



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

Gabriella de Medeiros Abreu

**Investigação de variantes exônicas nos genes *VPS35*, *EIF4G1* e
LRRK2 como causa da doença de Parkinson em casuística
brasileira**

Rio de Janeiro
2015

Gabriella de Medeiros Abreu

Investigação de variantes exônicas nos genes *VPS35*, *EIF4G1* e *LRRK2* como causa da doença de Parkinson em casuística 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

2015

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

A162 Abreu, Gabriella de Medeiros.
Investigação de variantes exônicas nos genes VPS35, EIF4G1 e LRRK2 como causa da doença de Parkinson em casuística brasileira / Gabriella de Medeiros Abreu – 2015.
139 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 - Teses. 2. Parkinson, Doença de - Aspectos genéticos - Teses. 3. Mutagênese - Teses. 4. Reação em cadeia da polimerase - Teses. 5. Mutação - Teses. 6. Cérebro - Doenças - Teses. I. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. II. Santos-Rebouças, Cíntia Barros. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.858-008.6

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

Assinatura

Data

Gabriella de Medeiros Abreu

Investigação de variantes exônicas nos genes *VPS35*, *EIF4G1* e *LRRK2* como causa da doença de Parkinson em casuística 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 26 de janeiro de 2015.

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

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

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Carmen Lúcia Antão Paiva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com doença de Parkinson.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, meus exemplos de vida. À minha mãe por todo amor, mimo e por me aturar nos momentos de estresse. Ao meu pai por minha educação, carinho e cantoria. Obrigada, minhas conquistas também são suas.

À minha querida irmã Juliana, obrigada por todo carinho, amor, palavras de apoio e pelas gargalhadas que só você consegue tirar de mim. Obrigada também por entender todas as vezes que eu não pude estar ao seu lado.

À Júlia que, mesmo sem conhecer, já amo tanto.

Ao meu noivo, amor e melhor amigo Fábio. Obrigada por todo apoio, compreensão, ombro amigo, por todo chocolate nos momentos em que precisei, por sempre acreditar que eu conseguiria e por ser o torcedor mais fanático da minha vida de cientista.

A toda minha família.

À minha orientadora, professora Márcia Pimentel, pela orientação, apoio, confiança e por todo o conhecimento que eu adquiri ao longo desses dois anos através das suas sábias palavras.

À minha coorientadora, professora Cíntia Santos-Rebouças, pela orientação e por sempre esclarecer minhas dúvidas.

Às minhas queridas amigas Karine e Hay. Karine obrigada pelo abraço mais aconchegante do mundo e Hay obrigada pelo ombro amigo. Amo vocês.

À Andressa, minha amiga, companheira da bancada e da vida. Obrigada por me ouvir e me manter calma e sã todo esse tempo e por todo apoio e carinho.

À Fabiola por todo o ensinamento, amizade e por toda paciência em me ensinar desde a bancada do PCR em tempo real até a análise do R, e só quem já fez essa análise sabe o quão trabalhosa é. Então, muito obrigada!

À Jussara por me ensinar a ter respeito por todos os nossos pacientes. Obrigada também por todas as gargalhadas e ensinamentos do dia-a-dia.

À Veluma por me ajudar na bancada e, é claro, pelo cafezinho de todas as manhãs.

À Luciana, queridinha, obrigada por todas as palavras de apoio, companheirismo, risadas e também por aprimorar meu vocabulário com palavras novas e inexistentes no vocabulário Aurélio.

Aos meus queridos IC's André, Bianca, Camilla, Sara e Felipe. Torço por vocês e me orgulho muito das suas conquistas. Obrigada por toda ajuda e conversas nos momentos de descontração.

As mestrandas Débora e Thaís pela companhia.

Ao meu bebê gigante Davi por todo o carinho.

À minha eterna Punk. Não tenho como agradecer todos os momentos que você me proporcionou sem que caia uma lágrima, eu sempre vou amar você.

Aos meus queridos Leslie e Pretinha. Vocês são pra mim como a rosa do pequeno príncipe, entre tantos cachorros de rua no mundo, vocês me cativaram.

Aos médicos neurologistas: Dr^a. Ana Rosso, Dr. Marco Antônio Leite, Dr. Marcus Coletta, Dr. João Pereira, Dr^a. Denise Nicaretta, Dr. Delson Silva e Dr. Luiz Felipe Vasconcellos, pela seleção dos pacientes e contribuições a esse trabalho.

Aos pacientes do SERVGEN e indivíduos controles desse estudo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biociências.

Aos funcionários da UERJ.

Aos financiadores CAPES, FAPERJ e ao CNPq, em especial ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento.

Stephen Hawking

RESUMO

ABREU, Gabriella de Medeiros. *Investigação de variantes exônicas nos genes VPS35, EIF4G1 e LRRK2 como causa da doença de Parkinson em casuística brasileira*. 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente no mundo, afetando 1-2% da população acima de 65 anos, caracterizada clinicamente por tremor em repouso, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez muscular. Essas manifestações surgem devido à degeneração neuronal progressiva e à presença de inclusões proteicas ricas em α -sinucleína. A DP é decorrente da interação entre fatores ambientais e genéticos, e entre os fatores genéticos, variantes exônicas de transmissão dominante nos genes *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*), *VPS35* (*vacuolar protein sorting 35*) e *EIF4G1* (*eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1*) têm sido associadas à etiologia da doença. Entretanto, estudos sobre o efeito dessas variantes na população brasileira são raros ou inexistentes. Por essa razão, neste trabalho rastreamos mutações nos genes *VPS35* (p.D620N; p.R524W), *EIF4G1* (p.R1205H; p.A502V) e *LRRK2* (p.G2019S) em uma amostra de 582 pacientes brasileiros com DP não aparentados e 329 indivíduos controles saudáveis. Além disso, conduzimos o primeiro estudo caso-controle para análise de variantes exônicas raras (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R, p.Y2189C) e comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K) no gene *LRRK2* em um subgrupo de 329 pacientes brasileiros com DP, não aparentados, naturais da região sudeste. Esse subgrupo foi analisado e comparado com 222 indivíduos controles saudáveis a fim de verificar associações dessas variantes e a DP. Em relação às mutações dos genes *VPS35* e *EIF4G1*, não foram encontradas alterações nos pacientes com DP. A mutação p.G2019S no gene *LRRK2* foi encontrada em 15 probandos (2,6%), dos quais 9 são do sexo feminino (64,3%). O tremor em repouso foi observado em 47,36% dos pacientes com a mutação p.G2019S como primeiro sintoma motor. As análises das variantes raras no gene *LRRK2* não revelaram qualquer associação estatisticamente significativa. Entre as variantes comuns, a p.K1423K mostrou evidência de associação de risco com a DP ($p < 0,05$) na estratificação contendo o grupo de indivíduos com história familiar da doença e para as variantes p.N551K e p.R1398H não foram observadas associações. A análise do haplótipo p.N551K-p.R1398H-p.K1423K revelou associação de proteção na amostra sudeste e na estratificação Rio de Janeiro ($p < 0,05$). Esse haplótipo não está em desequilíbrio de ligação na amostra de 222 indivíduos controles brasileiros analisados ($r^2 \leq 45$). Os resultados obtidos neste estudo representam contribuições valiosas ao entendimento da relação entre as variantes genéticas estudadas e o risco de desenvolvimento da doença de Parkinson, principalmente no que se refere aos endofenótipos associados.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. *VPS35*. *EIF4G1*. *LRRK2*.

ABSTRACT

ABREU, Gabriella de Medeiros. *Investigation of exonic variants in VPS35, EIF4G1 and LRRK2 genes as a cause of Parkinson's disease among Brazilian population*. 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder in the world, affecting 1-2% of population more than 65 years of age, clinically recognized by resting tremor, bradykinesia, postural instability and rigidity. These manifestations occur due to progressive neuronal degeneration and to the presence of protein inclusions enriched with α -synuclein. PD results from the interaction between environmental and genetic factors, and, among genetic factors, dominant exonic variants in *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase 2*), *VPS35* (*vacuolar protein sorting 35*) e *EIF4G1* (*eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1*) genes have been described as causes of the disease. However, studies of the effect of these variants in Brazilian population are rare or do not exist. For this reason, in this study we decided screening mutations in *VPS35* (p.D620N; p.R524W), *EIF4G1* (p.R1205H; p.A502V) and *LRRK2* (p.G2019S) genes in a cohort of 582 unrelated Brazilian patients with PD and 329 healthy individuals control. In addition, we carried on the first case-control study to analyze *LRRK2* exonic rare (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R, p.Y2189C) and common (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K) variants in a subgroup of 329 unrelated Brazilian patients with PD from Southeastern region. This group was analyzed and compared to 222 healthy individuals control in order to verify associations between these variants and PD. Regarding mutations of *VPS35* and *EIF4G1* genes, we have not found any alteration in Brazilian patients with PD. The mutation p.G2019S in *LRRK2* gene was found in 15 probands (2.6%), 9 of them are female (64,3%). Resting tremor was observed in 47,36% of p.G2019S patients as the predominant initial symptom. Regarding the *LRRK2* rare variants, the results showed no significant association. Among *LRRK2* common variants, the p.K1423K showed evidence of risk association with PD ($p < 0,05$) in the stratified analysis concerning the group of patients with family history of the disease, in contrast, p.N551K and p.R1398H variants showed no associations. The analysis of p.N551K-p.R1398H-p.K1423K revealed protection in Southeastern group and Rio de Janeiro stratification ($p < 0,05$). This haplotype is not in disequilibrium linkage in 222 Brazilian healthy individuals control analyzed ($r^2 \leq 45$). Results obtained in this research represent valuable contributions for the understanding of association between the genetic variants studied and the risk of developing PD, particularly with regard to the associated endophenotypes.

Keywords: Parkinson's disease. *VPS35*. *EIF4G1*. *LRRK2*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema da via nigroestriatal comprometida na doença de Parkinson.....	21
Figura 2-	Neuropatologia da doença de Parkinson.....	22
Figura 3-	Corpúsculos de Lewy na substância negra de um paciente com doença de Parkinson.....	23
Figura 4-	Representação dos estágios de Braak relacionados à doença de Parkinson mostrando os sítios de iniciação na medula oblonga e no bulbo olfatório e por último a infiltração da patologia de Lewy nas regiões corticais.....	24
Figura 5-	A pirâmide pré-motora da DP.....	25
Figura 6-	Atuação dos principais medicamentos disponíveis para o tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson.....	26
Figura 7-	Arquitetura genética da doença de Parkinson.....	30
Figura 8-	Localização do gene <i>EIF4G1</i> em 3q27.1.....	31
Figura 9-	Localização do gene <i>VPS35</i> em 16q11.2.....	33
Figura 10-	Localização do gene <i>LRRK2</i> em 12q12.....	35
Figura 11-	Frequência da mutação p.G2019S em diferentes regiões do mundo.....	37
Figura 12-	Discriminação alélica através de ensaios via sondas <i>TaqMan</i> [®] MGB (<i>Thermo Fisher Scientific</i>).....	52
Figura 13-	Análise através das ferramentas <i>Alelic Discrimination Plot</i> e <i>Multicomponent Plot</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>).....	53
Figura 14-	Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR do paciente PAR4152, homocigoto selvagem para as quatro mutações p.D620N (A), p.R524W (B), p.R1205H (C) e p.A502V (D).....	57
Figura 15-	Gel da digestão dos produtos da PCR (exon 41 do gene <i>LRRK2</i>) com a enzima <i>Sfcl</i>	58
Figura 16-	Eletroferogramas gerados através do sequenciamento automático da PCR.....	59

Figura 17-	Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR do paciente PAR1969, homocigoto selvagem (AA) para a mutação p.S1761R no gene <i>LRRK2</i>	61
Figura 18-	Resultado da análise molecular da variante p.Q1111H.....	62
Figura 19-	Resultado da análise molecular da variante p.T1410M.....	63
Figura 20-	Resultado da análise molecular da variante p.M1646T	64
Figura 21-	Resultado da análise molecular da variante p.Y2189C	65
Figura 22-	Resultado da análise molecular da variante p.N551K	67
Figura 23-	Resultado da análise molecular da variante p.R1398H.....	70
Figura 24-	Resultado da análise molecular da variante p.K1423K.....	73
Figura 25-	A análise revela ausência de desequilíbrio de ligação entre as variantes p.N551K (rs7308720), p.R1398H (rs7133914) e p.K1423K (rs11175964) no gene <i>LRRK2</i> na amostra total de controles.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.N551K do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	68
Gráfico 2-	Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.N551K do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	68
Gráfico 3-	Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.R1398H do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	71
Gráfico 4-	Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.R1398H do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	71
Gráfico 5-	Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	74
Gráfico 6-	Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> por grupo.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Genes associados à doença de Parkinson com herança monogênica.....	29
Tabela 2-	Características da amostra estratificada de pacientes com DP.....	43
Tabela 3-	Condições utilizadas na PCR para a amplificação do exon 41 do gene <i>LRRK2</i>	47
Tabela 4-	Informações das variantes estudadas nos genes <i>EIF4G1</i> , <i>VPS35</i> e <i>LRRK2</i>	51
Tabela 5-	Características clínicas dos pacientes portadores da mutação p.G2019S no gene <i>LRRK2</i>	60
Tabela 6-	Distribuição alélica e genotípica da variante <i>LRRK2</i> p.Q1111H.....	62
Tabela 7-	Distribuição alélica e genotípica da variante <i>LRRK2</i> p.T1410M.....	63
Tabela 8-	Distribuição alélica e genotípica da variante <i>LRRK2</i> p.M1646T.....	64
Tabela 9-	Distribuição alélica e genotípica da variante <i>LRRK2</i> p.Y2189C.....	65
Tabela 10-	Teste do Qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante <i>LRRK2</i> p.N551K por estratificação da amostra de 327 probandos com DP.....	69
Tabela 11-	Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante <i>LRRK2</i> p.R1398H por estratificação da amostra de 328 probandos com DP.....	72
Tabela 12-	Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante <i>LRRK2</i> p.K1423K por estratificação da amostra de 328 probandos com DP.....	75
Tabela 13-	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> na amostra	

	sudeste.....	77
Tabela 14-	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> na estratificação sudeste esporádico.....	78
Tabela 15-	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> na estratificação sudeste familiar.....	79
Tabela 16-	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> na estratificação sudeste ≥ 50 anos.....	80
Tabela 17-	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i> na estratificação Rio de Janeiro.....	81
Tabela 18-	Possíveis combinações alélicas para as variantes exônicas p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene <i>LRRK2</i>	82
Tabela 19-	Distribuição da regressão logística e análise de <i>odds ratio</i> bruto e ajustado para sexo e idade para os haplótipos por estratificação.....	84
Tabela 20-	Sumário dos estudos da mutação p.D620N no gene <i>VPS35</i> em pacientes com doença de Parkinson em diferentes populações.....	87
Tabela 21-	Sumário dos estudos da mutação p.R524W no gene <i>VPS35</i> em pacientes com doença de Parkinson de diferentes populações.....	88
Tabela 22-	Sumário dos estudos da mutação p.R1205H no gene <i>E1F4G1</i> em pacientes com doença de Parkinson de diferentes populações.....	89
Tabela 23-	Sumário dos estudos da mutação p.A502V no gene <i>E1F4G1</i> em pacientes com doença de Parkinson em	

	diferentes populações.....	90
Tabela 24-	Sumário dos estudos da mutação p.G2019S no gene <i>LRRK2</i> em pacientes com doença de Parkinson em diferentes populações.....	92
Tabela 25-	Frequência do alelo menos frequente (C) da variante p.M1646T no gene <i>LRRK2</i> em pacientes e controles saudáveis e OR de acordo com a população.....	96
Tabela 26-	Valor do <i>Odds Ratio</i> para o alelo raro (G) da variante exônica <i>LRRK2</i> p.N551K encontrado em diferentes populações.....	98
Tabela 27-	Valor do <i>Odds Ratio</i> para o alelo raro (A) da variante exônica <i>LRRK2</i> p.R1398H encontrado em diferentes populações.....	99
Tabela 28-	Valor do <i>Odds Ratio</i> para o alelo raro (A) da variante exônica <i>LRRK2</i> p.K1423K encontrado em diferentes populações.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

χ^2	qui-quadrado
μL	microlitro
μM	micromolar
3-OMD	3-o-metildopa
ng	nanograma
pmol	picomol
ANK	domínio <i>Ankyrin repeat</i>
ARM	domínio Armadillo
<i>ATP13A2</i>	gene <i>ATPase type 13A2</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CNS	conselho nacional de saúde
CNVs	variação no número de cópias
COMTIs	inibidores da catecolamina-O-metil transferase
COR	domínio <i>C-terminal of ROC</i>
DDCs	inibidores da dopamina descarboxilase
<i>DJ-1</i>	gene <i>oncogene DJ-1</i>
DL	desiquilíbrio de ligação
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>DNAJC6</i>	gene <i>DnaJ (Hsp40) homolog</i>
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DP	Doença de Parkinson
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy e Weinberg
eIF3	eukaryotic translation initiation factor 3
eIF3e	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4A	eukaryotic translation initiation factor 4A
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4F	eukaryotic translation initiation factor 4F
eIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4G1
<i>EIF4G1</i>	<i>eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1</i>
<i>FBXO7</i>	gene <i>F-box only protein 7</i>
GDP	5'- difosfato de guanosina

GTP	5'- trifosfato de guanosina
GWAS	estudos de associação genômica
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança
IINEURO	Instituto Integrado de Neurociências de Goiânia
INDC	Instituto de Neurologia Deolindo Couto
Kb	quilobase
KDa	quilodalton
LRR	domínio <i>leucine rich repeat</i>
<i>LRRK2</i>	gene <i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
LRRK2	proteína leucine-rich repeat kinase 2
MAPKKK	domínio <i>mitogen activated kinase kinase kinase</i>
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MnK1	<i>MAP kinase signal-integrating serine/threonine kinase 1</i>
MPTP	metil-4-fenil1-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MS	Ministério da saúde
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	<i>odds ratio</i>
PAPB	<i>poly-adenine binding protein</i>
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
<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>
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
RFLP	polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
RNA	ácido ribonucléico
ROC	domínio <i>Ras of complex proteins</i>
rpm	rotação por minuto

SCM	Santa Casa da Misericórdia
SNCA	gene <i>α-synuclein</i>
SNP	polimorfismo de nucleotídio único
SNX	<i>sorting nexin</i>
SYNJ1	gene <i>synaptojanin 1</i>
U	unidade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
V	volt
Vps35	proteína vacuolar protein sorting 35
VPS35	gene <i>vacuolar protein sorting 35</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	21
1	OBJETIVOS	40
1.1	Objetivos específicos	40
2	METODOLOGIA	41
2.1	Pacientes com DP e indivíduos controles saudáveis	41
2.2	Desenho amostral relativo ao estudo dos pacientes com DP	42
2.2.1	<u>Mutações nos genes <i>EIF4G1</i>, <i>VPS35</i> e <i>LRRK2</i></u>	42
2.2.2	<u>Variantes exônicas raras e comuns no gene <i>LRRK2</i></u>	42
2.3	Coleta de material biológico e extração de DNA genômico ...	44
2.4	Estimativa da concentração e da integridade do DNA	45
2.5	Análise molecular	46
2.5.1	<u>Análise molecular da mutação <i>LRRK2</i> p.G2019S</u>	46
2.5.1.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	46
2.5.1.2	Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação.....	47
2.5.1.3	Identificação da mutação <i>LRRK2</i> p.G2019S por PCR-RFLP.....	48
2.5.1.4	Sequenciamento automático.....	49
2.5.1.5	Purificação dos produtos da PCR.....	49
2.5.1.6	Reação de sequenciamento.....	49
2.5.1.7	Correlação genótipo-fenótipo.....	50
2.5.2	<u>Análise molecular das mutações nos genes <i>EIF4G1</i>, <i>VPS35</i> e das variantes exônicas no gene <i>LRRK2</i></u>	51
2.6	Análise estatística	55
2.6.1	<u>Análise estatística para as variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene <i>LRRK2</i></u> ...	55
2.6.2	<u>Análise estatística das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i></u>	55
3	RESULTADOS	57

3.1	Análise molecular das mutações nos genes <i>EIF4G1</i> e <i>VPS35</i>.....	57
3.2	Análise molecular da mutação <i>LRRK2</i> p.G2019S.....	58
3.3	Análise molecular e estatística das variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene <i>LRRK2</i>.....	61
3.4	Análise molecular e estatística das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....	66
3.4.1	<u>Análise das frequências genotípicas e alélicas e teste do Qui-quadrado.....</u>	66
3.4.2	<u>Regressão Logística.....</u>	75
3.4.3	<u>Análise de haplótipos relativos às combinações alélicas das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....</u>	82
3.4.4	<u>Análise de desequilíbrio de ligação relativo às variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....</u>	85
4	DISCUSSÃO.....	86
4.1	Análise das mutações p.D620N e p.R524W no gene <i>VPS35</i>	86
4.2	Análise das mutações p.R1205H e p.A502V no gene <i>EIF4G1</i>	88
4.3	Análise da mutação p.G2019S no gene <i>LRRK2</i>.....	90
4.3.1	<u>Estudo de associação fenótipo-genótipo.....</u>	93
4.4	Análise das variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene <i>LRRK2</i>.....	94
4.5	Análise das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....	97
4.5.1	<u>Análise de haplótipos relativos às combinações alélicas das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....</u>	101
4.5.2	<u>Análise de desequilíbrio de ligação relativo às variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene <i>LRRK2</i>.....</u>	102
	CONCLUSÕES.....	103

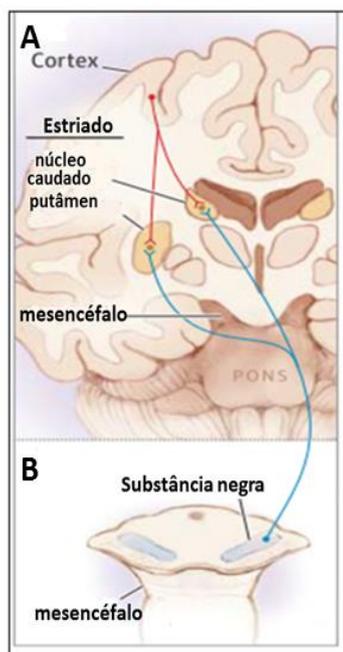
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes <i>LRRK2</i> , <i>VPS35</i> e <i>EIF4G1</i>	120
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com DP.....	135
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido da amostra controle.....	137
ANEXO C - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ.....	139

INTRODUÇÃO

Características neuropatológicas

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio comum entre os idosos com prevalência de cerca de 1-2% em indivíduos com mais de 65 anos (de Lau & Breteler, 2006; Postuma & Montplaisir, 2009). Trata-se de uma condição caracterizada pela perda de neurônios em diversas regiões do cérebro, sendo particularmente proeminente nos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra do mesencéfalo. Os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal são essenciais para a regulação motora e, quando essas células são perdidas na substância negra, acarretam a depleção da dopamina no estriado, resultando em bradicinesia e rigidez, que são características clínicas clássicas da DP (Tsui & Isacson, 2011) (Figura 1).

