, 10: 15-21.
- Lautier C, Goldwurm S, Durr A, *et al.* Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2008, 82: 822-833.
- Lee H J, Khoshaghideh F, Patel S, *et al.* Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci* 2004, 24: 1888-1896.

- Leroy E, Boyer R, Auburger G, *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998, 395: 451-452.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009, 18: R48-59.
- Lin T K, Liou C W, Chen S D, *et al.* Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J* 2009, 32: 589-599.
- Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab* 2004, 81: 70-73.
- Machaczka M, Rucinska M, Skotnicki a B, *et al.* Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. *Am J Hematol* 1999, 61: 216-217.
- Martin E R, Scott W K, Nance M A, *et al.* Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 2001, 286: 2245-2250.
- Martinez-Arias R, Calafell F, Mateu E, *et al.* Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Res* 2001, 11: 1071-1085.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, *et al.* Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 2008, 118: 777-788.
- Mata I F, Samii A, Schneer S H, *et al.* Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. *Arch Neurol* 2008, 65: 379-382.
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, *et al.* Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 588-596.
- Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman a H. Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[14C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *Biochem J* 1994, 303 (Pt 2): 377-382.
- Michelin K, Wajner A, De Souza F T, *et al.* Application of a comprehensive protocol for the identification of Gaucher disease in Brazil. *Am J Med Genet A* 2005, 136: 58-62.
- Mistry P K, Cox T M. The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of a lysosomal enzyme. *J Med Genet* 1993, 30: 889-894.
- Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, *et al.* Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009, 66: 571-576.
- Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, *et al.* Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat* 2004, 23: 567-575.

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, *et al.* Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 1996, 89: 691-694.

Neumann J, Bras J, Deas E, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009, 132: 1783-1794.

Ng P C, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003, 31: 3812-3814.

Nichols W C, Pankratz N, Marek D K, *et al.* Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 2009, 72: 310-316.

Nishioka K, Vilarino-Guell C, Cobb S A, *et al.* Glucocerebrosidase mutations are not a common risk factor for Parkinson disease in North Africa. *Neurosci Lett* 2009, 477: 57-60.

Nussbaum R L, Ellis C E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003, 348: 1356-1364.

Paisan-Ruiz C, Bhatia K P, Li A, *et al.* Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009, 65: 19-23.

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

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, Nichols W C, Uniacke S K, *et al.* Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003a, 12: 2599-2608.

Pankratz N, Nichols W C, Uniacke S K, *et al.* Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet* 2002, 71: 124-135.

Pankratz N, Nichols W C, Uniacke S K, *et al.* Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* 2003b, 72: 1053-1057.

Park J K, Tayebi N, Stubblefield B K, *et al.* The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet* 2002, 61: 32-34.

Pasmanik-Chor M, Elroy-Stein O, Aerts H, *et al.* Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochem J* 1996, 317 (Pt 1): 81-88.

Pasmanik-Chor M, Madar-Shapiro L, Stein E O, *et al.* Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 887-895.

Polymeropoulos M H, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997, 276: 2045-2047.

Rajawat Y S , Bossis I. Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *Hormones (Athens)* 2008, 7: 46-61.

Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006, 38: 1184-1191.

Reiner O , Horowitz M. Differential expression of the human glucocerebrosidase-coding gene. *Gene* 1988, 73: 469-478.

Reiner O, Wigderson M , Horowitz M. Structural analysis of the human glucocerebrosidase genes. *DNA* 1988, 7: 107-116.

Reiner O, Wilder S, Givol D, *et al.* Efficient in vitro and in vivo expression of human glucocerebrosidase cDNA. *DNA* 1987, 6: 101-108.

Rodriguez-Oroz M C, Lage P M, Sanchez-Mut J, *et al.* Homocysteine and cognitive impairment in Parkinson's disease: a biochemical, neuroimaging, and genetic study. *Mov Disord* 2009, 24: 1437-1444.

Rozenberg R, Araujo F T, Fox D C, *et al.* High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. *Braz J Med Biol Res* 2006a, 39: 1171-1179.

Rozenberg R, Fox D C, Sobreira E, *et al.* Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis* 2006b, 37: 204-209.

Sarmientos F, Schwarzmann G , Sandhoff K. Specificity of human glucosylceramide beta-glucosidase towards synthetic glucosylsphingolipids inserted into liposomes. Kinetic studies in a detergent-free assay system. *Eur J Biochem* 1986, 160: 527-535.

Sato C, Morgan A, Lang a E, *et al.* Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005, 20: 367-370.

Schapira a H. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurol Clin* 2009, 27: 583-603, v.

Scherzer C R , Feany M B. Yeast genetics targets lipids in Parkinson's disease. *Trends Genet* 2004, 20: 273-277.

Schlossmacher M G, Cullen V , Muthing J. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2005, 352: 728-731; author reply 728-731.

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

Shafit-Zagardo B, Devine E A, Smith M, *et al.* Assignment of the gene for acid beta-glucosidase to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1981, 33: 564-575.

Shojaee S, Sina F, Banihosseini S S, *et al.* Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 2008, 82: 1375-1384.

Shulman J M, De Jager P L, Feany M B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2011, 6: 193-222.

Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab* 2004, 83: 6-15.

Sidransky E. Gaucher disease and parkinsonism. *Mol Genet Metab* 2005, 84: 302-304.

Sidransky E. Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for complex disease. *Clin Genet* 2006, 70: 275-282.

Sidransky E, Nalls M A, Aasly J O, *et al.* Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009, 361: 1651-1661.

Sidransky E, Tsuji S, Stubblefield B K, *et al.* Gaucher patients with oculomotor abnormalities do not have a unique genotype. *Clin Genet* 1992, 41: 1-5.

Singleton a B. Altered alpha-synuclein homeostasis causing Parkinson's disease: the potential roles of dardarin. *Trends Neurosci* 2005, 28: 416-421.

Singleton a B, Farrer M, Johnson J, *et al.* alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003, 302: 841.

Smith W W, Pei Z, Jiang H, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102: 18676-18681.

Socal M P, Bock H, Michelin-Tirelli K, *et al.* Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians. *Parkinsonism Relat Disord* 2009, 15: 76-78.

Sorge J, Gross E, West C, *et al.* High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J Clin Invest* 1990, 86: 1137-1141.

Sorge J, West C, Westwood B, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82: 7289-7293.

Sorge J A, West C, Kuhl W, *et al.* The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet* 1987, 41: 1016-1024.

Spitz M, Rozenberg R, Pereira Lda V, *et al.* Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Relat Disord* 2008, 14: 58-62.

Strauss K M, Martins L M, Plun-Favreau H, *et al.* Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005, 14: 2099-2111.

Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, *et al.* Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 2001, 10: 591-597.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001, 8: 613-621.

Tan E K, Tong J, Fook-Chong S, *et al.* Glucocerebrosidase mutations and risk of Parkinson disease in Chinese patients. *Arch Neurol* 2007, 64: 1056-1058.

Tayebi N, Callahan M, Madike V, *et al.* Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab* 2001, 73: 313-321.

Tayebi N, Stubblefield B K, Park J K, *et al.* Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2003a, 72: 519-534.

Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, *et al.* Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* 2003b, 79: 104-109.

Thomas B, Beal M F. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007, 16 Spec No. 2: R183-194.

Toft M, Pielsticker L, Ross O A, *et al.* Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology* 2006, 66: 415-417.

Tsuji S, Choudary P V, Martin B M, *et al.* A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1987, 316: 570-575.

Tsuji S, Martin B M, Barranger J A, *et al.* Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85: 2349-2352.

Uversky V N, E M C, Bower K S, *et al.* Accelerated alpha-synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Lett* 2002, 515: 99-103.

Vaccaro a M, Tatti M, Ciaffoni F, *et al.* Factors affecting the binding of glucosylceramidase to its natural substrate dispersion. *Enzyme* 1989, 42: 87-97.

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

Varkonyi J, Rosenbaum H, Baumann N, *et al.* Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. *Am J Med Genet A* 2003, 116A: 348-351.

Velayati A, Yu W H , Sidransky E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010, 10: 190-198.

Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, *et al.* Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008, 283: 23542-23556.

Wafaei J R , Choy F Y. Glucocerebrosidase recombinant allele: molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells Mol Dis* 2005, 35: 277-285.

Webb J L, Ravikumar B, Atkins J, *et al.* Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003, 278: 25009-25013.

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

Westbroek W, Gustafson a M , Sidransky E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Trends Mol Med* 2011, 17: 485-493.

Wigderson M, Firon N, Horowitz Z, *et al.* Characterization of mutations in Gaucher patients by cDNA cloning. *Am J Hum Genet* 1989, 44: 365-377.

Winfield S L, Tayebi N, Martin B M, *et al.* Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. *Genome Res* 1997, 7: 1020-1026.

Wong K, Sidransky E, Verma A, *et al.* Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2004, 82: 192-207.

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

Wu Y R, Chen C M, Chao C Y, *et al.* Glucocerebrosidase gene mutation is a risk factor for early onset of Parkinson disease among Taiwanese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007, 78: 977-979.

Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, *et al.* alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis. *Autophagy* 2008, 4: 917-919.

Zhu M, Li J , Fink a L. The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *J Biol Chem* 2003, 278: 40186-40197.

Ziegler S G, Eblan M J, Gutti U, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol Genet Metab* 2007, 91: 195-200.

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

Zimran A, Sorge J, Gross E, *et al.* A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *J Clin Invest* 1990, 85: 219-222.