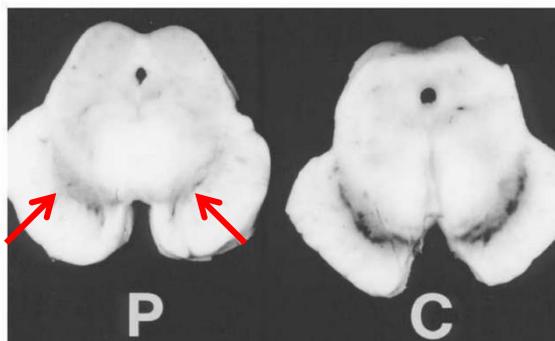
Figura 1- Esquema da via nigroestriatal comprometida na doença de Parkinson



Legenda: (A) Corte transversal do cérebro mostrando em detalhe o estriado e o mesencéfalo. (B) Corte horizontal do mesencéfalo mostrando em detalhe a substância negra (Fonte: Connolly & Lang, 2014, com modificações).

Os neurônios dopaminérgicos contêm o pigmento neuromelanina, que é responsável pela coloração escura da substância negra e à medida que ocorre a morte desses neurônios, a substância negra vai perdendo sua coloração (Halliday & McCann, 2010) (Figura 2).

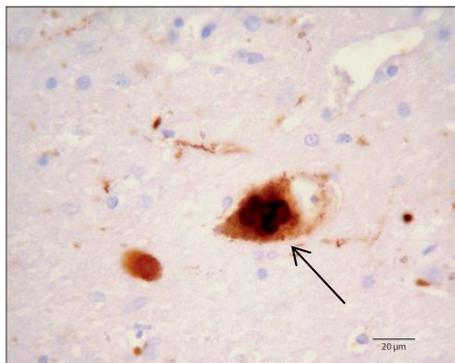
Figura 2- Neuropatologia da doença de Parkinson



Legenda: Secção horizontal do mesencéfalo de um paciente com DP à esquerda (P) e de um controle normal à direita (C) mostrando a perda de pigmentação da substância negra no paciente P apontada pelas setas vermelhas (Fonte: Mackenzie, 2001, com modificações).

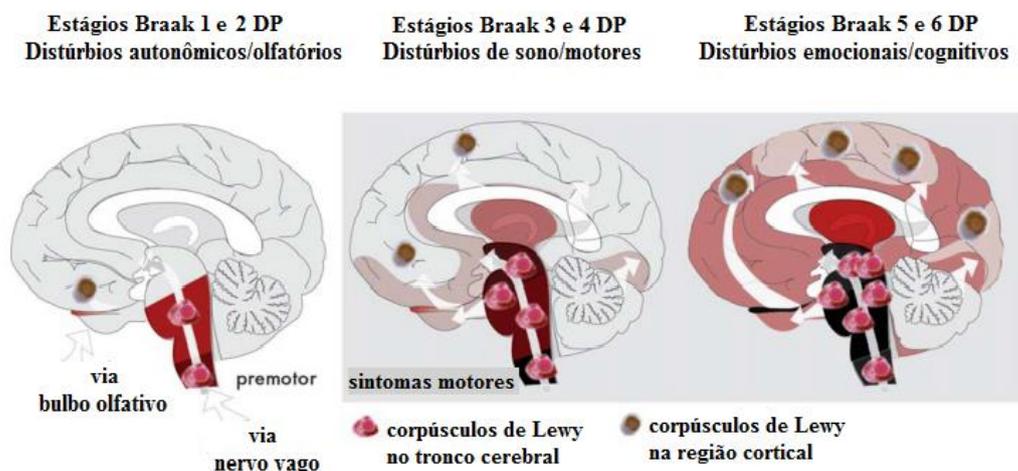
Além da morte dos neurônios dopaminérgicos, há a formação dos corpúsculos de Lewy nos neurônios sobreviventes, que são conglomerados proteicos e lipídicos (Braak *et al.*, 2003) (Figura 3). O principal componente dos corpúsculos de Lewy é a α -sinucleína, uma pequena proteína sináptica que tem como função se ligar aos lipídios de membrana e curvá-los de forma a gerar uma estrutura helicoidal. Entretanto, em algumas situações, essa proteína se liga a si própria e forma estruturas ricas em conformações folha- β . Pequenos oligômeros podem se acumular e gerar grandes fibrilas que são insolúveis e que podem dar origem aos corpúsculos de Lewy (Cookson, 2009).

Figura 3- Corpúsculos de Lewy na substância negra de um paciente com doença de Parkinson (Fonte: Lees *et al.*, 2009, com modificações)



Braak e colaboradores (2003), ao estudarem os depósitos de α -sinucleína no cérebro, desenvolveram a hipótese dos seis estágios Braak relacionados à DP, a qual suporta a ideia de que a neurodegeneração vai além da perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra. São eles: nos estágios 1 e 2 há depósitos de corpúsculos de Lewy na periferia e, em seguida, se espalham para a medula oblonga e para a via olfatória. Esses depósitos em regiões periféricas podem ter correlações clínicas com distúrbios autonômicos e olfativos (Poewe, 2008; Gaig & Tolosa, 2009). Nos estágios 3 e 4, os depósitos infiltram o tronco cerebral, causando distúrbios de sono e motores. Nos estágios 5 e 6, o sistema límbico e as regiões neocorticais são afetadas, causando danos neurocomportamentais, cognitivos e emocionais (Braak *et al.*, 2003; 2006) (Figura 4).

Figura 4- Representação dos estágios de Braak relacionados à doença de Parkinson mostrando os sítios de iniciação na medula oblonga e no bulbo olfatório e por último a infiltração da patologia de Lewy nas regiões corticais (Fonte: Halliday *et al.*, 2011, com modificações)

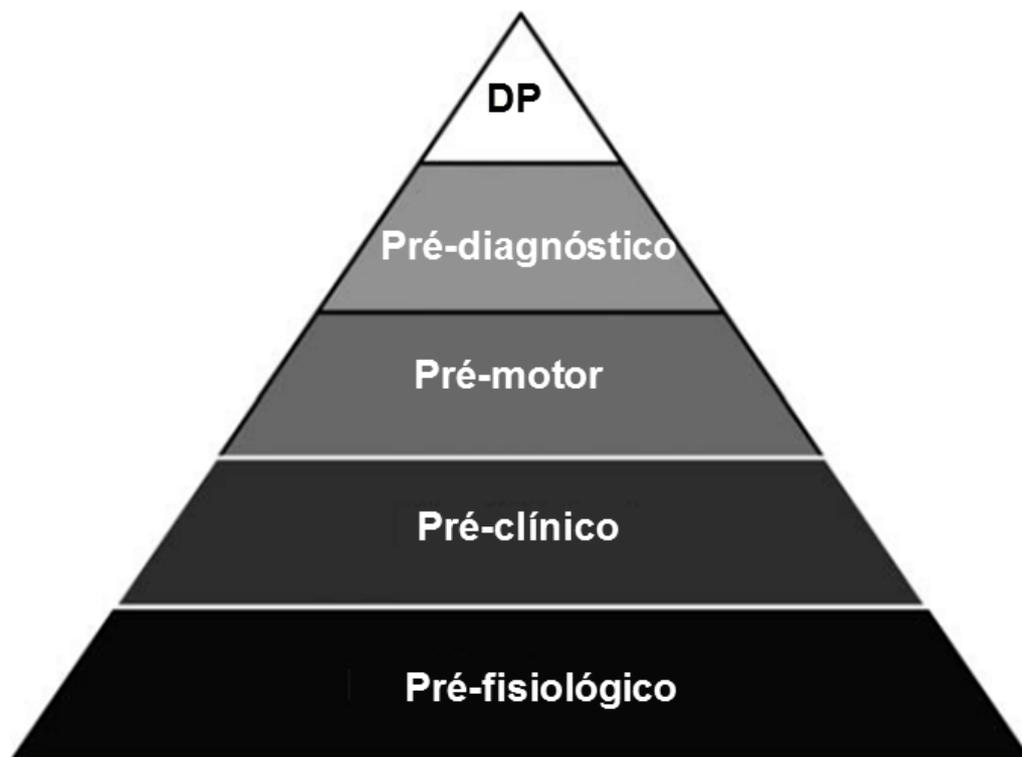


Características clínicas

Acredita-se que a DP tenha uma longa fase pré-motora antes de ser diagnosticada pelos sintomas motores clássicos (tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural). A fase pré-motora pode ser dividida em quatro estágios: pré-fisiológico; pré-clínico; pré-motor e pré-diagnóstico (Figura 5). A fase pré-fisiológica inclui indivíduos que não possuem evidência da DP, mas possuem mutações que podem conferir um maior risco ao desenvolvimento da doença (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Lucking *et al.*, 2000; Healy *et al.*, 2008). A fase pré-clínica se refere a mudanças fisiológicas que podem ser detectadas utilizando-se metodologias tais como testes olfatórios e neuropsicológicos. Pacientes na fase pré-motora podem desenvolver sintomas como o decréscimo do senso olfativo (Doty *et al.*, 1988; Muller *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2008; Haehner *et al.*, 2009), constipação (Abbott *et al.*, 2001; Savica *et al.*, 2010), além de disfunção autonômica e distúrbios do sono (Plazzi *et al.*, 1998; Abbott *et al.*, 2005; Postuma *et al.*, 2009; Iranzo *et al.*, 2011) e neuropsiquiátricos (Gonera *et al.*, 1997; Shiba *et al.*, 2000). Na fase pré-diagnóstico, muitos pacientes possuem alguns sinais de parkinsonismo, porém não

possuem todos os critérios requeridos para o diagnóstico de DP (Louis & Bennett, 2007).

Figura 5- A pirâmide pré-motora da DP

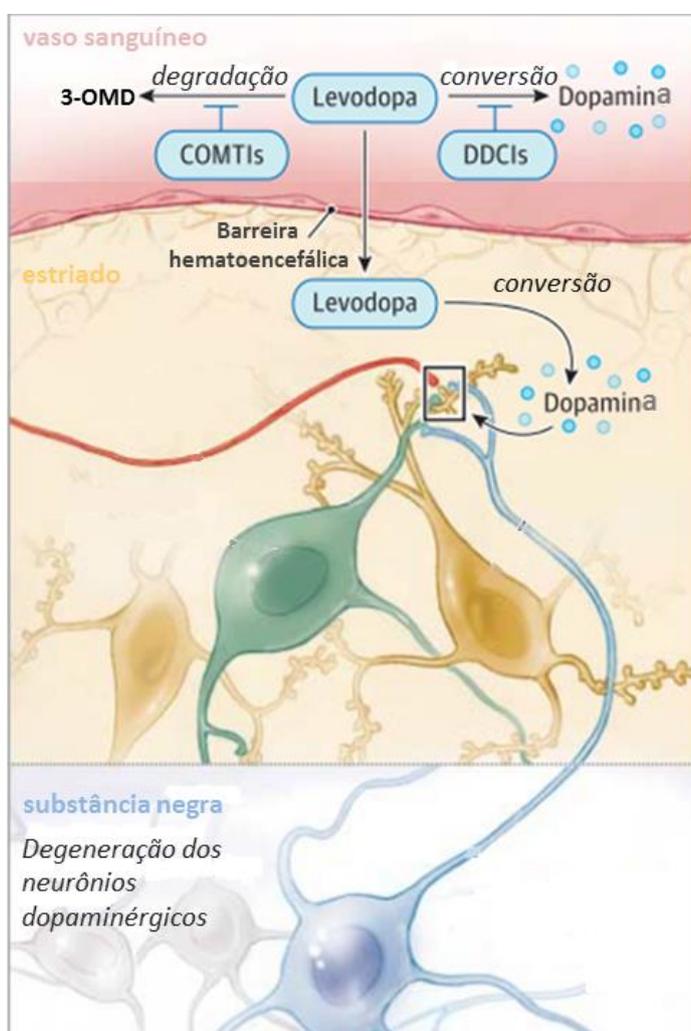


Legenda: Nesse modelo há quatro estágios que precedem as manifestações clínicas clássicas da doença: pré-fisiológica, pré-clínica, pré-motora e pré-diagnóstico. Há relativamente um grande número de indivíduos que tem uma predisposição a desenvolver DP, mas apenas uma fração progride a cada nível. No final, o número de indivíduos que desenvolvem a DP é uma pequena fração do grupo de risco (Siderowf & Lang, 2012).

Tratamento

Atualmente, não há tratamento disponível que impeça a progressão da doença. A administração de levodopa e agonistas de dopamina apenas aliviam os sintomas motores, podendo ocasionar efeitos adversos, como flutuações motoras e discinesias (Fahn, 2000; Schapira, 2005) (Figura 6).

Figura 6- Atuação dos principais medicamentos disponíveis para o tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson



Legenda: O levodopa periférico ultrapassa a barreira hematoencefálica e é convertido centralmente em dopamina. Com o intuito de disponibilizar mais levodopa no estriado, inibidores da dopamina descarboxilase (DDCIs) bloqueiam a conversão do levodopa em dopamina e inibidores da catecolamina-O-metil transferase (COMTIs) bloqueiam a degradação do levodopa a 3-o-metildopa (3-OMD) na circulação periférica (Fonte: Connolly & Lang, 2014, com modificações).

Etiologia

Fatores ambientais

Resultados experimentais obtidos em diversos estudos indicam que algumas substâncias relacionadas aos hábitos e à dieta do paciente podem reduzir ou aumentar a suscetibilidade à doença. Evidências sugerem que o cigarro e a cafeína reduzem o risco da DP, possivelmente porque promovem a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (Hernán *et al.*, 2002; Kiebertz & Wunderle, 2013). Atividades físicas também parecem contribuir para diminuição do risco da doença (Thacker *et al.*, 2008). Em contraste, sugere-se que a exposição a pesticidas aumenta três vezes o risco de desenvolvimento da doença (Tanner *et al.*, 2009; 2011). Indivíduos que trabalham em atividades rurais parecem ter uma maior chance de desenvolver DP devido a maior exposição a pesticidas (Hancock *et al.*, 2008). Goldman e colaboradores (2006) conduziram um estudo em pessoas que tiveram traumatismo crânio-encefálico e sugeriram que o trauma eleve duas vezes o risco de desenvolvimento da DP.

Fatores Genéticos

Até 1997, o papel da herdabilidade na etiologia da DP era controverso (Farrer, 2006). Acreditava-se que a doença fosse ocasionada por fatores ambientais devido a algumas evidências: a epidemia de parkinsonismo pós-encefalítico que ocorreu logo após a primeira guerra mundial (Casals *et al.*, 1998); a descoberta do MPTP como agente indutor do parkinsonismo (Langston *et al.*, 1983) e a falta de concordância da doença observada entre gêmeos monozigóticos (Tanner *et al.*, 1999; Wirdefeldt *et al.*, 2011). Entretanto, a base genética da DP começou a ser elucidada na última década e sabe-se hoje que se trata de uma condição com importante componente genético que inclui mutações diretamente associadas à

doença e variantes de risco que modificam a susceptibilidade à DP (Gasser *et al.*, 2011).

Aproximadamente, 10% dos pacientes com DP têm história familiar da doença e verifica-se que as formas mendelianas têm contribuído para a elucidação das vias moleculares que levam à degeneração e à morte neuronal. Através de análise de ligação, estudos de associação genômica (GWAS) e sequenciamento de nova geração foram identificados pelo menos 12 genes associados às formas monogênicas envolvidas na DP (Tabela 1). Dentre os genes descritos, mutações em três deles (*SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*) são causas autossômicas dominantes da DP, conclusivamente estabelecidas. Recentes evidências, ainda que inconclusivas, sinalizam que alterações no gene *EIF4G1* também contribuem para o desenvolvimento da DP (Bonifati, 2014).

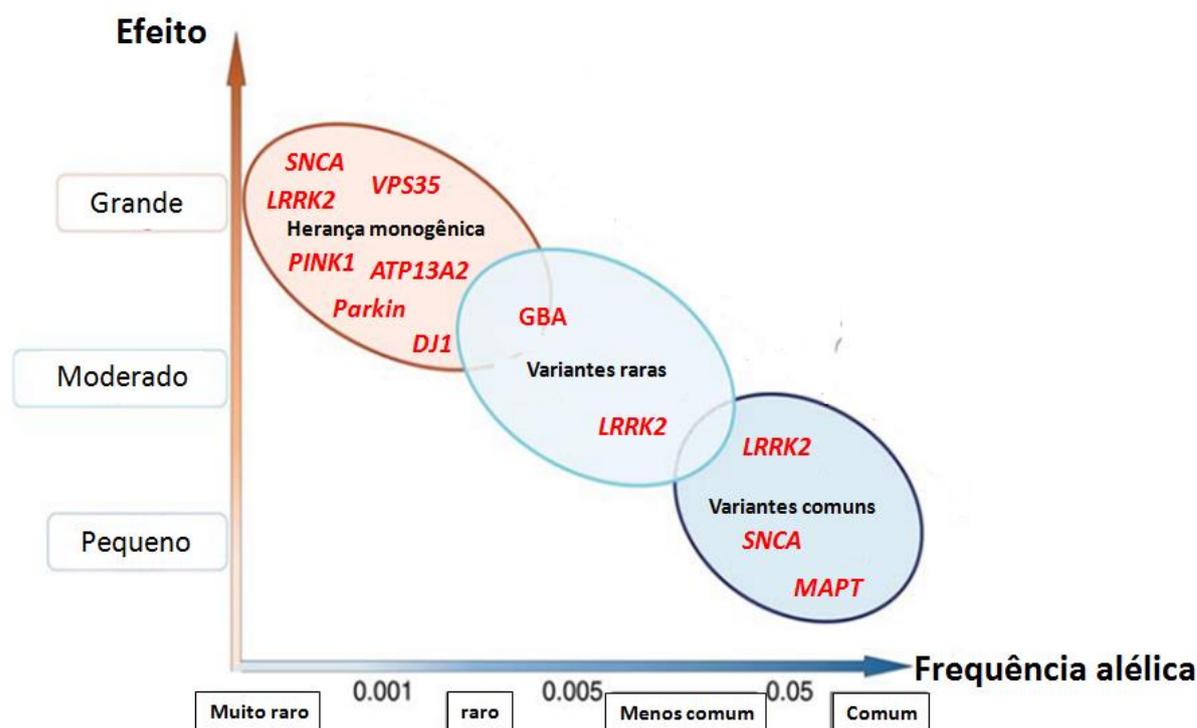
Tabela 1- Genes associados à doença de Parkinson com herança monogênica

Gene	Localização	Herança	Características patológicas	Fenótipo Clínico	Referências
<i>SNCA</i>	4q21	Dominante	Corpúsculos de Lewy, atípica em alguns casos	DP com início precoce e curso agressivo	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997
<i>LRRK2</i>	12q12	Dominante	Pleomórfica, corpúsculos de Lewy típicos na maior parte dos casos	Típico, com início tardio	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
<i>VPS35</i>	16q11.2	Dominante	Desconhecido	Típico, com início tardio	Zimprich <i>et al.</i> , 2011; Vilariño-Güell <i>et al.</i> , 2011
<i>EIF4G1</i>	3q27.1	Dominante (?)	Desconhecido	DP com início tardio	Chartier-Harlin <i>et al.</i> , 2011
<i>PRKN</i>	6q25.2-q27	Recessiva	Ausência de corpúsculos de Lewy na maior parte dos casos	DP com início precoce e curso lento	Kitada, 1998
<i>PINK1</i>	1p35-p36	Recessiva	Corpúsculos de Lewy (apenas um cérebro analisado)	DP com início precoce e curso lento	Valente <i>et al.</i> , 2004
<i>DJ-1</i>	1p36	Recessiva	Desconhecido	DP com início precoce e curso lento	Bonifati <i>et al.</i> , 2003

**SNCA*- α -synuclein; *LRRK2* - leucine-rich repeat kinase 2; *VPS35* - vacuolar protein sorting 35; *EIF4G1* - eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1; *PRKN* – Parkin; *PINK1* - PTEN-induced putative kinase 1; *DJ-1* - oncogene DJ-1. Genes associados a formas atípicas e juvenis da DP não incluídos na tabela: *ATP13A2* - ATPase type 13A2; *PLA2G6* - group VI phospholipase A2; *FBXO7* – F-box only protein 7; *DNJC6* -DnaJ (Hsp40) homolog; *SYNJ1* - synaptojanin 1 (Fonte: adaptado de Bonifati, 2014).

Além das mutações monogênicas, variantes comuns ou raras também podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Hardy, 2010; Bonifati, 2014). Desta forma, evidencia-se uma complexa arquitetura genética, como apresentada na figura 7, onde vemos que, apesar das mutações com herança monogênica terem um efeito maior, elas são, em geral, raras na população. Por sua vez, as variantes comuns são encontradas com uma frequência superior a 5%, porém, oferecem um risco menor ao desenvolvimento da doença (Hardy, 2010; Lesage & Brice, 2012). Esta complexidade sinaliza o envolvimento de uma diversidade de vias metabólicas na etiologia da DP. Nos últimos anos, atenção especial dos estudos de associação genética com a DP tem sido voltada para as variantes raras e comuns dos genes dominantes *EIF4G1*, *VPS35* e *LRRK2*.