APÊNDICE A – Características dos pacientes analisados: idade, idade de manifestação, caso familiar ou isolado e sexo

Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/I	Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/I
1	PAR1142	64	55	M	I	52	PAR1625	78	60	M	I
2	PAR1143	68	63	F	I	53	PAR1635	60	60	M	F
3	PAR1144	69	65	M	F	54	PAR1637	60	56	F	I
4	PAR1146	79	73	M	I	55	PAR1645	80	64	F	I
5	PAR1149	65	64	F	I	56	PAR1647	71	68	F	I
6	PAR1154	70	66	M	I	57	PAR1648	61	56	M	F
7	PAR1156	56	52	M	I	58	PAR1660	67	57	F	I
8	PAR1164	64	57	M	I	59	PAR1662	54	51	M	I
9	PAR1168	66	62	M	I	60	PAR1666	87	78	F	F
10	PAR1169	74	71	M	I	61	PAR1696	68	58	M	I
11	PAR1171	65	55	M	I	62	PAR1698	65	55	M	I
12	PAR1172	74	61	F	I	63	PAR1699	88	68	M	I
13	PAR1174	55	54	F	F	64	PAR1702	67	54	M	F
14	PAR1175	75	71	M	I	65	PAR2037	58	58	M	F
15	PAR1177	77	55	M	I	66	PAR2039	70	60	F	F
16	PAR1184	69	66	M	I	67	PAR2040	84	77	F	I
17	PAR1190	55	54	F	I	68	PAR2041	74	64	F	I
18	PAR1191	72	60	M	I	69	PAR2042	79	76	F	I
19	PAR1193	72	68	F	I	70	PAR2043	71	69	M	F
20	PAR1194	72	67	F	I	71	PAR2045	70	69	M	I
21	PAR1195	79	60	F	I	72	PAR2057	78	75	M	I
22	PAR1203	74	73	M	F	73	PAR2079	71	66	M	F
23	PAR1208	63	52	F	I	74	PAR2080	63	60	M	I
24	PAR1210	62	57	M	I	75	PAR2082	61	57	M	I
25	PAR1211	57	58	F	I	76	PAR2133	50	40	M	I
26	PAR1219	74	64	M	I	77	PAR2134	56		M	F
27	PAR1220	85	73	M	I	78	PAR2143	58	47	M	I
28	PAR1223	78	74	M	I	79	PAR2145	50	45	M	I
29	PAR1224	65	55	M	I	80	PAR2172	42	29	F	I
30	PAR1230	71	65	M	I	81	PAR2173	67	50	M	I
31	PAR1231	66	56	M	I	82	PAR2219	81	67	F	I
32	PAR1270	73	60	F	F	83	PAR2255	78	73	M	I
33	PAR1280	67	59	M	I	84	PAR2257	42	38	F	F
34	PAR1288	66	59	F	I	85	PAR2258	70	61	F	I
35	PAR1304	65	63	F	I	86	PAR2266	43	42	M	I
36	PAR1315	63	58	F	I	87	PAR2268	52	43	M	F
37	PAR1320	54	51	F	I	88	PAR2269	70	63	M	I
38	PAR1329	71	64	F	I	89	PAR2270	70	69	M	I
39	PAR1344	56	52	M	I	90	PAR2271	68	62	F	F
40	PAR1358	76	60	M	I	91	PAR2278	67	66	F	I
41	PAR1359	59	53	M	I	92	PAR2279	62	54	M	I
42	PAR1366	71	58	F	I	93	PAR2285	49		F	I
43	PAR1376	78	69	M	I	94	PAR2286	79	76	M	F
44	PAR1406	77	69	M	I	95	PAR2291	85	81	F	I
45	PAR1410	82	72	F	I	96	PAR2299	84	77	F	I
46	PAR1427	63	57	M	I	97	PAR2300	56	42	F	I
47	PAR1449	74	70	F	I	98	PAR2301	73	67	F	I
48	PAR1461	71	59	M	I	99	PAR2302	36	34	M	I
49	PAR1504	70	60	F	I	100	PAR2303	34	29	M	I
50	PAR1602	61	59	M	F	101	PAR2304	45	32	M	I
51	PAR1613	86	83	M	I	102	PAR2318	76	65	F	I

N°	Registro	Idade	IM	Sexo	F/I
103	PAR2319	68	66	F	I
104	PAR2320	85	80	F	F
105	PAR2326	71	68	M	I
106	PAR2327	55	53	F	I
107	PAR2335	78	76	M	F
108	PAR2343	64	55	M	I
109	PAR2344	76	61	M	I
110	PAR2345	41	38	M	F
111	PAR2352	41	20	F	I
112	PAR2353	69	67	F	I
113	PAR2354	67	63	F	I
114	PAR2355	54	44	F	I
115	PAR2356	66	58	F	I
116	PAR2357	51	46	M	F
117	PAR2358	64	49	F	F
118	PAR2359	69	67	M	F
119	PAR2360	74	71	M	I
120	PAR2362	50	46	F	I
121	PAR2363	63	42	M	I
122	PAR2364	74	71	M	I
123	PAR2365	67	59	M	I
124	PAR2366	72	72	M	I
125	PAR2367	49	48	M	I
126	PAR2368	51	47	M	I