Figura 7- Arquitetura genética da doença de Parkinson

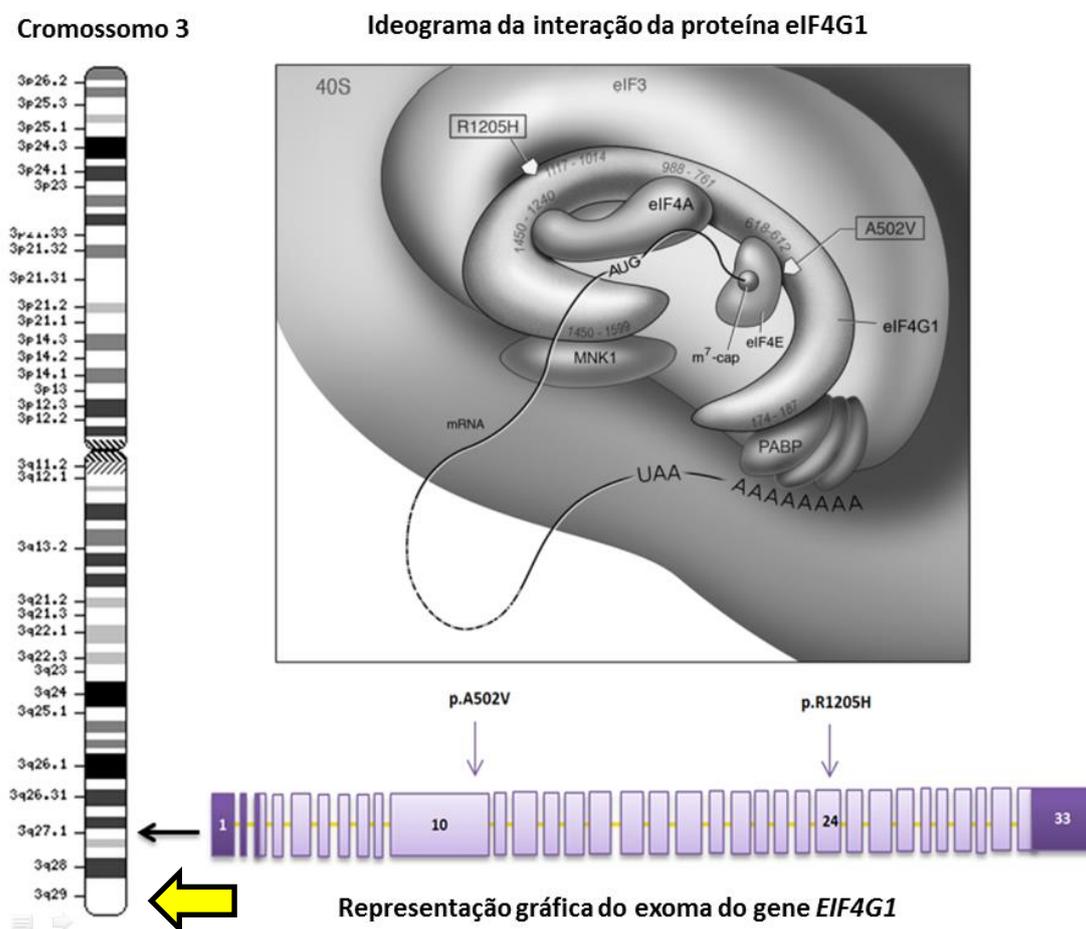


Legenda: O eixo y do gráfico representa os efeitos que as alterações podem oferecer (grande, moderado e pequeno) e o eixo x representa a frequência alélica, sendo classificadas como: muito raro (<0,001), raro (<0,005), menos comum (<0,05) e comum (>0,05) (Fonte: Tsuji 2010, com modificações).

Gene *EIF4G1*

O gene *eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1* (*EIF4G1*) (OMIM 600495) mapeia em 3q27.1, possui 33 exons e codifica o fator de iniciação de tradução eIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor 4G1), um componente do complexo de iniciação de tradução eIF4F (eukaryotic translation initiation factor 4F) (Figura 8).

Figura 8- Localização do gene *EIF4G1* em 3q27.1



Legenda: A região N-terminal da proteína eIF4G1 se liga ao eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) e ao PABP (*poly-adenine binding protein*) que ataca a cauda do RNA mensageiro. O domínio central do eIF4G1 recruta o eIF4A (eukaryotic translation initiation factor 4A) e eIF3 (eukaryotic translation initiation factor 3). A região C-terminal da proteína eIF4G1 contém sítios de ligação adicionais para eIF4A e fatores de regulação incluindo Mnk1 (*MAP kinase signal-integrating serine/threonine kinase 1*). Juntos, o eIF3 e eIF4F (eukaryotic translation initiation factor 4F) se ligam à subunidade ribossômica 40S e ao RNA transportador metionil. A posição das mutações EIF4G1 p.A502V e p.R1205H estão apresentadas a nível de exoma e proteoma (Fonte: Chartier-Harlin *et al.*, 2011, com modificações).

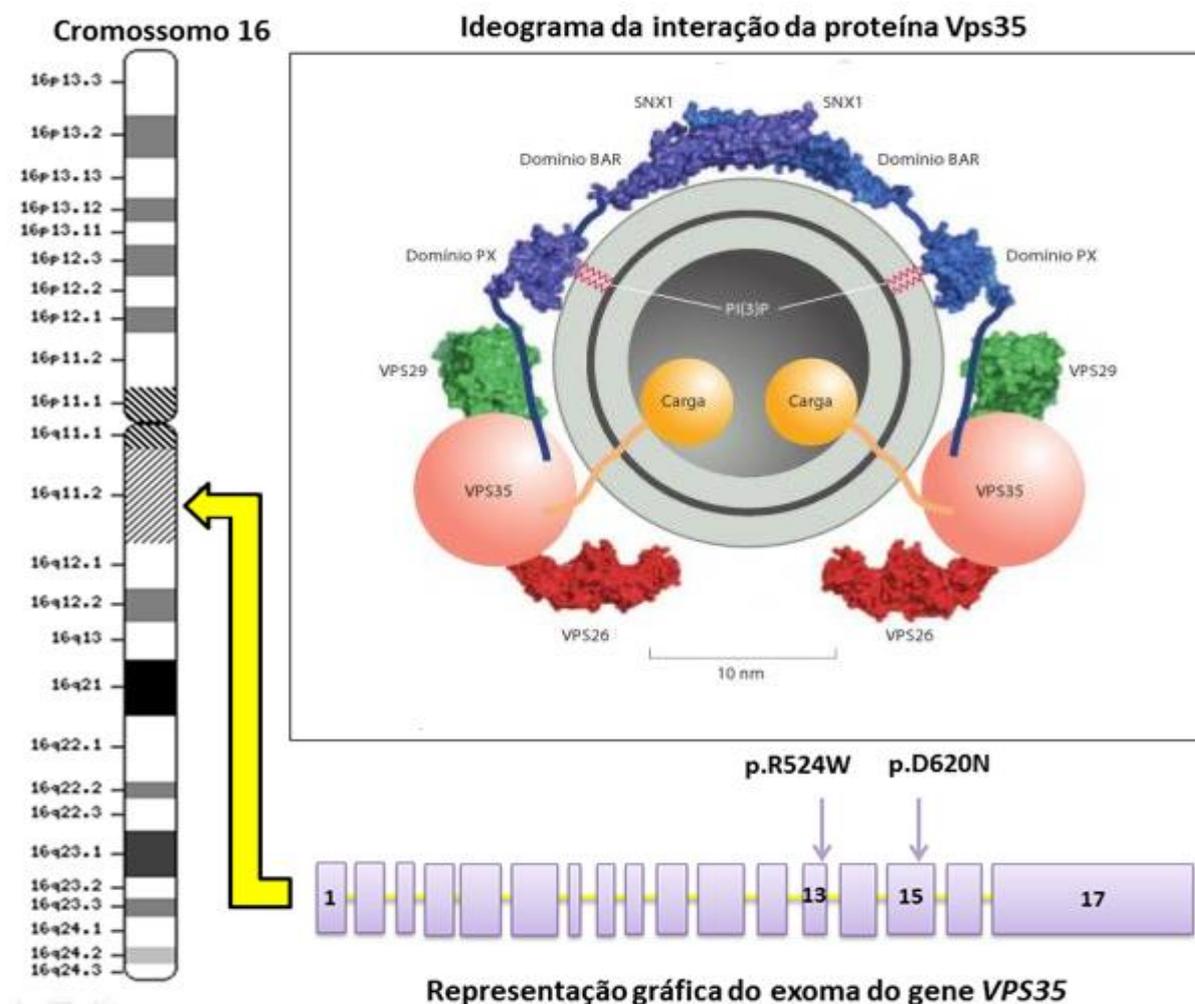
Mutações no gene *EIF4G1* têm sido descritas como uma possível causa genética da doença de Parkinson tardia de herança autossômica dominante. Chartier-Harlin e colaboradores (2011) identificaram uma única variante no gene *EIF4G1* segregando em uma família de origem francesa, a p.R1205H (c.3614G>A). Após a descoberta inicial, outros 7 pacientes com história familiar de DP de diferentes nacionalidades (Estados Unidos, Canadá, Irlanda, Itália e Tunísia) foram identificados com esta mutação. A alteração p.R1205H, localizada no exon 24, leva à substituição do aminoácido arginina, conservado entre os mamíferos, pela histidina no resíduo 1205 da proteína. Além dessa mutação, outras quatro variantes de sentido trocado foram identificadas em indivíduos com DP, entre elas, a variante p.A502V (c.1505C>T) encontrada em 3 pacientes com história familiar e um caso esporádico. Apesar de raras, é possível que mutações no gene *EIF4G1* sejam causas incomuns ou fatores de risco para DP. Estudos de análise funcional demonstraram que as mutações p.R1205H e p.A502V interferem com a ligação dos fatores eIF3e (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E) e eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E), interações estas normalmente requeridas para iniciar a tradução (Chartier-Harlin *et al.*, 2011).

Gene VPS35

O gene *vacuolar protein sorting 35 (VPS35)* (OMIM 601501) mapeia em 16q11.2 e possui 17 exons. A expressão de seu RNA mensageiro ocorre em muitos tecidos, incluindo o cérebro. Ele codifica uma proteína denominada Vps35 de 796 aminoácidos com um peso molecular de 92 kDa (Edgar & Polak, 2000; Zhang *et al.*, 2000). O gene *VPS35* é um componente altamente conservado do complexo retrômero, que é a maior plataforma de classificação de vias secretoras, na qual proteínas recém-sintetizadas ou recuperadas de compartimentos endocíticos são marcadas para diferentes destinos (Anitei & Hoflack, 2011). O retrômero é um complexo multiproteico formado no revestimento das membranas endossômicas, que medeia o transporte retrógrado de carga transmembrana do endossomo para o *trans*-Golgi (Seaman, 2005; Bonifacino & Rojas, 2006). O complexo retrômero humano é constituído de dois subcomplexos: o trímero Vps26-Vps29-Vps35, de

reconhecimento cargo e o dímero *sorting nexin* (SNX) composto por uma combinação indefinida de SNX1, SNX2, SNX5, SNX6 e, possivelmente, SNX32 (Attar & Cullen, 2010; McGough & Cullen, 2011) (Figura 9).

Figura 9- Localização do gene *VPS35* em 16q11.2

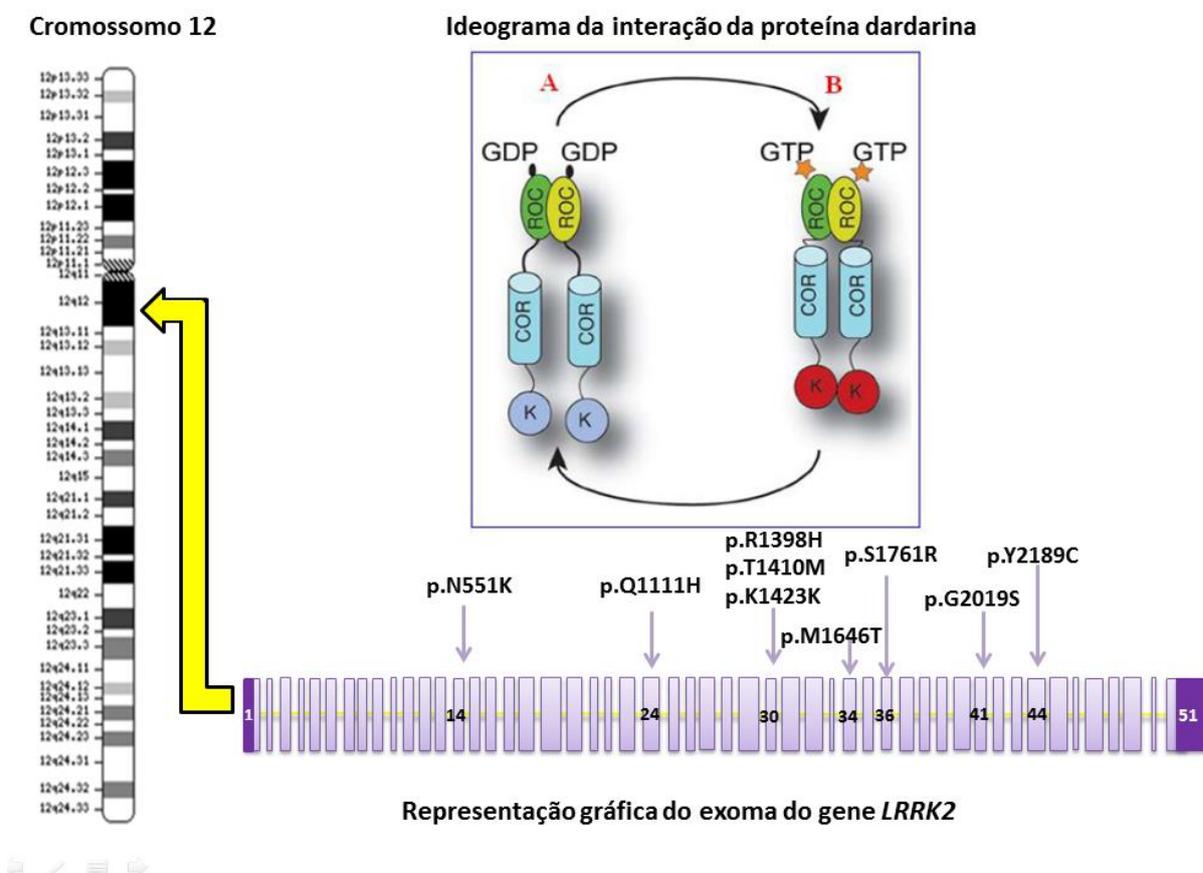


Legenda: A figura apresenta um modelo para formação do retrômero sobre membranas endossômicas. As unidades do retrômero SNX, Vps26, Vps29 e Vps35 formam domínios de revestimento sobre as membranas do endossomo que capturam moléculas-carga, incluindo proteínas transmembrana para vesículas que as retornam à rede *trans* de Golgi. A proteína Vps35 liga-se às caudas citoplasmáticas das proteínas transmembrana de carga. A proteína SNX contém diferentes módulos proteicos: um domínio PX, o qual se liga à fosfatidilinositol PI(3)P, e um domínio BAR, o qual medeia a dimerização e acoplamento às membranas altamente curvadas. As mutações p.R524W e p.D620N estão apontadas segundo a sua posição exônica (Fonte: Bonifacino & Rojas, 2006, com modificações).

Em 2011, através do sequenciamento do exoma do gene *VPS35*, dois grupos independentes descreveram a mesma mutação p.D620N (c.1858G>A) como uma nova causa de DP autossômica dominante em duas famílias de origem suíça e austríaca (Vilariño-Güell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011). Mutações patogênicas no *VPS35* podem causar uma disfunção no sistema de transporte retrógrado e contribuir para a morte de neurônios dopaminérgicos na DP. Além disso, podem causar disfunção no tráfego endossomo-lisossomo, similar à *SNCA* e ao *LRRK2*, que estão envolvidos com o tráfego de vesículas (Caudle *et al.*, 2008; Berwick & Harvey, 2011; Vilariño-Güell, *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011; Guella *et al.*, 2012; Sheerin *et al.*, 2012). Além da mutação p.D620N, a variante p.R524W (c.1570C>T) foi reportada como sendo possivelmente patogênica (Zimprich *et al.*, 2011).

Gene *LRRK2*

O gene *Leucine-Rich repeat Kinase 2* (*LRRK2*) (OMIM 609007) mapeia em 12q12, possui 144kb de extensão, 51 exons e codifica a proteína dardarina ou *LRRK2* de 2527 aminoácidos. A dardarina possui peso molecular ~280 kDa e contém os domínios ARM (Armadillo), ANK (*Ankyrin repeat*), LRR (*leucine rich repeat*), ROC (*Ras of complex proteins; GTPase*), COR (*C-terminal of ROC*), MAPKKK (*mitogen activated kinase kinase kinase*) e WD40 (Schulte & Gasser, 2011). Sugere-se que ela esteja envolvida na organização do citoesqueleto e do microtúbulo, no tráfego vesicular e na dinâmica de membrana, em eventos de sinalização, no processamento de microRNA, na neurotransmissão estriatal, na arborização neuronal, na endocitose, na autofagia e na imunidade (MacLeod *et al.*, 2006; Gehrke *et al.*, 2010; Cookson, 2012; Matta *et al.*, 2012; Berwick & Harvey, 2012; Tsika & Moore, 2012) (Figura 10).

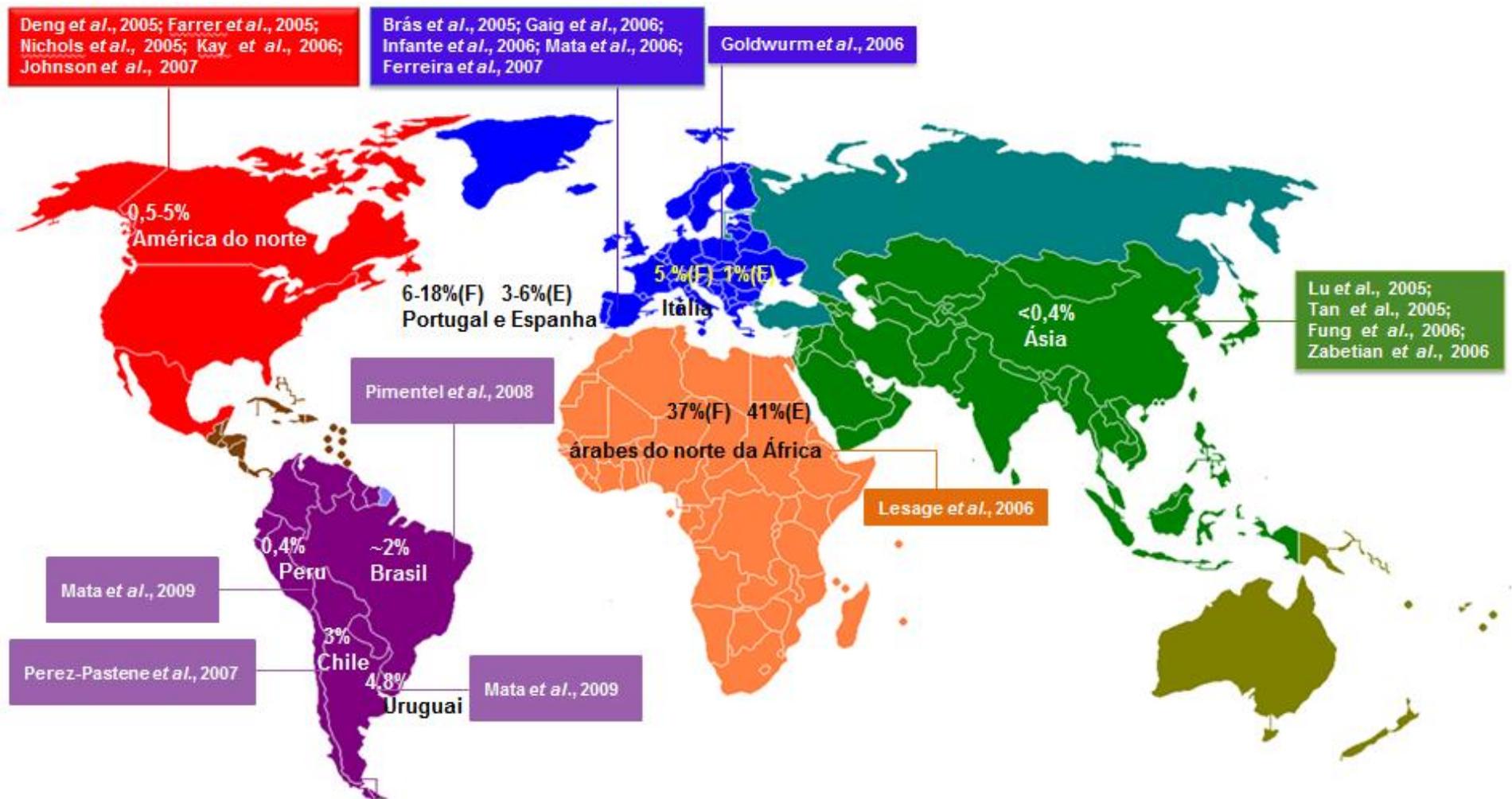
Figura 10- Localização do gene *LRRK2* em 12q12

Legenda: A figura mostra o modelo de regulação do dímero dardarina proposto por Deng e colaboradores (2008). (A) Com a hidrólise do GTP a GDP, mudanças conformacionais do dímero ROC (verde e amarelo) interrompem o dímero COR (azul claro) e MAPKKK, inativando a atividade quinase (azul). (B) Na ligação ao GTP o domínio ROC dimérico (verde e amarelo) induz a dimerização COR (azul claro), induzindo a auto-interação do domínio MAPKKK, resultando em sua atividade de fosforilação (vermelho). As mutações analisadas neste estudo estão apontadas na representação gráfica do exoma do gene *LRRK2* (Fonte: Deng *et al.*, 2008, com modificações).

Vários estudos têm mostrado que mutações de ponto no gene *LRRK2* explicam entre 5 a 13% dos casos familiares e 1 a 5% dos casos esporádicos da DP (Karbe *et al.*, 1992; Litvan *et al.*, 1996; Juh *et al.*, 2004; Tan & Skipper, 2007; Williams *et al.*, 2007; Jellinger, 2008; Pinkhardt *et al.*, 2008; Teune *et al.*, 2010). Estudos de dosagens do *LRRK2* objetivando a detecção de CNVs (número de cópias variáveis) não detectaram multiplicações ou deleções (Mata *et al.*, 2005; Paisán Ruíz *et al.*, 2008; Nuytemans *et al.*, 2009). A frequência das mutações identificadas no gene *LRRK2* é dependente do grupo étnico ou da população em estudo. Mutações de sentido trocado no *LRRK2* representam a causa mais comum

da DP familiar (Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004). Até o momento, sete mutações patogênicas foram confirmadas no *LRRK2* (p.N1437H, p.R1441C; p.R1441G; p.R1441H, p.Y1699C, p.G2019S e p.I2020T) (Farrer & Ross, 2006; Aasly *et al.*, 2010). A mutação mais frequentemente encontrada é a p.G2019S (c.6055G>A), localizada no domínio quinase MAPKKK, sendo relatada em alta frequência em árabes norte africanos (37% dos casos familiares e 41% dos casos esporádicos) (Lesage *et al.*, 2006) e em Judeus *Ashkenazi* (29% dos casos familiares e 13% dos casos esporádicos) (Ozelius *et al.*, 2006). Em contraste, a mutação p.G2019S é muito rara nas populações asiáticas (< 0,4%) (Lu *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2006; Zabetian *et al.*, 2006). Essa variante tem penetrância incompleta associada à idade, sendo 28% aos 59 anos, 51% aos 69 anos e 74% aos 79 anos (Gan-Or *et al.*, 2012). Há relatos, porém, de octogenários que, apesar de terem essa mutação, não apresentam sintomas clínicos da DP (Kay *et al.*, 2005; Gaig *et al.*, 2006) (Figura 11).