F/I – Familiar/Isolado

N°	Registro	IM	Exon1	Exon2	Exon3	Exon4	Exon5	Exon6	Exon7	Exon8	Exon9	Exon10	Exon11
96	PAR2299	77	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
97	PAR2300	42	N.	K(-)27R	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
98	PAR2301	67	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
99	PAR2302	34	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
100	PAR2303	29	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
101	PAR2304	32	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
102	PAR2318	65	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
103	PAR2319	66	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
104	PAR2320	80	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
105	PAR2326	68	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
106	PAR2327	53	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
107	PAR2335	76	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
108	PAR2343	55	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
109	PAR2344	61	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
110	PAR2345	38	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
111	PAR2352	20	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
112	PAR2353	67	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N370S	N.	N.
113	PAR2354	63	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
114	PAR2355	44	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
115	PAR2356	58	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
116	PAR2357	46	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
117	PAR2358	49	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
118	PAR2359	67	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
119	PAR2360	71	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
120	PAR2362	46	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
121	PAR2363	42	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
122	PAR2364	71	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
123	PAR2365	59	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
124	PAR2366	72	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
125	PAR2368	48	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
126	PAR2369	47	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.	N.

N. – Normal; - – não foi possível analisar

APÊNDICE C - Resultados da análise molecular dos íntrons analisados do gene *GBA* em pacientes com DP

Nº	Registro	IM	Íntron 2	Íntron 4	Íntron 5	Íntron 8
1	PAR1142	55	-	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
2	PAR1143	63	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
3	PAR1144	65	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
4	PAR1146	73	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
5	PAR1149	64	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
6	PAR1154	66	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
7	PAR1156	52	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
8	PAR1164	57	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
9	PAR1168	62	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
10	PAR1169	71	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
11	PAR1171	55	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
12	PAR1172	61	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
13	PAR1174	54	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
14	PAR1175	71	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
15	PAR1177	55	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
16	PAR1184	66	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
17	PAR1190	54	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
18	PAR1191	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
19	PAR1193	68	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
20	PAR1194	67	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
21	PAR1195	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
22	PAR1203	73	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
23	PAR1208	52	N.	N.	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
24	PAR1210	57	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
25	PAR1211	58	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
26	PAR1219	64	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
27	PAR1220	73	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
28	PAR1223	74	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
29	PAR1224	55	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
30	PAR1230	65	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
31	PAR1231	56	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A

N°	Registro	IM	Íntron 2	Íntron 4	Íntron 5	Íntron 8
32	PAR1270	60	-	N.	N.	c.1225-34C>A
33	PAR1280	59	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
34	PAR1288	59	N.	N.	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
35	PAR1304	63	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
36	PAR1315	58	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
37	PAR1320	51	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
38	PAR1329	64	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
39	PAR1344	52	IVS2+1G>A	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
40	PAR1358	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
41	PAR1359	53	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A
42	PAR1366	58	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A
43	PAR1376	69	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
44	PAR1406	69	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	-
45	PAR1410	72	N.	N.	N.	-
46	PAR1427	57	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
47	PAR1449	70	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
48	PAR1461	59	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
49	PAR1504	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
50	PAR1602	59	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A
51	PAR1613	83	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
52	PAR1625	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
53	PAR1635	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
54	PAR1637	56	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
55	PAR1645	64	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
56	PAR1647	68	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
57	PAR1648	56	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
58	PAR1660	57	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
59	PAR1662	51	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
60	PAR1666	78	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
61	PAR1696	58	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
62	PAR1698	55	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
63	PAR1699	68	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A

N°	Registro	IM	Íntron 2	Íntron 4	Íntron 5	Íntron 8
64	PAR1702	54	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
65	PAR2037	58	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
66	PAR2039	60	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
67	PAR2040	77	N.	N.	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
68	PAR2041	64	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
69	PAR2042	76	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
70	PAR2043	69	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
71	PAR2045	69	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
72	PAR2057	75	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
73	PAR2079	66	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
74	PAR2080	60	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
75	PAR2082	57	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
76	PAR2133	40	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
77	PAR2134		N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
78	PAR2143	47	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A
79	PAR2145	45	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
80	PAR2172	29	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
81	PAR2173	50	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
82	PAR2219	67	N.	c.454+47G>A	N.	-
83	PAR2255	73	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
84	PAR2257	38	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
85	PAR2258	61	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
86	PAR2266	42	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
87	PAR2268	43	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
88	PAR2269	63	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
89	PAR2270	69	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A
90	PAR2271	62	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
91	PAR2278	66	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
92	PAR2279	54	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
93	PAR2285		N.	N.	N.	c.1225-34C>A
94	PAR2286	76	N.	N.	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
95	PAR2291	81	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A