Figura 11- Frequência da mutação p.G2019S em diferentes regiões do mundo



Legenda: (F): frequências encontradas em casos familiares; (E) frequências encontradas em casos esporádicos
 Fonte: O autor, 2015.

Variantes exônicas raras (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C) no gene *LRRK2*

Outras variantes exônicas raras têm sido descritas no gene *LRRK2* associadas à DP, apesar de ainda não terem seu papel esclarecido na etiologia da doença. Nichols e colaboradores (2007) em um estudo no qual sequenciaram todos os 51 exons do gene *LRRK2* em pacientes de 88 famílias, em sua maioria, de origem europeia, encontraram a variante p.Q1111H (c.3333G>T) em 2 irmãos hispânicos, estando ela ausente em 368 controles saudáveis de etnia branca. Sendo a glutamina na posição 1111 altamente conservada na maioria das espécies, uma mudança nesse aminoácido pode modificar o domínio LRR e ter um impacto na atividade da dardarina.

A variante p.T1410M (c.4229C>T) foi encontrada em maior frequência em pacientes com DP (9,3%) quando comparados a controles saudáveis (4,9%) (Lesage *et al.*, 2009), embora tenha sido considerada não patogênica pelos autores, que sugerem a necessidade de mais estudos para saber se essa variante é um fator de risco para DP ou uma variante não patogênica. O aminoácido treonina localizado no domínio ROC é altamente conservado na posição 1410 e análises *in silico* demonstraram que essa alteração é possivelmente patogênica (Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010).

A substituição p.M1646T (c.4937T>C) foi inicialmente reconhecida como uma variante não associada à DP, com frequências variando entre 0,02% a 2,42% (Zimprich *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2005; Di Fonzo *et al.*, 2006; Nuytemans *et al.*, 2009). Entretanto, recentemente, Ross e colaboradores (2011), identificaram a variante p.M1646T como sendo o primeiro fator de risco comum na população branca com um *odds ratio* (OR) de 1,43.

A mutação p.S1761R (c.5281A>C) foi identificada em 3 pacientes espanhóis com história familiar de DP e análises *in silico* indicam que essa mudança do aminoácido de serina para arginina é prejudicial para a proteína devido a diminuição da atividade GTPase e conseqüentemente da atividade quinase da dardarina (Lorenzo-Betancor *et al.*, 2012).

A variante exônica p.Y2189C (c.6555A>G) foi encontrada inicialmente em um paciente belga com DP familiar (Nuytemans *et al.*, 2008). Estudos posteriores

conduzidos em pacientes norte africanos e árabes berberes encontraram associação de risco dessa variante com a DP (Jasinska-Myga *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Além disso, análises *in silico* indicam que a variante p.Y2189C pode ser deletéria para a função da dardarina (Nuytemans *et al.*, 2008).

Variantes exônicas comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K) no gene *LRRK2*

Ao contrário das variantes descritas anteriormente, o haplótipo formado pelas variantes exônicas comuns p.N551K (c.1653C>G), p.R1398H (c.4193G>A) e p.K1423K (c.4269G>A) parece conferir proteção à doença de Parkinson através da redução da atividade quinase da dardarina (Tan *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Acredita-se que a variante p.R1398H diminui a toxicidade celular através da redução da atividade quinase da proteína (Ito *et al.*, 2007). O papel da variante de sentido trocado p.N551K e da variante silenciosa p.K1423K no haplótipo protetor ainda é desconhecido.

Estudos conduzidos em populações latino-americanas correlacionando a presença de variantes genéticas com susceptibilidade ao risco ou à proteção para a doença de Parkinson são escassos ou inexistentes. Assim, julgamos que a análise molecular voltada para a identificação de alterações exônicas nos genes *EIF4G1*, *VPS35* e *LRRK2* em uma ampla amostra de pacientes brasileiros com esta patologia irá contribuir para o melhor entendimento da relação entre essas variantes genéticas e a doença em questão, principalmente no que se refere aos endofenótipos associados.

1 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal conduzir a análise molecular de variantes exônicas raras ou comuns nos genes *eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1 (EIF4G1)*, *vacuolar protein sorting 35 (VPS35)* e *Leucine-Rich repeat Kinase 2 (LRRK2)* em uma ampla amostra de indivíduos brasileiros com doença de Parkinson, bem como em um grupo de indivíduos controles saudáveis, com o intuito de verificar se existe associação entre as variantes estudadas e o desenvolvimento da DP em casuística brasileira.

1.1 Objetivos específicos:

- a) Rastrear a presença das mutações raras nos genes *EIF4G1* (p.R1205H; p.A502V), *VPS35* (p.D620N; p.R524W) e *LRRK2* (p.G2019S) na amostra selecionada;
- b) Estabelecer correlações genótipo-fenótipo entre os pacientes com uma mesma mutação;
- c) Avaliar a frequência genotípica e alélica das variantes de ponto p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene *LRRK2* em casos e controles e a associação dessas variantes com a DP;
- d) Avaliar a frequência genotípica e alélica das variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2* em casos e controles bem como a frequência haplotípica e a associação com a DP;
- e) Avaliar se existe desequilíbrio de ligação entre as variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*.

2 METODOLOGIA

2.1 Pacientes com DP e indivíduos controles saudáveis

Os pacientes foram avaliados por médicos neurologistas especialistas em distúrbios de movimento, de acordo com os critérios clínicos recomendados para a DP, que incluíam a presença de pelo menos três das manifestações motoras que caracterizam a doença (tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural). Os probandos foram triados nos ambulatórios de doenças de movimento do: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC/UFRJ), Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE), Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro (SCM), Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP/UFF), Instituto Integrado de Neurociências de Goiânia (IINEURO) e Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV/UFAM). Os indivíduos foram classificados como casos esporádicos, quando não havia história familiar da doença ou como casos familiares, havendo ao menos um parente de primeiro ou segundo grau com DP. O grupo controle compreendeu indivíduos saudáveis de mesma faixa etária que não apresentavam sinais ou sintomas da DP ou de qualquer outra doença neurodegenerativa. Os indivíduos participantes deste estudo foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa. A coleta do material biológico para análise molecular foi realizada apenas após a autorização dos participantes, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A e B). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro [Protocolo de pesquisa nº 032.2.2008 – Parecer 026/2013 (adendo ao projeto)] (Anexo C) e os procedimentos adotados seguiram as normas éticas do CNS/MS (Resolução 466/2012) que regem as pesquisas envolvendo seres humanos.

2.2 Desenho amostral relativo ao estudo dos pacientes com DP

2.2.1 Mutações nos genes *EIF4G1*, *VPS35* e *LRRK2*

As análises moleculares das mutações nos genes *VPS35* (p.D620N; p.R524W), *EIF4G1* (p.R1205H; p.A502V) e *LRRK2* (p.G2019S) foram conduzidas em 582 pacientes brasileiros com DP não aparentados. Foi realizado um rastreamento adicional de 319 controles saudáveis para as mutações nos genes *EIF4G1* e *VPS35*. O grupo de pacientes incluiu 367 homens e 215 mulheres, com idades variando entre 16 e 96 anos (idade média $60,73 \pm 12,52$; idade de manifestação média $52,49 \pm 13,24$ anos). Entre eles, 59% tiveram DP tardia típica (≥ 50 anos) e os demais desenvolveram os primeiros sinais da doença antes dos 50 anos. Dos 582 pacientes analisados, 33,7% reportaram história familiar da DP e 66,3% eram casos esporádicos. O grupo controle incluiu 319 indivíduos saudáveis (112 homens e 207 mulheres) (faixa etária: 50-98 anos; idade média: $69,98 \pm 9,40$ anos). A mutação p.G2019S não foi estudada no grupo controle visto que ela foi anteriormente rastreada por Beatriz de Carvalho Guimarães em sua monografia em 168 indivíduos controles saudáveis e essa mutação se mostrou ausente (Guimarães et al., 2009).

2.2.2 Variantes exônicas raras e comuns no gene *LRRK2*

As análises moleculares de variantes no gene *LRRK2* foram restritas aos pacientes da região sudeste do Brasil, sendo os pacientes de outras regiões excluídos com o intuito de reduzir o número de variáveis atuantes sobre a amostra em questão. As variantes no gene *LRRK2* foram classificadas em dois grupos: raras (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R, p.Y2189C) e comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K). O rastreamento das variantes raras e comuns no gene *LRRK2* foi conduzido em 551 indivíduos não aparentados: 329 pacientes com DP (229 do Rio de Janeiro, 39 de São Paulo, 42 de Minas Gerais e 19 do Espírito

Santo) e 222 controles saudáveis. O grupo de pacientes incluiu 200 homens e 129 mulheres, com idade variando entre 16 e 96 anos (idade média $61,77 \pm 12,45$ anos; idade de manifestação média $53,49 \pm 13,58$ anos). Entre eles, 60,81% tiveram DP tardia (≥ 50 anos) e os demais desenvolveram os primeiros sinais da doença antes dos 50 anos. Dos 329 pacientes analisados, 217 (65,9%) eram casos isolados e 112 (34,1%) reportaram história familiar da DP. Os 222 indivíduos controles saudáveis (107 homens e 115 mulheres) residiam no Estado do Rio de Janeiro (faixa etária: 50-98 anos; idade média $65,59 \pm 10,15$ anos).

Nas análises das variantes comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K), foram realizadas estratificações na amostra de pacientes do sudeste para verificar se existiam resultados mascarados devido à forma da DP (familiar ou esporádica), à idade de manifestação (tardia), bem como, ao efeito geográfico (Estado do Rio de Janeiro *versus* outros Estados do sudeste). Assim, a amostra do sudeste foi estratificada em: (1) pacientes com DP esporádica; (2) pacientes com DP familiar; (3) pacientes com DP tardia (≥ 50 anos) e (4) pacientes provenientes do Estado do Rio de Janeiro (Tabela 2). Estas análises foram realizadas em comparação ao grupo de 222 indivíduos controles saudáveis residentes no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 2- Características da amostra estratificada de pacientes com DP

Características	Sudeste Esporádico	Sudeste Familiar	Sudeste ≥ 50 anos	Rio de Janeiro
Tamanho da amostra	193 (118 ♂; 75 ♀)	108 (71 ♂; 37 ♀)	190 (120 ♂; 70 ♀)	206 (130 ♂; 76 ♀)
Faixa etária	33-88	21-90	53-91	21-96
Idade média (\pm desvio padrão)	62,40 ($\pm 11,11$)	63,03 ($\pm 12,76$)	68,14 ($\pm 8,60$)	61,34 ($\pm 11,93$)
Idade de manifestação média (\pm desvio padrão)	54,51 ($\pm 11,34$)	55,29 ($\pm 12,63$)	61,94 ($\pm 8,25$)	53,61 ($\pm 11,91$)
Casos isolados	193	0	122	146
Casos familiares	0	108	68	60
Manifestação da DP < 50 anos	71	40	0	85
Manifestação da DP ≥ 50 anos	122	68	190	121

2.3 Coleta de material biológico e extração de DNA genômico

A coleta de sangue periférico ou de saliva foi realizada por um técnico em análises clínicas, seguindo normas de plena assepsia. Foram coletados 5 mL de sangue periférico utilizando-se tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Para a extração de DNA genômico do sangue, foi utilizado o Kit comercial *illustra™ blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare)*. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 300 µL da amostra de sangue, 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 400 µL de tampão de lise tipo 10 (1-2 mg/mL). Essa solução foi misturada em agitador vórtex, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, a solução foi centrifugada. O sobrenadante foi transferido para uma coluna e centrifugado durante 1 minuto a 11.000 rpm. O sobrenadante formado nessa etapa foi descartado e à coluna foram acrescentados 500 µL de tampão de lise tipo 10 (1-2 mg/mL), sendo esta centrifugada novamente por 1 minuto a 11.000 rpm. Ao final desta etapa, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados à coluna 500 µL de tampão de lavagem tipo 6 (24 mL de etanol absoluto em 120 mL de tampão de lavagem tipo 6), sendo essa centrifugada por 3 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de tampão de eluição 5 (10mM de KHCO₃; 155 mM de NH₄Cl; 0,1 mM de EDTA) a 70° C e incubado por um minuto à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se à centrifugação durante 1 minuto a 11.000 rpm para retirada do DNA da coluna. As etapas de centrifugação foram realizadas em uma centrífuga *eppendorf* modelo 5417R com rotor de 6 cm de raio.

Na extração de DNA a partir da amostra de saliva, utilizou-se o Kit *ORAGENE™ DNA self-collection (DNAGENOTEK)*. Para a coleta adequada da saliva, algumas recomendações foram feitas, que consistiam em não beber, comer ou fumar 30 minutos antes da realização do procedimento. No momento da coleta, a amostra de saliva foi misturada delicadamente com a solução contida no frasco coletor e mantida à temperatura ambiente. Em sequência, a amostra foi incubada em banho-maria a 50° C por, no mínimo, 1 hora e 500 µL dessa amostra foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 20 µL de *Oragene Purifier* (fornecido pelo fabricante) a essa solução, que foi misturada em vórtex por alguns

segundos. Em seguida, a solução foi incubada em gelo durante 10 minutos e centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, cuidadosamente descartando o precipitado com as impurezas. Foram adicionados 500 µL de etanol 95-100% para cada 500 µL de sobrenadante, misturando-se delicadamente, sendo a amostra incubada por 10 minutos à temperatura ambiente para a precipitação do DNA. A seguir, o microtubo foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido com cuidado e descartado para não revolver o precipitado. A este foram adicionados 100 µL de tampão TE [Tris 10 mM (*GE Healthcare*)-HCl (*MERCK*); EDTA 1 mM (*GE Healthcare*); pH 7,4].

Em ambos os métodos de extração utilizados, foram obtidas duas alíquotas de DNA em microtubos de 1,5 mL para cada paciente, sendo uma delas armazenada a 4° C e a outra a -20° C.

2.4 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

A integridade das amostras de DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (*Bioagency*) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare*), ácido bórico 89 mM (*MERCK*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare*)]. As preparações das amostras foram feitas através da adição de 1 µL da alíquota de DNA a 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (*GE Healthcare*); xileno cianol 0,25% (*GE Healthcare*); glicerol 30 % (*ISO FAR*)], 1 µL de GelRed™ diluído previamente em 500 µL de água destilada (*Uniscience*) e 8 µL de água deionizada (*MilliQ*). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal [MS 250V Power Supply (*Major Science*)] por 1 hora a 60 V, 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*)]. A intensidade e integridade da banda de cada amostra de DNA foi comparada com o padrão de DNA de Bacteriófago λ (*Thermo Fisher Scientific*) de 100 ηg/µL.

A concentração das amostras de DNA foi aferida através de espectrofotometria em um NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). No preparo

das amostras foi utilizado 1 µL de alíquota de DNA e o tampão de eluição 5 (10mM de KHCO₃; 155 mM de NH₄Cl; 0,1 mM de EDTA) como branco na calibração do equipamento para os DNAs extraídos a partir do sangue e o tampão TE [Tris 10 mM (*GE Healthcare*), HCl (*MERCK*), EDTA 1 mM (*GE Healthcare*); pH 7,4] para os DNAs que foram extraídos a partir da saliva. A estimativa da concentração da amostra e o grau de pureza (contaminação por proteínas, fenóis e carboidratos) foram calculados pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita.

2.5 Análise molecular

2.5.1 Análise molecular da mutação LRRK2 p.G2019S

2.5.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para avaliar a presença da mutação p.G2019S no exon 41 do gene *LRRK2* foi realizada a amplificação do DNA através da técnica de PCR, seguida por digestão enzimática. Um par de *primers* (*Invitrogen*), descrito por Di Fonzo e colaboradores (2005), foi utilizado, correspondendo aos *primers* PARK8_41F (5' TTT TGA TGC TTG ACA TAG TGG AC 3') e PARK8_41R (5' CAC ATC TGA GGT CAG TGG TTA TC 3'). As condições finais das reações estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3- Condições utilizadas na PCR para a amplificação do exon 41 do gene *LRRK2*.

Reagentes	Éxon 41
Tampão de reação 10X (<i>BIOTOOLS</i>)*	1X
dNTPs 5 mM (<i>GE Healthcare</i>)	200 µM
MgCl ₂ 50 mM (<i>BIOTOOLS</i>)	2,0 mM
Primer F 10 µM (<i>Invitrogen</i>)	0,4 µM
Primer R 10 µM (<i>Invitrogen</i>)	0,4 µM
Taq DNA polimerase 1U/µL (<i>BIOTOOLS</i>)	1,0 U
DNA ~50 ηg	2 ηg
Volume final	25,0 µL

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

As condições de ciclagem utilizadas incluíram: desnaturação inicial a 95° C por 6 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto, hibridização a 60° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos; e extensão final a 72° C por 7 minutos. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (*Thermo Fisher Scientific*). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20° C.

2.5.1.2 Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação

Para avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (*Thermo Fisher Scientific*), 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 µL da alíquota da reação de PCR a 1 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 80 V, por 1 hora em cuba horizontal [MS 250V Power Supply (*Major Science*)], utilizando como tampão de corrida TBE 1X. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um

transiluminador de luz ultravioleta [modelo TM 20 (UVP)] e para confirmação do tamanho dos amplicons (329pb) foi utilizado o padrão de tamanho de fragmento expresso em pares de bases 1 kb DNA ladder (*Thermo Fisher Scientific*).

2.5.1.3 Identificação da mutação LRRK2 p.G2019S por PCR-RFLP

Parte do rastreamento da mutação p.G2019S (204 pacientes com DP) foi realizada por Cláudia Abdalla Carvalho em sua tese de doutorado (Abdalla-Carvalho, 2011). Para analisar a presença da mutação p.G2019S nos pacientes com DP foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), com base nos comprimentos diferenciados dos fragmentos gerados pela digestão enzimática dos produtos da PCR, visto que esta mutação cria um novo sítio de restrição para a enzima. Após a visualização da amplificação em gel de agarose 1%, os amplicons foram digeridos com a enzima de restrição *Sfcl* (*New England*). Uma mistura contendo 16,5 µL de água MilliQ, 10 µL do produto da PCR, 3 µL de tampão da enzima (1X NEBuffer 4) (*New England*) com 5 U da enzima *Sfcl* (*New England*) foi mantida por 16 horas a 37° C. Após a digestão, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (*GE Healthcare*) não desnaturante.

A composição do gel consistia em 1,25 mL de solução de acrilamida (*GE Healthcare*): bis acrilamida 20% (19:1) (*GE Healthcare*), 0,25 mL de tampão TBE 10X, 35 µL de persulfato de amônio 10% (*GE Healthcare*), 5 µL de TEMED (*Invitrogen*) e 3,46 mL de água MilliQ. Dez microlitros do produto da digestão foram adicionados a 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (*GE Healthcare*); xileno cianol 0,25% (*GE Healthcare*); glicerol 30% (*ISOFAR*)], sendo a preparação aplicada no gel. A eletroforese foi realizada em uma cuba vertical Mini-Protean (*BIO RAD*) a uma voltagem de 110 V por aproximadamente 1 hora. Para confirmação do tamanho dos amplicons foi utilizado o padrão de tamanho de fragmento expresso em pares de bases de 1 kb DNA ladder (*Thermo Fisher Scientific*). O fragmento da PCR de 329 pb é clivado na presença do alelo G (selvagem) em dois fragmentos de 228 pb e 101 pb. Na presença do alelo A (mutado) o amplicon é clivado em três fragmentos de 207, 101 e 21 pb. Para fins de

comparação, uma amostra de DNA não-digerida e uma amostra de um paciente sabidamente portador da mutação p.G2019S foram aplicadas no gel.

Após a eletroforese, o gel foi imerso sob agitação moderada em uma solução fixadora [ácido acético 0,5% (*Isofar*), etanol 10% (*Isofar*)] por 2 minutos, corado em uma solução de nitrato de prata [ácido acético 0,5% (*Isofar*), etanol 10% (*Isofar*) e AgNO_3 0,2% (*MERCK*)] por 10 minutos e lavado em água destilada por 20 segundos. Após a lavagem, o gel foi revelado em uma solução contendo 3% de hidróxido de sódio (*Isofar*) e 0,1% de formaldeído (*MERCK*) por 10 minutos e fixado em uma solução fixadora [ácido acético 0,5% (*Isofar*), etanol 10% (*Isofar*)] por 2 minutos.

2.5.1.4 Sequenciamento automático

As amostras com a mutação p.G2019S, identificadas através da técnica de PCR-RFLP, foram confirmadas por meio de sequenciamento automático a partir de uma nova reação de amplificação.

2.5.1.5 Purificação dos produtos da PCR

Após a amplificação, as amostras foram purificadas. Nesta etapa, 20 μL do produto da PCR foram purificados utilizando o Kit de purificação AccuPrep[®] PCR Purification (*Bioneer*), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, que consistia em lavagem com tampões específicos e centrifugações.

2.5.1.6 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos purificados da PCR foram preparadas em um volume final de 10 μL utilizando o kit BigDye Terminator v3.1

(*Thermo Fisher Scientific*), contendo: 50 ng do DNA purificado; 3,2 pmol do *primer* senso ou antisenso; 1,0 µL de tampão (*Thermo Fisher Scientific*), 0,5 µL do Kit (*Thermo Fisher Scientific*) e água para um volume final de 10 µL de reação. As reações foram realizadas em uma placa contendo 96 poços [MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (*Thermo Fisher Scientific*)] e conduzidas no termociclador Veriti modelo 9902 (*Thermo Fisher Scientific*). A ciclagem compreendeu 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos, hibridização 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% e, em seguida, a placa foi centrifugada a 3.000 rpm (*SIGMA*, 2-16) por 50 minutos. 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 (*Thermo Fisher Scientific*) por 5 minutos a 75° C para a secagem. O material precipitado foi ressuspensão em 10 µL de formamida *Hi Di* (*Thermo Fisher Scientific*) e levado ao termociclador por 5 minutos a 95° C para desnaturação. A placa com as amostras foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto e levada ao sequenciador automático ABI Prism 3130 (*Thermo Fisher Scientific*) para o processamento das amostras.