N°	Registro	IM	Íntron 2	Íntron 4	Íntron 5	Íntron 8
96	PAR2299	77	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
97	PAR2300	42	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
98	PAR2301	67	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
99	PAR2302	34	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
100	PAR2303	29	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
101	PAR2304	32	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
102	PAR2318	65	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
103	PAR2319	66	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A
104	PAR2320	80	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
105	PAR2326	68	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
106	PAR2327	53	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
107	PAR2335	76	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
108	PAR2343	55	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
109	PAR2344	61	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
110	PAR2345	38	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
111	PAR2352	20	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
112	PAR2353	67	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
113	PAR2354	63	N.	N.	N.	N.
114	PAR2355	44	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	c.589-86A>G/ c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
115	PAR2356	58	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	-
116	PAR2357	46	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
117	PAR2358	49	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	N.
118	PAR2359	67	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	N.
119	PAR2360	71	N.	c.454+47G>A/ c.454+47G>A	N.	N.
120	PAR2362	46	N.	N.	N.	N.
121	PAR2363	42	N.	N.	N.	c.1225-34C>A
122	PAR2364	71	N.	c.454+47G>A	c.589-86A>G	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
123	PAR2365	59	N.	c.454+47G>A	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
124	PAR2366	72	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
125	PAR2368	48	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A
126	PAR2369	47	N.	N.	N.	c.1225-34C>A/c.1225-34C>A

N. – Normal; - – não foi possível analisar

APÊNDICE D - Resultados da análise molecular do gene *GBA* em indivíduos saudáveis (amostra controle).

Nº	Registro	Idade	Sexo	exon 2/íntron 2	exon 8	exon 9	exon 10
1C	2106	61	M	N.	N.	N.	N.
2C	2107	53	M	N.	N.	N.	N.
3C	2109	54	M	N.	N.	N.	N.
4C	2110	56	M	N.	N.	N.	N.
5C	2111	60	M	N.	N.	N.	N.
6C	2124	59	M	N.	N.	N.	N.
7C	2125	53	M	N.	N.	N.	N.
8C	2132	63	M	N.	N.	N.	N.
9C	2135	55	M	N.	N.	N.	N.
10C	2144	55	M	N.	N.	N.	N.
11C	2146	63	M	N.	N.	N.	N.
12C	2147	58	M	N.	N.	N.	N.
13C	2159	52	F	N.	N.	N.	N.
14C	2160	56	M	N.	N.	N.	N.
15C	2161	57	M	N.	N.	N.	N.
16C	2168	71	F	N.	N.	N.	N.
17C	2169	74	F	N.	N.	N.	N.
18C	2170	72	M	N.	N.	N.	N.
19C	2171	60	M	N.	N.	N.	N.
20C	2174	66	M	N.	N.	N.	N.
21C	2175	68	F	N.	N.	N.	N.
22C	2176	51	F	N.	N.	N.	N.
23C	2179	61	F	N.	G325G	N.	N.
24C	2180	50	F	N.	N.	N.	N.
25C	2181	57	M	N.	N.	N.	N.
26C	2182	82	F	N.	N.	N.	N.
27C	2183	54	M	N.	N.	N.	N.
28C	2184	52	M	N.	N.	N.	N.
29C	2186	51	M	N.	N.	N.	N.
30C	2187	57	M	N.	N.	N.	N.
31C	2188	51	M	N.	N.	N.	N.
32C	2189	56	M	N.	N.	N.	N.
33C	2193	54	M	N.	N.	N.	N.
34C	2195	85	F	N.	N.	N.	N.
35C	2197	58	F	N.	N.	N.	N.
36C	2198	53	F	N.	N.	N.	N.
37C	2199	80	F	N.	N.	N.	N.
38C	2200	64	F	N.	N.	N.	N.
39C	2201	95	F	N.	N.	N.	N.
40C	2202	60	M	N.	N.	N.	N.
41C	2203	73	F	N.	N.	N.	N.
42C	2204	63	F	N.	N.	N.	N.
43C	2205	72	M	N.	N.	N.	N.
44C	2206	52	F	N.	N.	N.	N.
45C	2222	70	F	N.	N.	N.	N.
46C	2223	68	F	N.	N.	N.	N.
47C	2224	50	M	N.	N.	N.	N.
48C	2225	75	F	N.	N.	N.	N.