A análise das sequências foi realizada através do programa computacional BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (Isis Pharmaceuticals, Inc) (Hall, 1999). Os indivíduos que apresentaram variação nas sequências tiveram uma nova alíquota do DNA analisada para a confirmação da variante encontrada.

2.5.1.7 Correlação genótipo-fenótipo

Em relação aos pacientes identificados com a mutação p.G2019S no gene *LRRK2*, foi realizado o levantamento detalhado das características clínicas desses indivíduos, com a colaboração dos médicos participantes do estudo. Em seguida, foi realizado o teste t de *student* com a utilização do programa GraphPad Prism versão

6 para comparar a média das idades de manifestação dos portadores desta mutação e dos não portadores, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

2.5.2 Análise molecular das mutações nos genes *EIF4G1*, *VPS35* e das variantes exônicas no gene *LRRK2*

O rastreamento das mutações nos genes *EIF4G1* (p.R1205H; p.A502V), *VPS35* (p.D620N; p.R524W) e das variantes raras (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R, p.Y2189C) e comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K) no gene *LRRK2* foi realizado através da aplicação da técnica de discriminação alélica por PCR em Tempo Real (qPCR) (Tabela 4).

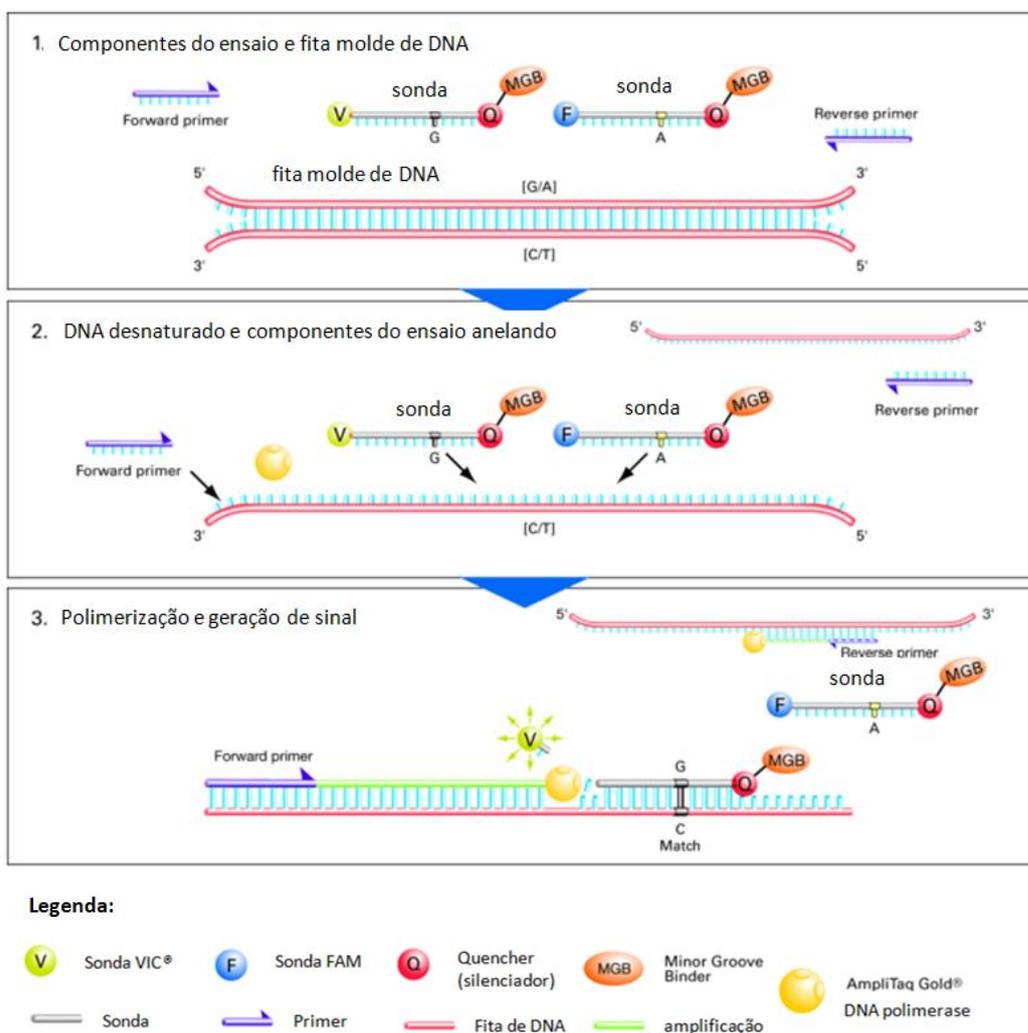
Tabela 4- Informações das variantes estudadas nos genes *EIF4G1*, *VPS35* e *LRRK2*

Gene	cDNA	Aminoácido	Número de acesso
<i>EIF4G1</i>	c.1505C>T	p.A502V	rs111290936
	c.3614G>A	p.R1205H	rs112176450
<i>VPS35</i>	c.1570C>T	p.R524W	rs184277092
	c.1858G>A	p.D620N	rs188286943
<i>LRRK2</i>	c.1653C>G	p.N551K	rs7308720
	c.3333G>T	p.Q1111H	rs78365431
	c.4193G>A	p.R1398H	rs7133914
	c.4229C>T	p.T1410M	rs72546327
	c.4269G>A	p.K1423K	rs11175964
	c.4937T>C	p.M1646T	rs35303786
	c.5281A>C	p.S1761R	-
	c.6566A>G	p.Y2189C	rs35658131

- Não há número de acesso para a variante

A discriminação alélica é possível através da utilização de ensaios via sondas *TaqMan*[®] MGB (*Thermo Fisher Scientific*). Cada ensaio é composto por um par de *primers* e um par de sondas alelo específicas (Figura 12).

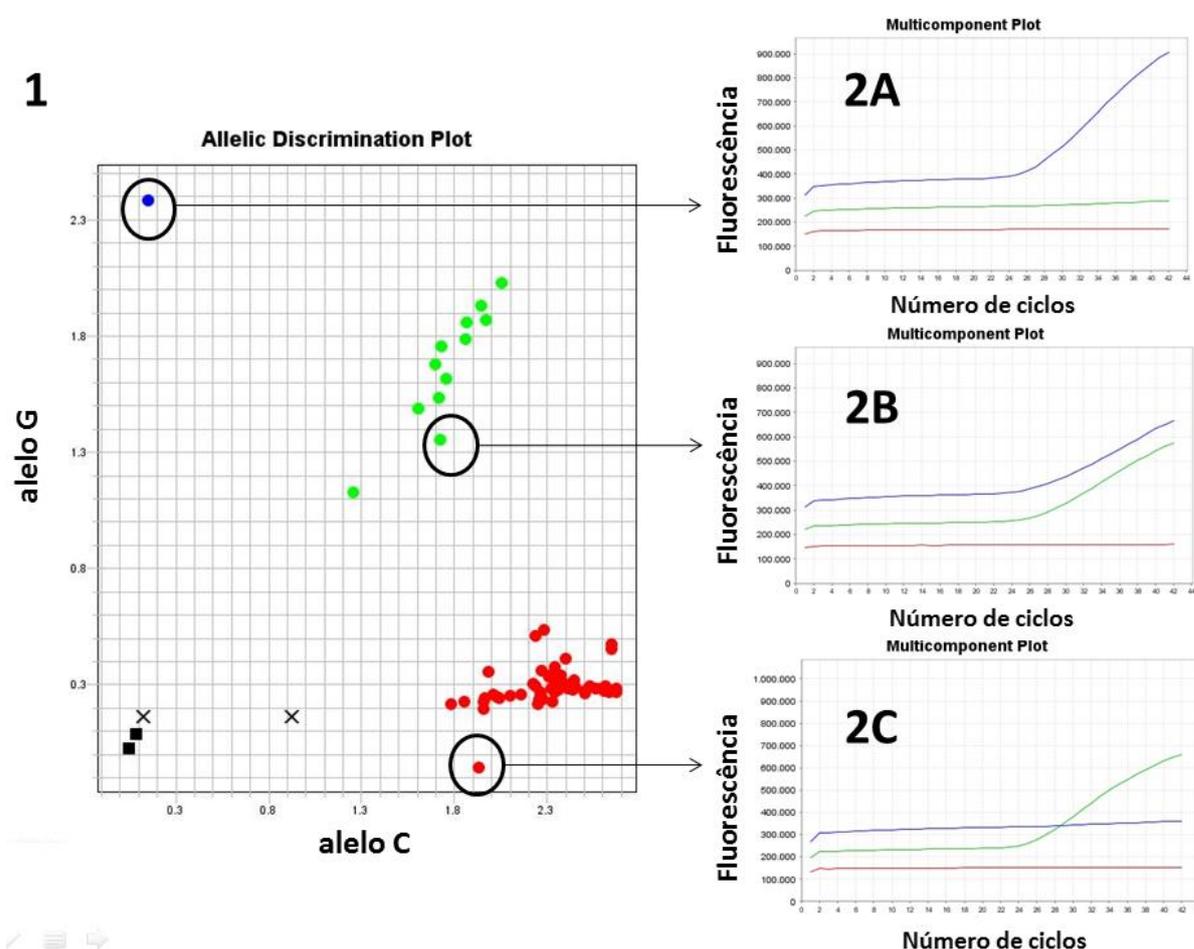
Figura 12- Discriminação alélica através de ensaios via sondas *TaqMan*[®] MGB (*Thermo Fisher Scientific*)



Legenda: (1) O ensaio via sondas *TaqMan*[®] MGB é composto pelos primers *forward* e *reverse* e pelas sondas VIC e FAM. As sondas são marcadas com o fluoróforo *quencher* (silenciador) na extremidade 3' e com o fluoróforo *reporter* (repórter) na extremidade 5'. (2) As sondas são alelo-específicas e diferem em sua composição apenas na posição do nucleotídeo a qual se pretende estudar, desta forma, uma sonda irá hibridizar apenas na sequência de DNA selvagem, enquanto a outra, na sequência que contém a alteração. (3) Na etapa de polimerização as sondas hibridizadas serão degradadas por meio da atividade exonuclease 5' → 3' da enzima *Taq* DNA polimerase. Isso fará com que o *reporter* se distancie do *quencher*, de modo que o *reporter* não terá mais sua fluorescência absorvida pelo *quencher* e sua emissão poderá ser detectada através da excitação com luz em seu comprimento de onda específico. A sonda que não hibridizar continuará intacta com o *reporter* e o *quencher* próximos e a fluorescência não será detectada. Assim, a inferência dos genótipos obtidos pelo qPCR se dá pela intensidade das fluorescências (Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2010, com modificações).

Ao final da amplificação é possível fazer a discriminação alélica através da separação das amostras em três grupos distintos (que correspondem aos três possíveis genótipos em cada *locus*) no gráfico *Allelic Discrimination Plot* fornecido pelo programa SDS v.2.0.6 (*Thermo Fisher Scientific*). Após a análise inicial do *Allelic Discrimination Plot*, é feita a confirmação dos genótipos através do *Multicomponent plot* (Figura 13).

Figura 13- Análise através das ferramentas *Allelic Discrimination Plot* e *Multicomponent Plot* (*Thermo Fisher Scientific*)



Legenda: (1) Resultado fornecido pelo *Allelic Discrimination Plot* onde é possível verificar a separação dos três grupos de genótipos para a variante LRRK2 p.N511K, mostrando os genótipos CC (vermelho), CG (verde) e GG (azul). Os quadrados pretos são os controles brancos e os "X" são amostras indeterminadas. (2) Resultado fornecido pela ferramenta *Multicomponent Plot*, onde é possível a confirmação dos dados analisados anteriormente pelo *Allelic Discrimination Plot*, através da intensidade das fluorescências VIC (verde) e FAM (azul), sendo a fluorescência vermelha o marcador de referência passiva ROX. (2A) homocigoto polimórfico (GG), (2B) heterocigoto (CG), (2C) homocigoto selvagem (CC).

Existem dois tipos de ensaios: *Assay on Demand*, que são ensaios já disponíveis, testados e validados pela *Thermo Fisher Scientific* e *Assay by Design*, que são aqueles ainda não disponíveis e que precisam ser desenhados.

Recorrendo ao uso do *Assay by Design TaqMan[®] MGB (Thermo Fisher Scientific)*, foram desenhados ensaios para as variantes p.D620N, p.R524W, p.R1205H, p.A502V, p.Q1111H, p.R1398H, p.T1410M, p.K1423K, p.M1646T e p.S1761R. As sequências específicas das regiões de interesse foram conferidas por meio da ferramenta BLAST, disponível no banco de dados genômicos *on line* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), no intuito de verificar se existiam regiões de homologia com alto grau de similaridade com outros genes ou no mesmo gene. Posteriormente, as sequências foram analisadas e validadas no programa *on line RepeatMasker 4.0.5* (<http://repeatmasker.org>), a fim de verificar a existência de regiões de DNA repetitivo que pudessem mascarar a eficiência de reconhecimento das sondas. Por fim, as sondas *TaqMan[®] MGB (Thermo Fisher Scientific)* foram desenhadas com o auxílio do *software File Builder 3.1 (Thermo Fisher Scientific)*. Todas elas foram desenhadas de forma que a sonda VIC se anelasse ao alelo selvagem e a sonda FAM ao alelo mutado. Os ensaios para as variantes p.N551K e p.Y2189C foram realizados via sistema de ensaios *Assay on Demand TaqMan[®] MGB (Thermo Fisher Scientific)*.

As reações de qPCR tiveram um volume final de 5 μ L, sendo compostas por 1 μ L de DNA genômico (15 η g), 0,125 μ L do ensaio *TaqMan[®] MGB (Thermo Fisher Scientific)*, 2,5 μ L de *TaqMan[®] Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific)* e 1,375 μ L de água ultra pura MilliQ. As condições de ciclagem obedeceram às recomendações do fabricante num programa padrão de 1 min a 60° C, 10 min de desnaturação a 95° C, seguido por 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95° C, 1 min de hibridização e extensão a 60° C e um adicional de 1 min de extensão final a 60° C. A leitura da fluorescência foi realizada pelo equipamento 7500 FAST *Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)* e posteriormente analisada pelo software V.2.0.6 (Versão 2.0.6, *Thermo Fisher Scientific*).

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas das variantes raras e comuns no gene *LRRK2* foram realizadas de modos distintos, visto que para as variantes comuns é esperado encontrar os três genótipos possíveis, enquanto as variantes raras são geralmente encontradas apenas em heterozigose.

2.6.1 Análise estatística para as variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene *LRRK2*

Para as variantes raras (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R, p.Y2189C) no gene *LRRK2* foram realizadas as análises das frequências alélicas e genotípicas em casos e controles através do programa estatístico R v.3.0.2. Posteriormente, foi realizada a comparação entre as frequências das alterações raras nos pacientes e nos controles através do teste exato de Fisher, considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Este cálculo, bem como o cálculo de *Odds Ratio* (OR) com um intervalo de confiança (IC) de 95%, foi realizado utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6. Levando-se em conta o IC, o valor de p e o OR, $OR > 1$ indica susceptibilidade, $OR = 1$ não há associação com a doença e $OR < 1$ indica proteção.

2.6.2 Análise estatística das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

As frequências genotípicas das variantes comuns (p.N551K, p.R1398H, p.K1423K) no gene *LRRK2*, nos grupos caso e controle, foram testadas com o auxílio do teste de Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates, para avaliar se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

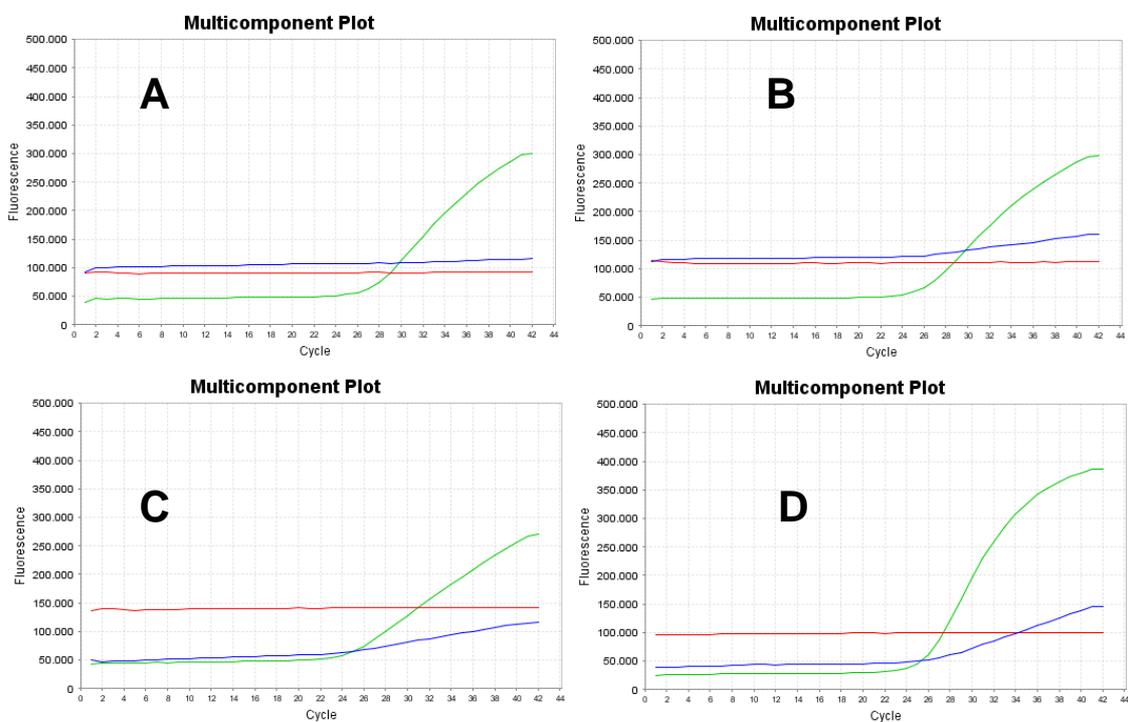
As frequências alélicas e genóticas nos grupos caso e controle foram comparadas utilizando o modelo de regressão logística, com e sem o ajuste para as co-variáveis sexo e idade. Esta metodologia foi utilizada tanto para as análises de cada variante isolada quanto para os haplótipos. As análises foram realizadas em referência à contagem alélica, à contagem dos carreadores do alelo (incluindo heterozigotos e homozigotos) e à contagem genotípica. Os resultados das regressões logísticas para as variantes foram obtidos tomando como base para as comparações o alelo, genótipo e haplótipo mais frequente de cada variante. As frequências haplotípicas foram estimadas através de máxima verossimilhança e também foram comparadas entre casos e controles. A análise de OR foi usada como estimativa de associação, com IC de 95%. Levando-se em conta o IC, o valor de p e o OR, $OR > 1$ indica susceptibilidade, $OR = 1$ não há associação com a doença e $OR < 1$ indica proteção. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R v.3.0.2, utilizando os pacotes *Genetics*, *Design* e *Haplo.stats*. O parâmetro r^2 foi utilizado, através do programa *HaploView* 4.2, para verificar se a combinação das variantes no grupo controle estava em desequilíbrio de ligação (DL). Os critérios estabelecidos pelo projeto *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) indicam que SNPs com valores de $r^2 > 0.80$ estão em alto DL, ou seja, estão segregando juntos na forma de haplótipo.

3 RESULTADOS

3.1 Análise molecular das mutações nos genes *EIF4G1* e *VPS35*

Não foram identificadas mutações de ponto nos genes *VPS35* (p.D620N e p.R524W) e *EIF4G1* (p.R1205H e p.A502V) nos 582 pacientes com DP e nos 319 controles saudáveis analisados (Anexo D). Os resultados obtidos por qPCR podem ser visualizados a partir dos gráficos fornecidos pela ferramenta *Multicomponent Plot* (Figura 14), onde o eixo x representa o número de ciclos e o eixo y a fluorescência captada pelo equipamento. Através desta análise foi possível verificar que todos os pacientes e controles não apresentavam as mutações em estudo.

Figura 14- Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR do paciente PAR4152, homocigoto selvagem para as quatro mutações p.D620N (A), p.R524W (B), p.R1205H (C) e p.A502V (D)



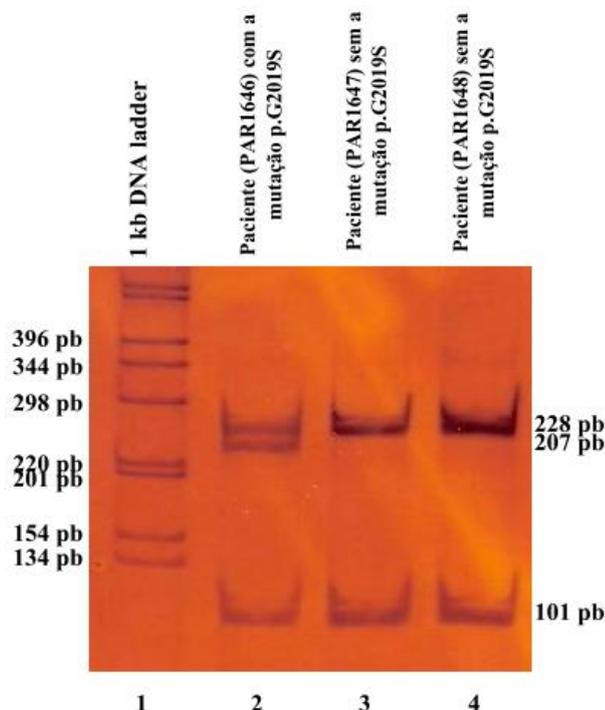
Legenda: Observa-se apenas a amplificação da fluorescência VIC (verde) em todas as análises. A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

Os achados referentes às mutações nos genes *VPS35* (p.D620N; p.R524W) e *EIF4G1* (p.R1205H e p.A502V) deram origem ao artigo científico intitulado *Mutations in SNCA, VPS35 and EIF4G1 genes are uncommon among Brazilian patients with Parkinson's disease*, em fase final de redação, a ser submetido ao periódico *Neurobiology of Aging*.

3.2 Análise molecular da mutação LRRK2 p.G2019S

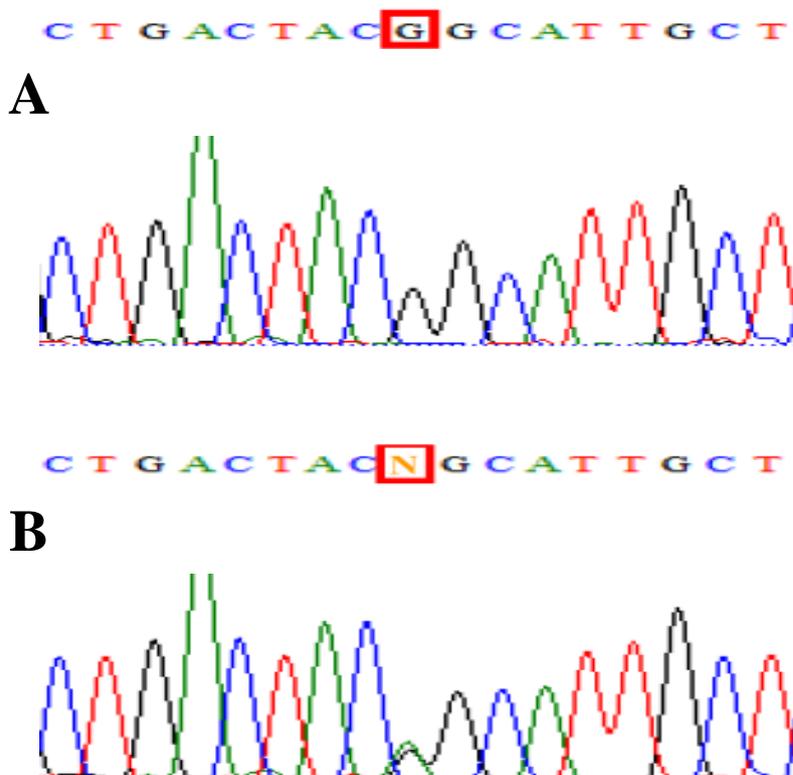
Dentre os 582 probandos com DP, foram identificados 15 pacientes portadores da mutação p.G2019S (c.6055G>A) em heterozigose (Anexo D) através da técnica de PCR-RFLP (Figura 15) e confirmados por sequenciamento automático (Figura 16).

Figura 15- Gel da digestão dos produtos da PCR (exon 41 do gene *LRRK2*) com a enzima SfcI



Legenda: Linha 1: padrão de tamanho de fragmento expresso em pares de bases 1kb DNA ladder; linha 2: paciente PAR1646 com a mutação c.6055G>A (p.G2019S) em heterozigose no gene *LRRK2*; linhas 3 e 4: pacientes com DP sem a mutação c.6055G>A (p.G2019S).

Figura 16- Eletroferogramas gerados através do sequenciamento automático da PCR



Legenda: A) Sequência selvagem do exon 41 do gene *LRRK2*. B) Mutação p.G2019S (c.6055G>A) encontrada em heterozigose no paciente PAR1646.

Dos 15 pacientes brasileiros com DP portadores da mutação patogênica p.G2019S, 9 (64,3%) são do sexo feminino e 6 (35,7%) do sexo masculino. A média da idade de manifestação foi de $47,64 \pm 9,36$ (Faixa etária: 33-60 anos), não sendo estatisticamente diferente da média dos não portadores da mutação ($52,60 \pm 13,3$) ($p= 0,06$). Dos quinze pacientes, sete deles apresentavam história familiar da doença e oito eram casos esporádicos. Cinquenta e três por cento dos probandos manifestaram a doença antes dos 50 anos de idade e os demais desenvolveram os primeiros sintomas da DP após os 50 anos. O tremor em repouso está presente em 47,36% dos pacientes como o primeiro sintoma motor, seguido da bradicinesia (26,31%), rigidez (21,05%) e distúrbio da marcha (5,26%). Todos os pacientes portadores da p.G2019S desenvolveram bradicinesia. Com exceção do paciente 4160, todos os demais apresentaram rigidez. Doze pacientes manifestaram tremor em repouso. Apenas três probandos apresentaram distonia e cinco desenvolveram declínio cognitivo. Todos os pacientes em uso do L-dopa apresentam uma boa resposta ao medicamento, no entanto, 71,42% desenvolveram discinesia (Tabela 5).

Tabela 5- Características clínicas dos pacientes portadores da mutação p.G2019S no gene *LRRK2*

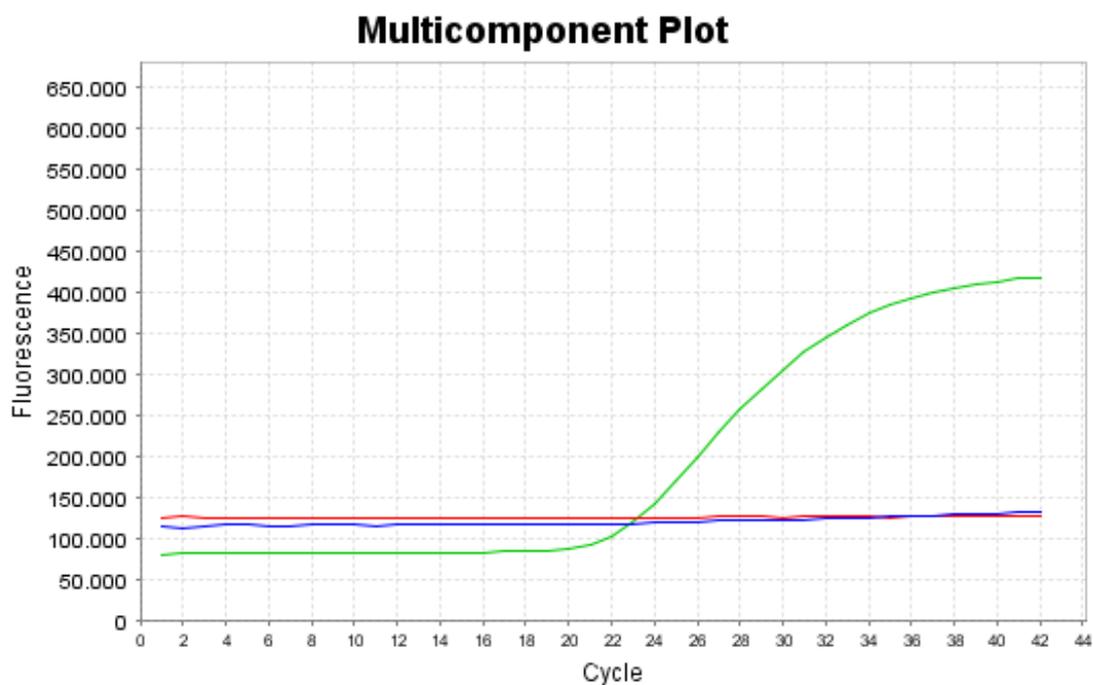
Número de registro	1306	1398	1455	1646	2101	2257	2386	2737	2748	3147	3173	4046	4073	4160	4180
sexo	M	F	M	M	F	F	M	F	M	F	F	F	F	M	F
paciente vivo?	S	N	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S
idade	73	*	64	58	50	48	45	65	49	62*	54	61	65	73	59
idade de manifestação	55	53	47	45	33	38	43	60	***	33	40	57	60	55	48
caso familiar (Fa) ou isolado (I)	Fa	I	Fa	I	I	Fa	I	Fa	Fa	I	I	I	Fa	Fa	I
sintoma inicial	DM	R	B	T	T	R + B	T	T	T	R	B + R	T	T	B + T	B + T
bradicinesia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	***	P	P	P	P	P
rigidez	P	P	P	P	P	P	P	P	P	***	P	P	P	A	P
tremor em repouso	P	P	P	P	P	A	P	P	P	***	P	P	P	A	P
distonia	A	P	A	A	A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A
discinesia	P	P	P	P	P	A	A	A	P	***	P	A	P	P	P
declínio cognitivo	A	P	P	P	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	A
resposta ao L-dopa	P	P	P	P	P	P	**	P	P	P	P	P	P	P	P

M: Masculino; F: Feminino; S: Sim; N: Não; Fa: Familiar; I: Isolado; DM: Distúrbio da Marcha; R: Rigidez; B: Bradicinesia; T: Tremor; P: Presente; A: Ausente; *Paciente falecida; ** Sem uso do medicamento L-dopa; *** Sem informação.

3.3 Análise molecular e estatística das variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene *LRRK2*

Das cinco variantes raras no gene *LRRK2* triadas nos 551 indivíduos (329 probandos com DP e 222 controles saudáveis), quatro (p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T e p.Y2189C) foram identificadas em heterozigose e a variante p.S1761R mostrou-se ausente na amostra analisada (Figura 17).

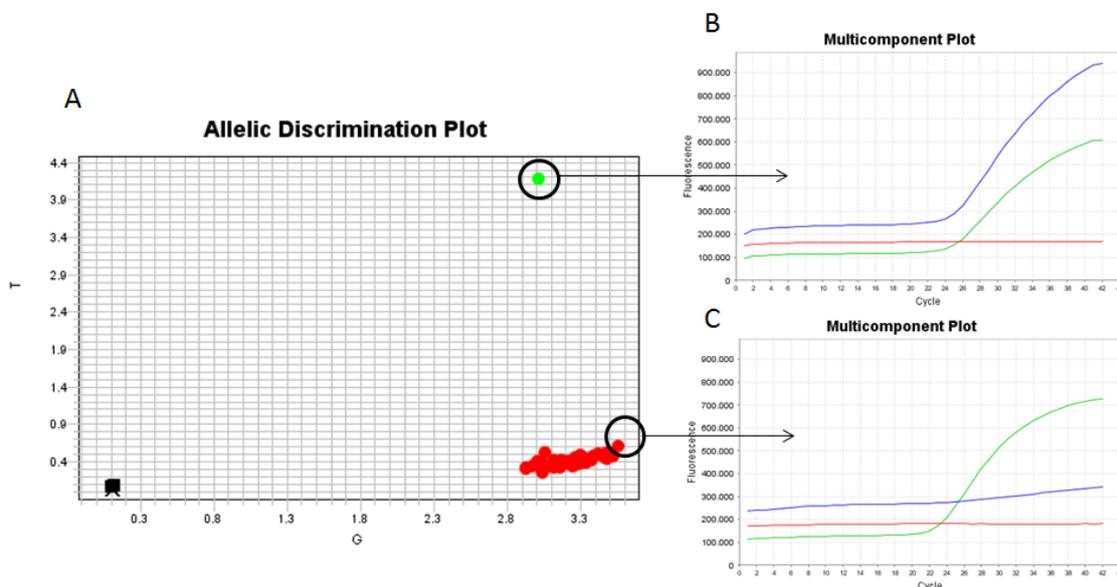
Figura 17- Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR do paciente PAR1969, homozigoto selvagem (AA) para a mutação p.S1761R no gene *LRRK2*



Legenda: Observa-se apenas a amplificação da fluorescência VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

A discriminação alélica da variante LRRK2 p.Q1111H pode ser vista na Figura 18.

Figura 18- Resultado da análise molecular da variante p.Q1111H



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante rara p.Q1111H. Os quadrados pretos são os controles brancos e os "X" são amostras indeterminadas. (B) Genótipo do paciente PAR2143 heterozigoto (GT) para a variante p.Q1111H no gene *LRRK2*, observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR2133, homozigoto (GG) para a variante p.Q1111H no gene *LRRK2*, observa-se apenas a amplificação da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

A variante LRRK2 p.Q1111H foi encontrada em 0,6% dos pacientes com DP e em 0,5% dos controles saudáveis (Tabela 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 1,0$; OR= 1,35; IC= 0,12 – 14,9).

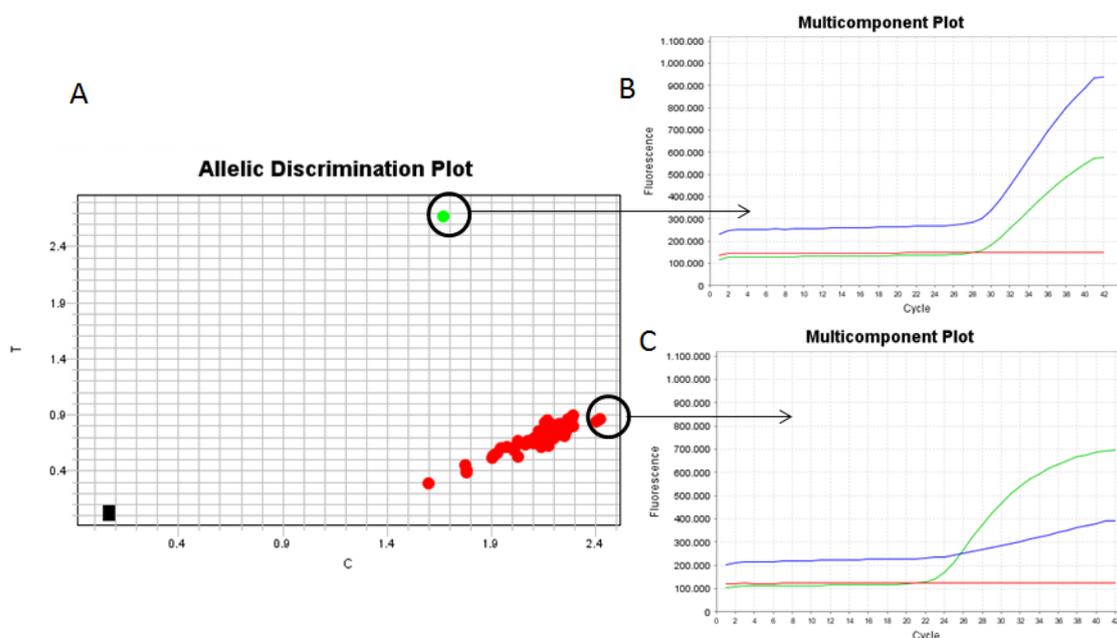
Tabela 6- Distribuição alélica e genotípica da variante LRRK2 p.Q1111H.

p.Q1111H	N (Frequência) controles saudáveis	N (Frequência) pacientes com DP
GG	221 (0,995)	327 (0,994)
GT	1 (0,005)	2 (0,006)
TT	-	-
Alelo G	443 (0,997)	656 (0,997)
Alelo T	1 (0,003)	2 (0,003)

- : Genótipo não encontrado

O resultado obtido através do qPCR para a variante p.T1410M pode ser visto na Figura 19.

Figura 19- Resultado da análise molecular da variante p.T1410M



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante rara p.T1410M. Os quadrados pretos são os controles brancos. (B) Genótipo do paciente PAR1728 heterozigoto (CT) para a variante p.T1410M no gene *LRRK2*, observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR1218, homozigoto (CC) para a variante p.T1410M no gene *LRRK2*, observa-se apenas a amplificação da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

A diferença nas frequências da variante *LRRK2* p.T1410M em pacientes com DP (0,6%) e nos controles saudáveis (0,9%) (Tabela 7) não foi estatisticamente significativa ($p = 1$; OR = 0,67; IC = 0,09 – 4,80).

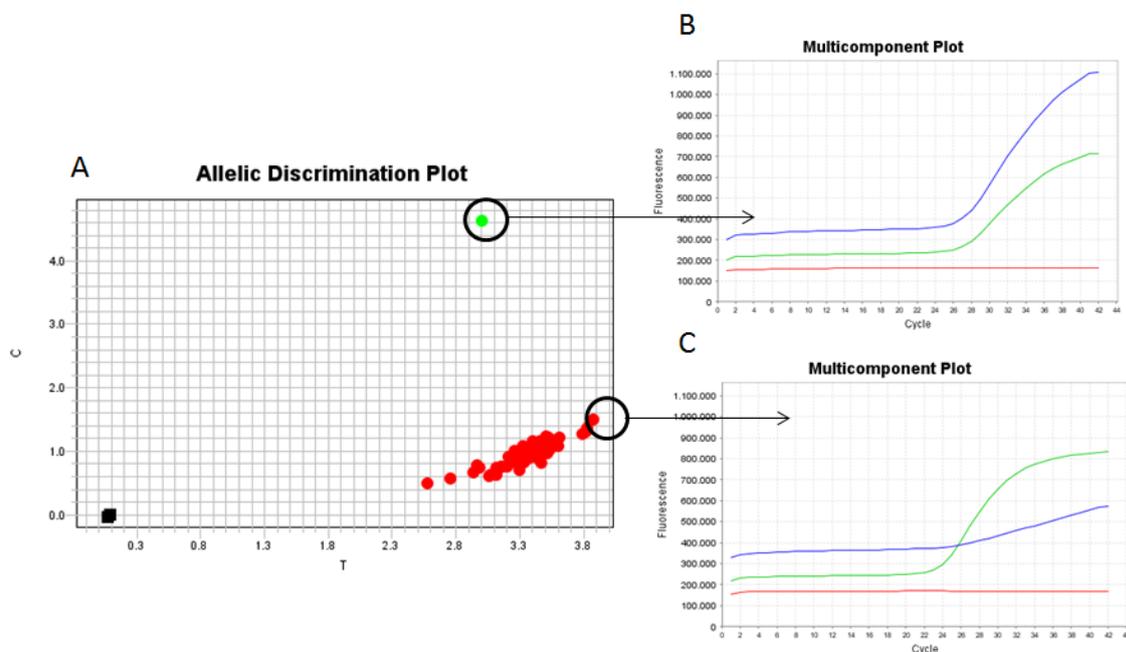
Tabela 7- Distribuição alélica e genotípica da variante *LRRK2* p.T1410M

p.T1410M	N (Frequência) controles saudáveis	N (Frequência) pacientes com DP
CC	220 (0,991)	327 (0,994)
CT	2 (0,009)	2 (0,006)
TT	-	-
Alelo C	442 (0,995)	656 (0,997)
Alelo T	2 (0,005)	2 (0,003)

- : Genótipo não encontrado

O resultado da análise molecular da variante LRRK2 p.M1646T está representado na figura 20.

Figura 20- Resultado da análise molecular da variante p.M1646T



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante rara p.M1646T. Os quadrados pretos são os controles brancos. (B) Genótipo do paciente PAR4110 heterozigoto (TC) para a variante p.M1646T no gene *LRRK2*, observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR4117, homozigoto (TT) para a variante p.M1646T no gene *LRRK2*, observa-se apenas a amplificação da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

A variante p.M1646T foi encontrada apenas no grupo de pacientes com DP (1,8%), estando ausente nos controles. O alelo raro (C) teve uma frequência de 0,9% em pacientes e 0% em controles (Tabela 8), entretanto, não foi observada significância estatística ($p=0,08$; OR= 8,91; IC= 0,50 – 159).

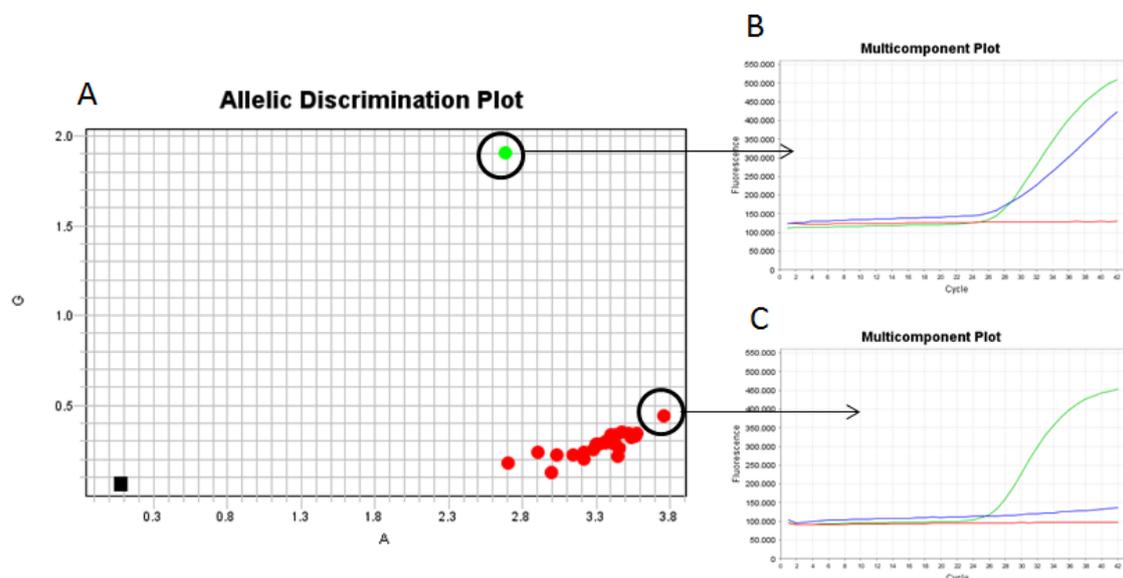
Tabela 8- Distribuição alélica e genotípica da variante LRRK2 p.M1646T

p.M1646T	N (Frequência) controles saudáveis	N (Frequência) pacientes com DP
TT	222 (1,0)	321 (0,982)
CT	-	6 (0,018)
CC	-	-
Alelo T	444 (1,0)	648 (0,991)
Alelo C	-	6 (0,009)

- : Genótipo ou alelo não encontrado

A discriminação alélica da variante LRRK2 p.Y2189C pode ser observada na figura 21.

Figura 21- Resultado da análise molecular da variante p.Y2189C



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante rara p.Y2189C. Os quadrados pretos são os controles brancos. (B) Genótipo do paciente PAR2368 heterozigoto (AG) para a variante p.Y2189C no gene *LRRK2*, observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR2128, homozigoto (AA) para a variante p.Y2189C no gene *LRRK2*, observa-se apenas a amplificação da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

Apesar da variante LRRK2 p.Y2189C ter sido encontrada em maior frequência no grupo controle (0,9%) comparado ao grupo de pacientes com DP (0,6%) (Tabela 9), não foram observadas diferenças estatísticas ($p= 1$; OR= 0,67; IC= 0,09 – 4,82).