Nº	Registro	Idade	Sexo	exon 2/íntron 2	Exon 8	Exon 9	Exon 10
49C	2226	79	F	N.	N.	N.	N.
50C	2227	75	F	N.	N.	N.	N.
51C	2233	57	M	N.	N.	N.	N.
52C	2234	58	M	N.	N.	N.	N.
53C	2235	51	M	N.	N.	N.	N.
54C	2236	59	M	N.	N.	N.	N.
55C	2237	53	M	N.	N.	N.	N.
56C	2238	53	M	N.	N.	N.	N.
57C	2239	51	M	N.	N.	N.	N.
58C	2240	56	M	N.	N.	N.	N.
59C	2242	50	F	N.	N.	N.	N.
60C	2243	75	F	N.	N.	N.	N.
61C	2244	58	F	N.	N.	N.	N.
62C	2245	79	M	N.	N.	N.	N.
63C	2247	53	M	N.	N.	N.	N.
64C	2249	58	M	N.	N.	N.	N.
65C	2251	64	F	N.	N.	N.	N.
66C	2252	56	F	N.	N.	N.	N.
67C	2253	61	M	N.	N.	N.	N.
68C	2297	54	M	K(-)27R	N.	N.	N.
69C	2409	52	M	N.	N.	N.	N.
70C	2415	60	M	K(-)27R	N.	N.	N.
71C	2416	77	F	N.	N.	N.	N.
72C	2418	57	M	N.	N.	N.	N.
73C	2422	51	F	N.	N.	N.	N.
74C	2423	61	F	N.	N.	N.	N.
75C	2426	63	F	N.	N.	N.	N.
76C	2431	57	F	N.	N.	N.	N.
77C	2432	71	M	N.	N.	N.	N.
78C	2433	78	M	N.	N.	N.	N.
79C	2434	52	F	N.	N.	N.	N.
80C	2435	68	M	N.	N.	N.	N.
81C	2436	63	F	N.	N.	N.	N.
82C	2437	57	M	N.	N.	N.	N.
83C	2438	58	M	N.	N.	N.	N.
84C	2439	64	F	N.	N.	N.	N.
85C	2441	55	F	N.	N.	N.	N.
86C	2442	68	F	N.	N.	N.	N.
87C	2448	55	M	N.	N.	N.	N.
88C	2450	51	F	N.	N.	N.	N.
89C	2451	52	M	K(-)27R	N.	N.	N.
90C	2452	64	M	N.	E326K	N.	N.
91C	2453	50	F	N.	N.	N.	N.
92C	2454	52	F	N.	N.	N.	N.
93C	2455	79	M	K(-)27R	N.	N.	N.
94C	2456	61	F	K(-)27R	N.	N.	N.
95C	2457	51	M	N.	N.	N.	N.
96C	2458	51	F	N.	N.	N.	N.
97C	2459	66	F	N.	N.	N.	N.
98C	2460	53	F	N.	N.	N.	N.

N°	Registro	Idade	Sexo	exon 2/intron 2	Exon 8	Exon 9	exon 10
99C	2461	50	F	N.	N.	N.	N.
100C	2462	59	F	N.	N.	N.	N.
101C	2463	69	F	N.	N.	N.	N.
102C	2464	64	F	K(-)27R	N.	N.	N.
103C	2465	56	F	N.	N.	N.	N.
104C	2466	52	F	N.	N.	N.	N.
105C	2467	71	F	N.	N.	N.	N.
106C	2468	72	F	N.	N.	N.	N.
107C	2469	79	F	K(-)27R	N.	N.	N.
108C	2470	60	F	N.	N.	N.	N.
109C	2471	65	F	N.	N.	N.	N.
110C	2472	64	F	N.	N.	N.	N.
111C	2473	65	F	N.	N.	N.	N.
112C	2474	52	M	N.	N.	N.	N.
113C	2475	63	M	N.	N.	N.	A456P
114C	2476	84	F	N.	N.	N.	N.
115C	2477	56	M	N.	N.	N.	N.
116C	2478	60	F	N.	N.	N.	N.
117C	2479	54	F	N.	N.	N.	N.
118C	2480	74	F	N.	N.	N.	N.
119C	2481	57	F	N.	N.	N.	N.
120C	2482	60	F	N.	N.	N.	N.
121C	2483	52	F	N.	N.	N.	N.
122C	2484	50	M	N.	N.	N.	N.
123C	2485	63	F	N.	N.	N.	N.
124C	2486	66	F	N.	N.	N.	N.
125C	2488	56	M	N.	G325G	N.	N.
126C	2489	61	F	N.	N.	N.	N.
127C	2490	52	F	N.	N.	N.	N.
128C	2491	63	F	N.	N.	N.	N.
129C	2492	67	M	N.	N.	N.	N.
130C	2493	77	M	N.	G325G	N.	N.
131C	2494	74	M	N.	N.	N.	N.
132C	2495	63	F	N.	N.	N.	N.
133C	2496	56	F	N.	N.	N.	N.
134C	2497	54	M	N.	N.	N.	N.
135C	2502	63	F	N.	N.	N.	N.
136C	2503	52	F	N.	N.	N.	N.
137C	2504	66	F	N.	N.	N.	N.
138C	2505	54	F	N.	N.	N.	N.
139C	2506	58	F	K(-)27R	N.	N.	N.
140C	2507	59	F	N.	N.	N.	N.
141C	2508	57	F	N.	N.	N.	N.
142C	2509	58	F	N.	N.	N.	N.
143C	2510	50	F	N.	N.	N.	N.
144C	2511	58	F	N.	N.	N.	N.
145C	2512	69	M	N.	N.	N.	N.
146C	2513	61	F	N.	N.	N.	N.
147C	2515	59	M	N.	N.	N.	N.
148C	2517	56	F	N.	N.	N.	N.

Nº	Registro	Idade	Sexo	exon 2/íntron 2	Exon 8	Exon 9	exon 10
149C	2518	77	F	N.	N.	N.	N.
150C	2519	52	F	N.	N.	N.	N.
151C	2520	70	M	N.	N.	N.	N.
152C	2522	92	F	N.	N.	N.	N.