Tabela 9- Distribuição alélica e genotípica da variante LRRK2 p.Y2189C

p.Y2189C	N (Frequência) controles saudáveis	N (Frequência) pacientes com DP
AA	218 (0,991)	323 (0,994)
AG	2 (0,009)	2 (0,006)
GG	-	-
Alelo A	438 (0,995)	648 (0,997)
Alelo G	2 (0,005)	2 (0,003)

- : Genótipo não encontrado

3.4 Análise molecular e estatística das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

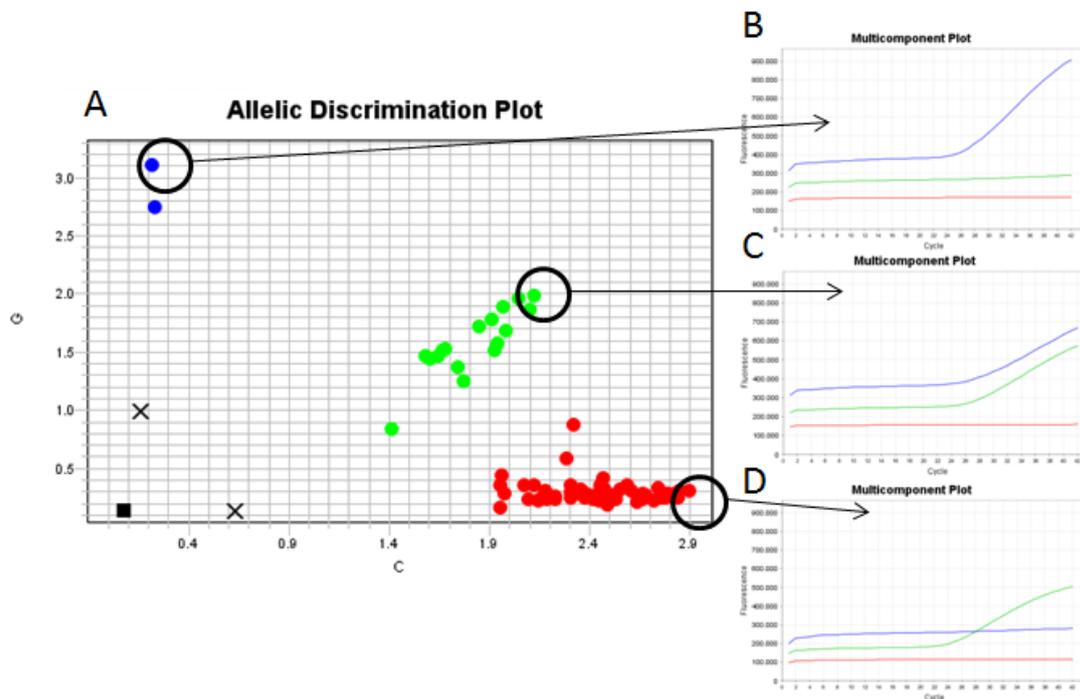
3.4.1 Análise das frequências genotípicas e alélicas e teste do Qui-quadrado

A investigação das variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2* foi conduzida inicialmente em uma amostra de 329 pacientes brasileiros com DP, naturais da região sudeste do Brasil (os pacientes da região sudeste estão sinalizados em cinza no Anexo D). Essa estratégia foi utilizada visando obter um resultado mais robusto e fidedigno, tendo em vista a diversidade da população brasileira. Para fins comparativos, uma amostra controle constituída por 222 indivíduos saudáveis do Estado do Rio de Janeiro foi analisada.

Numa segunda análise, subdividimos a amostra de pacientes da região sudeste em: pacientes com DP esporádica; pacientes com DP familiar; pacientes com DP tardia (≥ 50 anos); pacientes do Estado do Rio de Janeiro, conforme apresentado na Tabela 2, e comparamos com o mesmo grupo controle de 222 indivíduos saudáveis do Estado do Rio de Janeiro.

Os resultados das análises moleculares das variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K revelaram em cada caso a presença dos três genótipos possíveis. A discriminação alélica, bem como a análise através da ferramenta *Multicomponent Plot* da variante comum *LRRK2* p.N551K pode ser visualizada na figura 22.

Figura 22- Resultado da análise molecular da variante p.N551K



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante comum p.N551K. Os quadrados pretos são os controles brancos e os "X" são amostras indeterminadas. (B) Genótipo do paciente PAR2172 homocigoto (GG) para a variante p.N551K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR1701, heterocigoto (CG) para a variante p.N551K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (D) Genótipo do paciente PAR2267 homocigoto (CC) para a variante p.N551K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

As frequências genóticas e alélicas da variante comum p.N551K no gene *LRRK2* em casos e controles da amostra sudeste estão apresentadas nos gráficos 1 e 2, respectivamente. As frequências alélicas e genóticas por estratificação estão apresentadas nas tabelas 14, 15, 16 e 17.

Gráfico 1- Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.N551K do gene *LRRK2* por grupo

Frequência genotípica na amostra sudeste da p.N551K por grupo

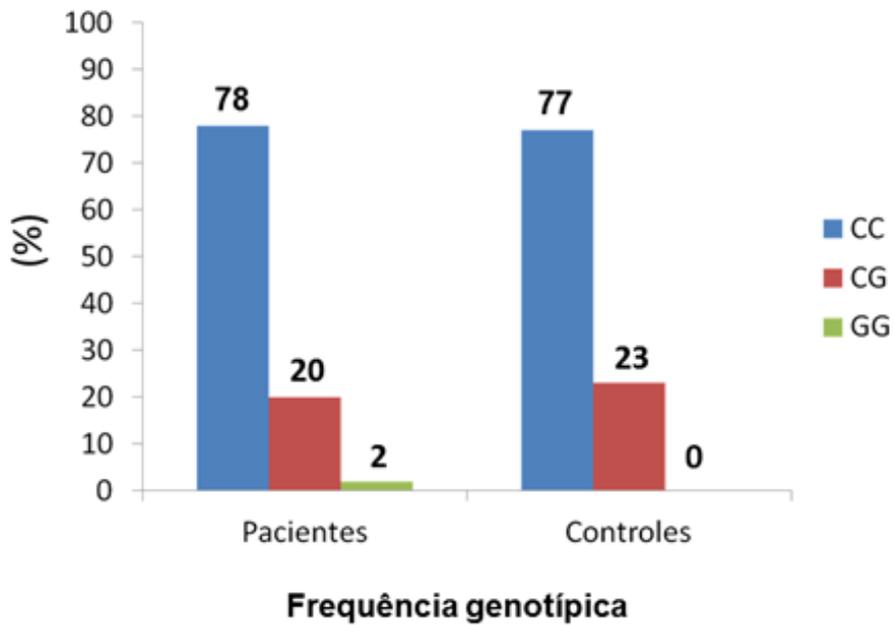
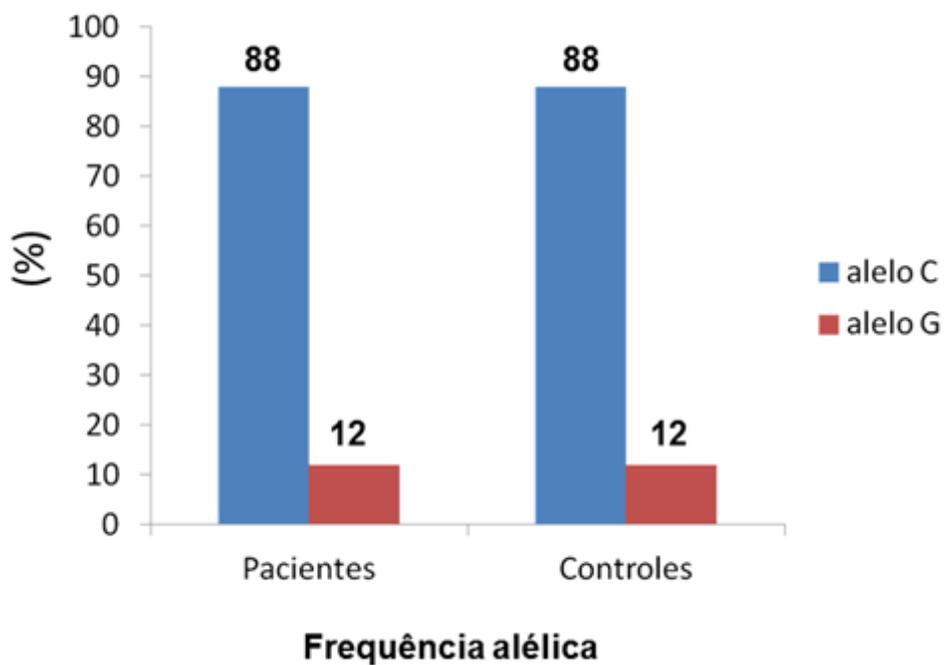


Gráfico 2- Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.N551K do gene *LRRK2* por grupo

Frequência alélica na amostra sudeste da p.N551K por grupo



Pela aplicação do teste do χ^2 foi possível verificar que as frequências genotípicas da variante comum LRRK2 p.N551K na amostra controle estão em EHW com $p > 0,05$ e para o grupo de pacientes observa-se que as frequências genotípicas da variante comum p.N551K não estão em EHW na estratificação sudeste familiar ($p = 0,01$) (Tabelas 10).

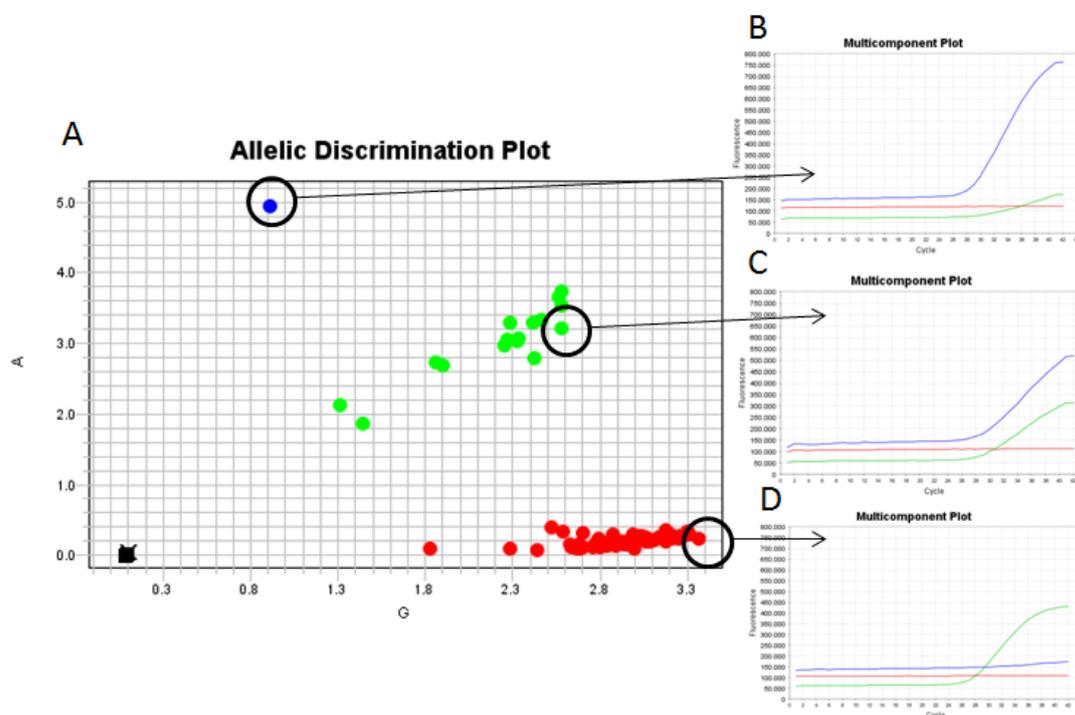
Tabela 10- Teste do Qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante LRRK2 p.N551K por estratificação da amostra de 327 probandos com DP.

Estratificação	Variante LRRK2 p.N551K	
	χ^2 controle	χ^2 paciente
Sudeste	2,72 ($p = 0,09$)	0,68 ($p = 0,40$)
Sudeste Esporádico	2,72 ($p = 0,09$)	0,52 ($p = 0,46$)
Sudeste Familiar	2,72 ($p = 0,09$)	6,12 ($p = 0,01$)
Sudeste ≥ 50 anos	2,72 ($p = 0,09$)	2,28 ($p = 0,13$)
Rio de Janeiro	2,72 ($p = 0,09$)	0,09 ($p = 0,76$)

Em vermelho: $p < 0,05$.

A discriminação alélica, bem como a análise através da ferramenta *Multicomponent Plot* da variante comum LRRK2 p.R1398H pode ser visualizada na figura 23.

Figura 23- Resultado da análise molecular da variante p.R1398H



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante comum p.R1398H. Os quadrados pretos são os controles brancos e os "X" são amostras indeterminadas. (B) Genótipo do paciente PAR2271 homocigoto (AA) para a variante p.R1398H no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR1637, heterocigoto (GA) para a variante p.R1398H no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (D) Genótipo do paciente PAR2056 homocigoto (GG) para a variante p.R1398H no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

As frequências genótípicas e alélicas dos casos e controles para a variante comum p.R1398H no gene *LRRK2* na amostra sudeste estão apresentadas nos gráficos 3 e 4, respectivamente. As frequências alélicas e genótípicas por estratificação estão apresentadas nas tabelas 14, 15, 16 e 17.

Gráfico 3- Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.R1398H do gene *LRRK2* por grupo

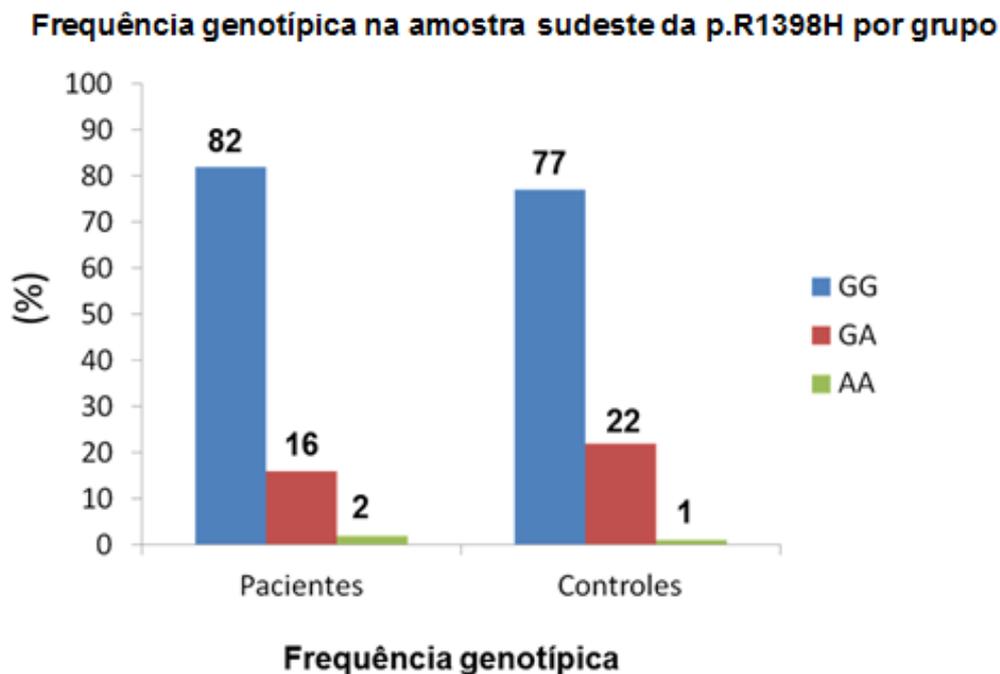
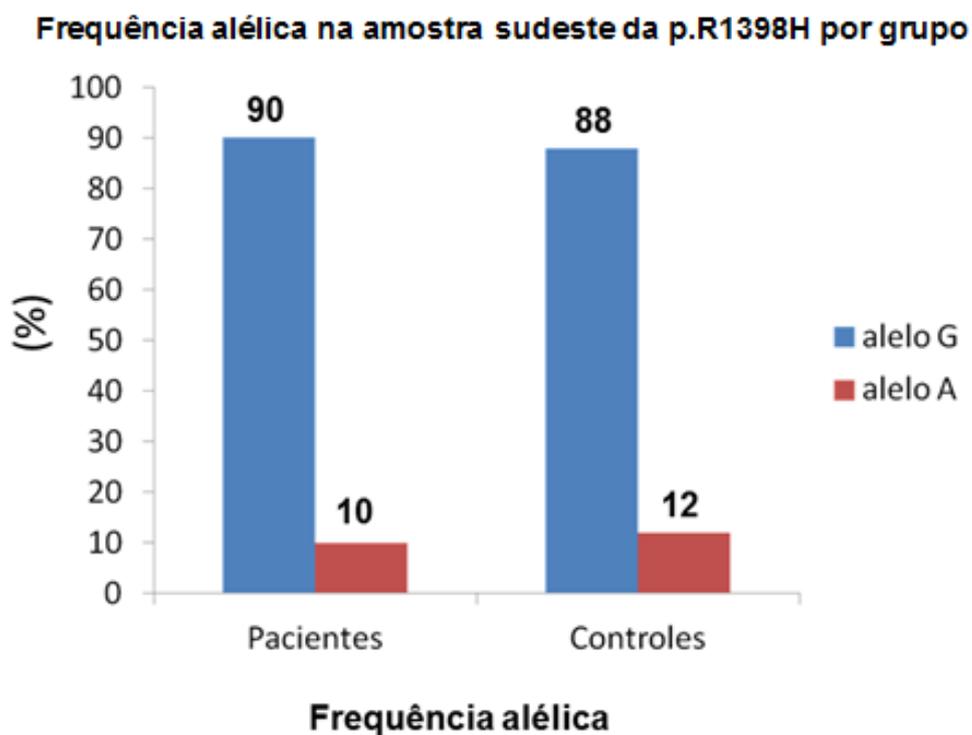


Gráfico 4- Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.R1398H do gene *LRRK2* por grupo



Pela aplicação do teste do χ^2 foi possível verificar que as frequências genotípicas da variante comum p.R1398H na amostra controle estão em EHW com $p > 0,05$ e para o grupo de pacientes, observa-se que as frequências genotípicas nas estratificações sudeste familiar e sudeste ≥ 50 anos não estão em EHW (Tabela 11).

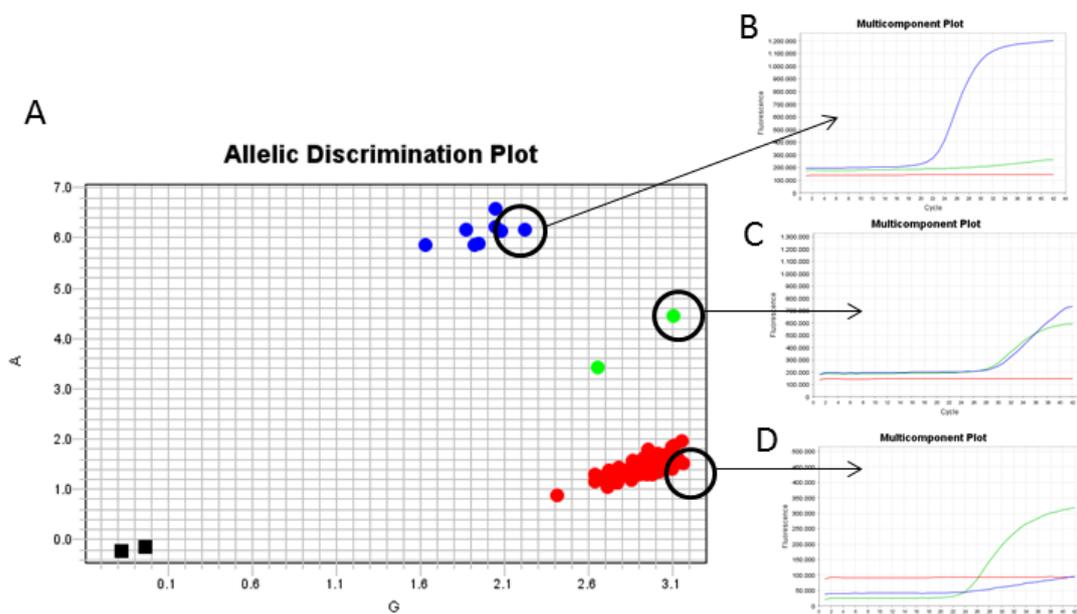
Tabela 11- Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante LRRK2 p.R1398H por estratificação da amostra de 328 probandos com DP.

Estratificação	Variante LRRK2 p.R1398H	
	χ^2 controle	χ^2 paciente
Sudeste	0,01 (p= 0,90)	3,76 (p= 0,052)
Sudeste Esporádico	0,01 (p= 0,90)	0,007 (p= 0,93)
Sudeste Familiar	0,01 (p= 0,90)	8,24 (p= 0,004)
Sudeste ≥ 50 anos	0,01 (p= 0,90)	4,3 (p= 0,04)
Rio de Janeiro	0,01 (p= 0,90)	1,80 (p= 0,17)

Em vermelho: $p < 0,05$.

A discriminação alélica, bem como a análise através da ferramenta *Multicomponent Plot* da variante comum LRRK2 p.K1423K pode ser visualizada na figura 24.

Figura 24- Resultado da análise molecular da variante p.K1423K



Legenda: (A) Genótipo fornecido pela discriminação alélica por qPCR para a variante comum p.K1423K. Os quadrados pretos são os controles brancos. (B) Genótipo do paciente PAR1144 homocigoto (AA) para a variante p.K1423K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda FAM (azul) (C) Genótipo do paciente PAR1191, heterocigoto (GA) para a variante p.K1423K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação das sondas VIC (verde) e FAM (azul) (D) Genótipo do paciente PAR1435 homocigoto (GG) para a variante p.K1423K no gene *LRRK2*. Observa-se a amplificação apenas da sonda VIC (verde). A fluorescência vermelha é o marcador de referência passiva, ROX.

As frequências genóticas e alélicas dos casos e controles para a variante comum p.K1423K no gene *LRRK2* na amostra sudeste estão apresentadas nos gráficos 5 e 6, respectivamente. As frequências alélicas e genóticas por estratificação estão apresentadas nas tabelas 14, 15, 16 e 17.