N. – Normal

APÊNDICE E – Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients

ARTICLE IN PRESS

Parkinsonism and Related Disorders xxx (2012) 1–2



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Parkinsonism and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parkreldis



Letter to the Editor

Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative movement disorder that has a complex etiology which involves gene-environment interactions. Genetic involvement has been substantiated by the discovery of several disease-causing genes and risk factors. These genetic causes are mainly characterized by mutations within the genes *SNCA*, *LRKK2*, *Parkin*, *DJ1*, *PINK1*, *ATP13A2*, *PLA2G6* and *FBXO7*. The genes *UCHL1*, *GIGYF2*, *HTRA2* and *EIF4G1* may also be associated to PD but their pathogenicity is still unclear. In addition, multiple susceptibility genes have been observed as important genetic factors. Among them, mutations within the *GBA* gene have been proven to be well-established risk factors for PD [1].

Data about the relationship between mutations in *GBA* gene and PD are still scarce in Latin American countries. The purpose of the present study is to extend our initial molecular analysis of *GBA* gene [2] to a greater sample and include late-onset cases of PD, in order to improve the knowledge about the significance of N370S and L444P mutations as genetic risk factors for PD in Brazilian population.

We screened 237 unrelated Brazilian patients diagnosed with PD (Table 1). All probands were recruited from movement disorder clinics of major public hospitals from the Southeast, North and Midwest regions of Brazil. The patients were examined by neurologists specialized in movement disorders, and fulfilled the criteria established for the clinical diagnosis of PD. Cases of secondary and atypical parkinsonism were excluded from the study. Information about family history and ancestry were obtained in a uniform manner through a structured questionnaire. No individual reported Ashkenazi Jewish ancestry. The research protocol was approved by the Institutional Ethics Committee and written informed consent was obtained from all subjects.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood or saliva, and the screening of *GBA* N370S and L444P mutations was performed

by direct sequencing. Mutation frequencies were compared by Fisher's Exact test. The mean age at onset (AAO) of carriers and non-carriers of *GBA* mutations was compared by unpaired *t* test. Eight patients with PD (3.4%) carried either N370S or L444P variants. No mutation was found among the 186 controls analyzed.

In this study, we extend our previous analysis of the N370S and L444P *GBA* mutations in 110 PD patients with early-onset and 155 controls [2] to a greater sample which includes 58 early-onset PD patients, 179 late-onset PD cases and 186 healthy Brazilian volunteers. Overall, 347 probands and 341 controls were analyzed. We identified a significantly increased frequency of mutations (N370S and L444P) in *GBA* gene (13/347 = 3.7%) among PD cases when compared to control subjects (0/341) ($P = 0.0002$) (Table 2).

N370S and L444P mutations have been previously screened and associated with PD by multiple studies. However, their frequency seems to vary, in particular, between ethnicities. N370S was observed to be predominant among Ashkenazi Jews, while L444P seems to be more frequent in non-Ashkenazi patients. In patients from other ethnic groups, the combined frequency of these two mutations was 3% [3].

The frequency identified in our study of Brazilian patients (3.7%) was also similar to the results reported by Spitz et al. (2008) [4] demonstrating a high frequency of N370S and L444P *GBA* mutations (3%) screened in a sample of 65 Brazilian PD patients. In particular, the frequency of *GBA* mutations was 4.1% among 168 patients with early-onset and 3.3% among 179 patients with late-onset PD ($P = 0.78$) (Table 2). When patients with PD were stratified for the presence or absence of familial cases of PD, no significant difference was observed in the frequency of *GBA* mutations between patients with family history (2 out of 81, 2.5%) and those without family history of PD (11 out of 266, 4.1%) ($P = 0.74$). Initial PD manifestations have a tendency to occur at an earlier age in *GBA* mutation carriers, however, in our study the mean AAO of carriers (49.9 ± 11.3 years) did not differ significantly in relation to non-carriers (52.5 ± 13.3 years) ($P = 0.48$).

Based on phenotypic effects of *GBA* mutations in GD, the N370S mutation is classified as mild and L444P mutation as severe. Carriers of mild mutations presented a risk 2.2 times more likely to develop PD and a mean age of manifestation of 57.9 years, when compared with patients without mutations in *GBA* (mean age of manifestation was 60.7 years). On the other hand, patients with mutations classified as severe had a 13.6 times greater risk of developing PD and a mean age of manifestation of 55.7 years [5]. In this study, patients carrying L444P mutation presented an earlier mean age at onset than the N370S carriers (47 ± 9.6 vs. 54.6 ± 13.3) however, without statistical difference ($P = 0.25$).

Table 1
Characteristics of screened subjects and controls.

Group	N	Male (%)	Mean age (SD), y	Mean AAO (SD), y	Family history (%)
PD (total)	237	149 (62.7%)	64.5 (11.4)	57.9 (11.7)	60 (25.3%)
>50 years onset	182	114 (62.6%)	68.7 (8.8)	63.0 (7.9)	43 (23.6%)
≤50 years onset	55	35 (63.6%)	50.5 (6.7)	42.5 (6.2)	17 (30.9%)
Controls	186	51 (27.4%)	60.7 (8.4)	–	–

y: years.
SD: standard deviation.
PD: Parkinson's disease.
AAO: age at onset.

1353-8020/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.parkreldis.2011.11.028

Please cite this article in press as: de Carvalho Guimarães B, et al., Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients, Parkinsonism and Related Disorders (2012), doi:10.1016/j.parkreldis.2011.11.028

ARTICLE IN PRESS

2

Letter to the Editor / Parkinsonism and Related Disorders xxx (2012) 1–2

Table 2

Frequency of GBA mutations in the groups of screened subjects from the present and the previous study [2].

	N (%)	Male (%)	Female (%)	>50 years onset	≤50 years onset	Family history of PD	No family history of PD	Mean age (y)	AAO (y)
Total	347*	223	124	179	168	81	266	60.7 ± 12.5	52.4 ± 13.2
N370S carriers	5 (1.4%)	4 (1.8%)	1 (0.8%)	3 (1.7%)	2 (1.2%)	0 (0%)	5 (1.9%)	62.6 ± 11.8	54.6 ± 13.3
L444P carriers	8 (2.3%)	4 (1.8%)	4 (3.2%)	3 (1.7%)	5 (2.9%)	2 (2.5%)	6 (2.3%)	57.9 ± 10.9	47 ± 9.6
All carriers	13 (3.7%)	8 (3.6%)	5 (4%)	6 (3.3%)	7 (4.1%)	2 (2.5%)	11 (4.1%)	59.7 ± 11	49.9 ± 11.3

y: years.

PD: Parkinson's disease.

AAO: age at onset.

* 110 patients from Ref. [2] and 237 patients from this study.

While the mechanism by which GBA mutations might influence the onset and evolution of parkinsonian symptoms is not yet known, some authors speculate that misfolded glucocerebrosidase might contribute to neurodegeneration by inducing lysosomal dysfunction, by impairing autophagic pathways necessary for degrading α -synuclein, or by overwhelming the ubiquitin-proteasome pathway [3]. Overall, these data implicate the GBA gene as one of the most common and powerful influences on the risk of PD. Furthermore, it suggests that the better understanding about the relationship between GBA mutations and PD could lead to important etiologic insights besides the development of more effective treatments.

Acknowledgments

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, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

References

- [1] Schulte C, Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet* 2011;4:67–80.
- [2] dos Santos AV, Pestana CP, Diniz KRD, Campos M, Abdalla-Carvalho CR, de Rosso ALZ, et al. Mutational analysis of GGFY2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010;485:121–4.
- [3] Velayati A, Yu WH, Sidransky E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010;10:190–8.
- [4] Spitz M, Rozenberg R, Pereira Lda V, Reis Barbosa E. Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:58–62.
- [5] Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, Shifrin C, Rosner S, Gurevich T, et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology* 2008;70:2277–83.

Beatriz de Carvalho Guimarães¹, Ana Carolina Valente Pereira¹,
Fabiola da Costa Rodrigues, Adriana Vaz dos Santos,
Mário Campos Júnior, Jussara Mendonça dos Santos,
Flávia Lima dos Santos
Serviço de Genética Humana, Departamento de Genética,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Ana Lúcia Zuma de Rosso
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Denise Hack Nicaretta
Universidade Gama Filho, Rio de Janeiro, Brazil

João Santos Pereira
Faculdade de Ciências Médicas, Centro Biomédico,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Delson José da Silva
Núcleo de Neurociências, Hospital das Clínicas, Universidade Federal
de Goiás, Brazil

Instituto Integrado de Neurociências, Goiás, Brazil

Marcus Vinicius Della Coletta
Hospital Universitário Getúlio Vargas,
Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brazil

Cíntia Barros Santos-Rebouças, Márcia Mattos Gonçalves Pimentel*
Serviço de Genética Humana, Departamento de Genética,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author. Department of Genetics,
Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes,
State University of Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524,
PHIC Sala 501F, Rio de Janeiro, Brazil.
Tel.: +55 21 2334 0039.
E-mail address: pimentel@uerj.br (M.M. Gonçalves Pimentel)

12 July 2011

¹ These authors contributed equally to this work.

ANEXO A – Termo de consentimento para pacientes com DP



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* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros
Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

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

NOME DO 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* e *GIGYF2* em pacientes brasileiros", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações nestes genes em pacientes com doença de Parkinson e determinar se estas alterações são causa da doença.

Os resultados dessa pesquisa poderão abrir novas perspectivas para a identificação de causas genéticas, recentemente identificadas, associadas com esta patologia. 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 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 500
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 / 2334.0499- Fax (021) 2334.0309
Email: pimentel@uerj.br
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas
Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3020, bloco E, 3o andar, Maracanã - Rio de Janeiro, RJ, e-mail: etica@uerj.br

ANEXO B - Termo de consentimento para controles sem DP



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

TERMO DE CONSENTIMENTO DA AMOSTRA CONTROLE

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

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

NOME DO PARTICIPANTE: _____ DN: _____

REGISTRO SERGEN: _____ PROCEDÊNCIA: _____

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

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

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

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

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

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

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

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

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

ANEXO C - Carta do Comitê de Ética em pesquisa da UERJ com a aprovação do projeto.


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 Pesquisa - UE