Gráfico 5- Frequência genotípica na amostra sudeste da variante exônica comum p.K1423K do gene *LRRK2* por grupo

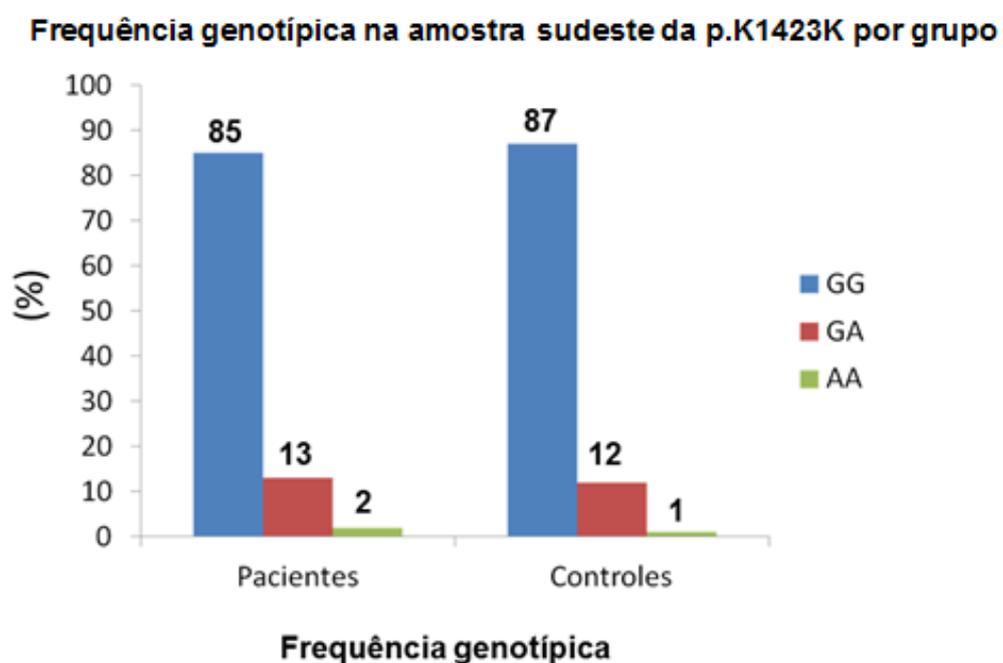
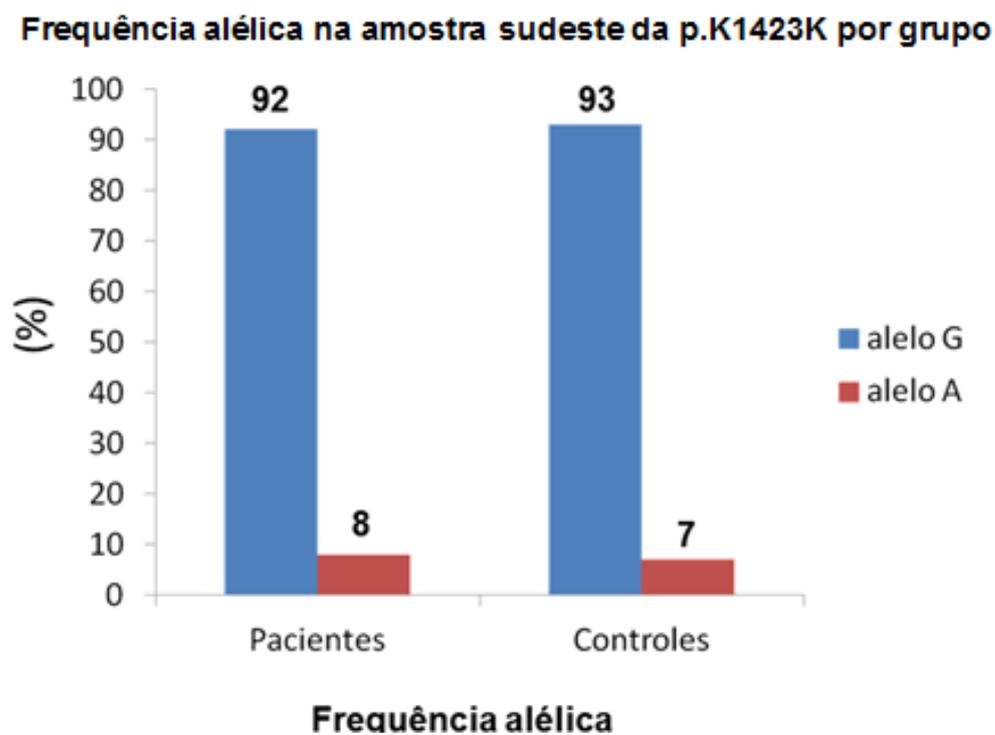


Gráfico 6- Frequência alélica na amostra sudeste da variante exônica comum p.K1423K do gene *LRRK2* por grupo



Pela aplicação do teste do χ^2 foi possível verificar que as frequências genóticas da variante comum p.K1423K na amostra controle estão em EHW com $p > 0,05$, entretanto, observa-se que as frequências genóticas nas estratificações sudeste familiar e sudeste ≥ 50 anos não estão em EHW (Tabela 12).

Tabela 12- Teste do Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy e Weinberg para a variante LRRK2 p.K1423K por estratificação da amostra de 328 probandos com DP.

Estratificação	p.K1423K	
	χ^2 controle	χ^2 paciente
Sudeste	0,24 (p= 0,62)	2,77 (p= 0,99)
Sudeste Esporádico	0,24 (p= 0,62)	0,24 (p= 0,61)
Sudeste Familiar	0,24 (p= 0,62)	12,63 (p= 0,0004)
Sudeste ≥ 50 anos	0,24 (p= 0,62)	7,03 (p= 0,007)
Rio de Janeiro	0,24 (p= 0,62)	1,24 (p= 0,26)

Em vermelho: $p < 0,05$.

3.4.2 Regressão Logística

As análises comparativas realizadas através da regressão logística nos níveis de genótipos, alelos e carreador do alelo menos frequente e os valores de OR não ajustados (OR bruto) e de OR ajustado para sexo e idade por estratificação, constam das tabelas 13, 14, 15, 16 e 17.

Não foi encontrada qualquer associação, de risco ou de proteção, para nenhuma das três variantes comuns estudadas no gene *LRRK2* na amostra proveniente da região sudeste do Brasil (Tabela 13).

A partir da estratificação da amostra da região sudeste do Brasil, foi observado que, em relação às análises dos pacientes naturais do Estado do Rio de Janeiro, não houve qualquer associação entre as três variantes comuns

no gene *LRRK2* e a DP, não revelando, portanto, a influência do efeito geográfico (Tabela 17). O mesmo foi visto nas amostras de pacientes com idade de manifestação ≥ 50 anos (tabela 16) e com DP esporádica (Tabela 14). Entretanto, no estudo de associação com o genótipo, na estratificação sudeste familiar para a variante p.K1423K, o genótipo homocigoto raro AA mostrou uma associação ao risco de DP com um OR de 10,66 ($p= 0,03$). Mesmo após os ajustes para as co-variáveis sexo e idade, o genótipo raro AA não perdeu a significância estatística passando a ter um OR ainda maior (15,22; $p= 0,02$)

Tabela 13- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na amostra sudeste.

Sudeste				
p.N551K	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
CC	170 (0,77)	254 (0,78)	Referência	Referência
CG	52 (0,23)	66 (0,20)	0,85 [0,56-1,28 (0,44)]	0,87 [0,55-1,38 (0,55)]
GG	0 (0,00)	7 (0,02)	-	-
Alelo C	392 (0,88)	574 (0,88)	Referência	Referência
Alelo G	52 (0,12)	80 (0,12)	1,05 [0,62-1,78 (0,85)]	1,07 [0,59-1,95 (0,81)]
Carreador G	52 (0,23)	73 (0,22)	0,94 [0,63-1,41 (0,76)]	0,96 [0,61-1,52 (0,87)]
p.R1398H	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
GG	169 (0,77)	269 (0,82)	Referência	Referência
GA	48 (0,22)	52 (0,16)	0,68 [0,44-1,05 (0,08)]	0,68 [0,42-1,10 (0,11)]
AA	3 (0,01)	7 (0,02)	1,46 [0,37-5,75 (0,58)]	1,93 [0,38-9,73 (0,42)]
Alelo G	386 (0,88)	590 (0,9)	Referência	Referência
Alelo A	54 (0,12)	66 (0,1)	0,80 [0,47-1,37 (0,42)]	0,81 [0,45-1,49 (0,51)]
Carreador A	51 (0,23)	59 (0,18)	0,73 [0,48-1,11 (0,14)]	0,73 [0,46-1,17 (0,19)]
p.K1423K	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
GG	194 (0,87)	279 (0,85)	Referência	Referência
GA	27 (0,12)	44 (0,13)	1,13 [0,68-1,89 (0,63)]	1,13 [0,64-2,00 (0,67)]
AA	1 (0,01)	5 (0,02)	3,48 [0,40-29,99 (0,26)]	4,13 [0,40-42,84 (0,23)]
Alelo G	415 (0,93)	602 (0,92)	Referência	Referência
Alelo A	29 (0,07)	54 (0,08)	1,28 [0,66-2,49 (0,46)]	1,30 [0,62-2,72 (0,48)]
Carreador A	28 (0,13)	49 (0,15)	1,22 [0,74-2,00 (0,44)]	1,22 [0,70-2,13 (0,47)]

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; -: Genótipos encontrados em apenas um dos grupos não foram analisados para o OR.

Tabela 14- Distribuição das frequências alélicas e genóticas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na estratificação sudeste esporádico.

Sudeste esporádico				
	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
p.N551K				
CC	170 (0,77)	149 (0,776)	Referência	Referência
CG	52 (0,23)	42 (0,219)	0,92 [0,58-1,46 (0,73)]	0,92 [0,55-1,56 (0,76)]
GG	0 (0,00)	1 (0,005)	-	-
Alelo C	392 (0,88)	340 (0,89)	Referência	Referência
Alelo G	52 (0,12)	44 (0,11)	0,98 [0,53-1,78 (0,94)]	0,97 [0,49-1,92 (0,92)]
Carreador G	52 (0,23)	43 (0,224)	0,94 [0,59-1,49 (0,80)]	0,94 [0,56-1,58 (0,81)]
p.R1398H				
GG	169 (0,77)	158 (0,82)	Referência	Referência
GA	48 (0,22)	33 (0,17)	0,73 [0,45-1,20 (0,22)]	0,73 [0,42-1,27 (0,27)]
AA	3 (0,01)	1 (0,01)	0,36 [0,04-3,46 (0,37)]	0,38 [0,03-4,98 (0,46)]
Alelo G	386 (0,88)	349 (0,91)	Referência	Referência
Alelo A	54 (0,12)	35 (0,09)	0,72 [0,38-1,35 (0,30)]	0,72 [0,36-1,47 (0,37)]
Carreador A	51 (0,23)	34 (0,18)	0,71 [0,44-1,16 (0,17)]	0,72 [0,41-1,23 (0,22)]
p.K1423K				
GG	194 (0,87)	165 (0,86)	Referência	Referência
GA	27 (0,12)	27 (0,14)	1,18 [0,66-2,08 (0,58)]	1,25 [0,66-2,37 (0,50)]
AA	1 (0,01)	0 (0,00)	-	-
Alelo G	415 (0,93)	357 (0,93)	Referência	Referência
Alelo A	29 (0,07)	27 (0,07)	0,86 [0,70-1,05 (0,14)]	1,08 [0,50-2,33 (0,84)]
Carreador A	28 (0,13)	27 (0,14)	1,13 [0,64-2,00 (0,66)]	1,17 [0,62-2,22 (0,62)]

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; -: Genótipos encontrados em apenas um dos grupos não foram analisados para o OR.

Tabela 15- Distribuição das frequências alélicas e genóticas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na estratificação sudeste familiar.

Sudeste familiar				
	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
p.N551K				
CC	170 (0,77)	86 (0,79)	Referência	Referência
CG	52 (0,23)	17 (0,16)	6,45e+5 [0,35-1,18 (0,16)]	6,17e+5 [0,32-1,20 (0,15)]
GG	0 (0,00)	5 (0,05)	-	-
Alelo C	392 (0,88)	189 (0,88)	Referência	Referência
Alelo G	52 (0,12)	27 (0,12)	1,08 [0,53-2,17 (0,84)]	1,16 [0,53-2,50 (0,71)]
Carreador G	52 (0,23)	22 (0,21)	0,84 [0,48-1,47 (0,53)]	0,85 [0,46-1,57 (0,61)]
p.R1398H				
GG	169 (0,77)	88 (0,81)	Referência	Referência
GA	48 (0,22)	15 (0,14)	0,60 [0,32-1,13 (0,11)]	0,53 [0,26 -1,05 (0,07)]
AA	3 (0,01)	5 (0,05)	3,20 [0,75-13,70 (0,12)]	4,65 [0,89-24,17 (0,07)]
Alelo G	386 (0,88)	191 (0,88)	Referência	Referência
Alelo A	54 (0,12)	25 (0,12)	0,94 [0,46-1,91 (0,85)]	0,92 [0,42-2,00 (0,84)]
Carreador A	51 (0,23)	20 (0,19)	0,75 [0,42-1,34 (0,34)]	0,70 [0,38-1,32 (0,27)]
p.K1423K				
GG	194 (0,87)	91 (0,84)	Referência	Referência
GA	27 (0,12)	12 (0,11)	0,95 [0,46-1,95 (0,88)]	0,93 [0,42-2,06 (0,86)]
AA	1 (0,01)	5 (0,05)	10,66 [1,23-92,56 (0,03)]	15,22 [1,54-150,22 (0,02)]
Alelo G	415 (0,93)	194 (0,9)	Referência	Referência
Alelo A	29 (0,07)	22 (0,1)	1,62 [0,71-3,68 (0,25)]	1,79 [0,73-4,40 (0,20)]
Carreador A	28 (0,13)	17 (0,16)	1,29 [0,67-2,5 (0,44)]	1,36 [0,66-2,79 (0,40)]

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; Vermelho e negrito: $p < 0,05$; -: Genótipos encontrados em apenas um dos grupos não foram analisados para o OR.

Tabela 16- Distribuição das frequências alélicas e genóticas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na estratificação sudeste \geq 50 anos.

Sudeste \geq 50 anos				
	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
p.N551K				
CC	170 (0,77)	147 (0,77)	Referência	Referência
CG	52 (0,23)	37 (0,20)	0,82 [0,51-1,32 (0,42)]	0,82 [0,51-1,34 (0,44)]
GG	0 (0,00)	6 (0,03)	-	-
Alelo C	392 (0,88)	331 (0,87)	Referência	Referência
Alelo G	52 (0,12)	49 (0,13)	1,12 [0,62-2,01 (0,71)]	1,12 [0,61-2,06 (0,70)]
Carreador G	52 (0,23)	43 (0,23)	0,96 [0,60-1,51 (0,85)]	0,96 [0,60-1,54 (0,87)]
p.R1398H				
GG	169 (0,77)	152 (0,80)	Referência	Referência
GA	48 (0,22)	32 (0,17)	0,74 [0,45-1,22 (0,24)]	0,69 [0,41-1,15 (0,15)]
AA	3 (0,01)	6 (0,03)	2,22 [0,55-9,04 (0,26)]	2,63 [0,61-11,23 (0,19)]
Alelo G	386 (0,88)	336 (0,88)	Referência	Referência
Alelo A	54 (0,12)	44 (0,12)	0,94 [0,51-1,70 (0,83)]	0,91 [0,49-1,69 (0,77)]
Carreador A	51 (0,23)	38 (0,20)	0,83 [0,52-1,33 (0,44)]	0,82 [0,52-1,33 (0,44)]
p.K1423K				
GG	194 (0,87)	161 (0,85)	Referência	Referência
GA	27 (0,12)	24 (0,13)	1,07 [0,59-1,93 (0,82)]	1,07 [0,59-1,96 (0,81)]
AA	1 (0,01)	5 (0,02)	6,02 [0,70-52,09 (0,10)]	6,14 [0,69-54,88 (0,10)]
Alelo G	415 (0,93)	346 (0,91)	Referência	Referência
Alelo A	29 (0,07)	34 (0,09)	0,83 [0,68-1,02 (0,08)]	1,41 [0,67-2,97 (0,36)]
Carreador A	28 (0,13)	29 (0,15)	1,2 [0,71-2,18 (0,44)]	1,25 [0,71-2,22 (0,44)]

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; -: Genótipos encontrados em apenas um dos grupos não foram analisados para o OR.

Tabela 17- Distribuição das frequências alélicas e genóticas e análise da regressão logística para as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na estratificação Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro				
	N (Frequência) controles	N (Frequência) pacientes	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
p.N551K				
CC	170 (0,77)	160 (0,78)	Referência	Referência
CG	52 (0,23)	42 (0,20)	0,86 [0,54-1,36 (0,51)]	8,68e+5 [0,51-1,47 (0,60)]
GG	0 (0,00)	4 (0,02)	-	-
Alelo C	392 (0,88)	362 (0,88)	Referência	Referência
Alelo G	52 (0,12)	50 (0,12)	1,04 [0,58-1,87 (0,89)]	1,14 [0,59-2,23(0,69)]
Carreador G	52 (0,23)	46 (0,22)	0,94 [0,60-1,48 (0,79)]	0,99 [0,59-1,66 (0,98)]
p.R1398H				
GG	169 (0,77)	171 (0,83)	Referência	Referência
GA	48 (0,22)	31 (0,15)	0,64 [0,39-1,05 (0,08)]	0,64 [0,37-1,13 (0,12)]
AA	3 (0,01)	4 (0,02)	1,31 [0,29-5,98 (0,72)]	3,06 [0,53-17,76 (0,21)]
Alelo G	386 (0,88)	373 (0,91)	Referência	Referência
Alelo A	54 (0,12)	39 (0,09)	0,74 [0,40-1,38 (0,35)]	0,84 [0,42-1,67 (0,63)]
Carreador A	51 (0,23)	35 (0,17)	0,68 [0,42-1,10 (0,11)]	0,73 [0,43-1,24 (0,24)]
p.K1423K				
GG	194 (0,87)	176 (0,85)	Referência	Referência
GA	27 (0,12)	27 (0,13)	1,10 [0,62-1,95 (0,74)]	1,20 [0,63-2,29 (0,57)]
AA	1 (0,01)	3 (0,02)	3,30 [0,34-32,08 (0,30)]	6,57 [0,57-76,30 (0,13)]
Alelo G	415 (0,93)	379 (0,92)	Referência	Referência
Alelo A	29 (0,07)	33 (0,08)	1,25 [0,60-2,59 (0,56)]	1,47 [0,65-3,35 (0,35)]
Carreador A	28 (0,13)	30 (0,15)	1,18 [0,68-2,05 (0,56)]	1,35 [0,72-2,52 (0,34)]

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; -: Genótipos encontrados em apenas um dos grupos não foram analisados para o OR.

3.4.3 Análise de haplótipos relativos às combinações alélicas das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

Foi realizada a análise dos haplótipos formados pelas combinações alélicas das variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K na amostra da região sudeste, bem como para as estratificações (sudeste esporádico, sudeste familiar, sudeste ≥ 50 anos e Rio de Janeiro). As combinações alélicas das variantes foram dispostas de acordo com a ordem em que se encontram no gene *LRRK2* (Tabela 18).

Tabela 18- Possíveis combinações alélicas para as variantes exônicas p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2*.

Haplótipo	p.N551K	p.R1398H	p.K1423K
1	C	A	A
2	C	A	G
3	C	G	A
4	C	G	G
5	G	A	A
6	G	A	G
7	G	G	A
8	G	G	G

O haplótipo encontrado em maior frequência na amostra sudeste e em todas as estratificações foi o haplótipo 4 (C-G-G) (média da frequência $85,52 \pm 0,36$), utilizado como haplótipo de referência. O haplótipo 2 (C-A-G) se mostrou como fator de proteção na amostra sudeste (OR= 0,35; IC= 0,13 - 0,93; $p= 0,04$), mantendo a associação após os ajustes para as co-variáveis (OR= 0,32; IC= 0,12 - 0,89; $p= 0,03$). O haplótipo 6 (G-A-G) mostrou susceptibilidade à proteção na amostra do sudeste (OR= 0,30; IC= 0,11 - 0,82; $p= 0,02$) e sudeste esporádico (OR=0,24; IC= 0,06 - 0,92; $p= 0,04$) porém, quando as amostras sudeste e sudeste esporádico foram corrigidas para as co-variáveis sexo e

idade, perderam a significância ($p= 0,12$; $p= 0,09$, respectivamente). O haplótipo 6 também se mostrou como fator de proteção na estratificação do Rio de Janeiro ($OR= 0,15$; $IC= 0,03 - 0,75$; $p= 0,02$) mesmo após os ajustes ($OR= 0,19$; $IC= 0,04 - 0,96$; $p= 0,04$). Os haplótipos com frequência menor que 0,5% não foram acessados (Tabela 19).

Tabela 19- Distribuição da regressão logística e análise de *odds ratio* bruto e ajustado para sexo e idade para os haplótipos por estratificação.

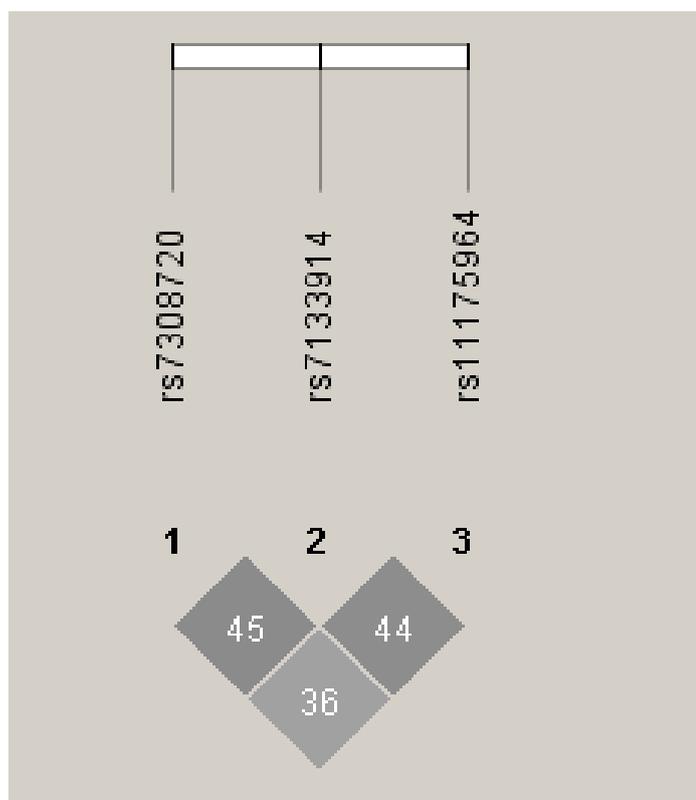
Haplótipo	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]	OR casos não ajustados [95% IC; (valor de p)]	OR casos ajustados* [95% IC; (valor de p)]
	Sudeste		Sudeste esporádico		Rio de Janeiro		Sudeste acima de 50 anos		Sudeste familiar	
2	0,35 [0,13-0,93(0,04)]	0,32 [0,12-0,89 (0,03)]	0,58 [0,22-1,53 (0,27)]	0,50 [0,17-1,34 (0,16)]	0,47 [0,17-1,32 (0,15)]	0,40 [0,13-1,19 (0,10)]	0,50 [0,18-1,38 (0,18)]	0,44 [0,15-1,25 (0,12)]	-	-
5	1,34 [0,82-2,19 (0,25)]	1,38 [0,80-2,38 (0,25)]	1,18 [0,65-2,16 (0,58)]	1,21 [0,62-2,35 (0,58)]	1,33 [0,77-2,29 (0,31)]	1,58 [0,86-2,88 (0,14)]	1,50 [0,89-2,53 (0,13)]	1,49 [0,87-2,54 (0,15)]	1,57 [0,88-2,77 (0,12)]	1,68 [0,90-3,15 (0,10)]
6	0,30 [0,11-0,82 (0,02)]	0,42 [0,14-1,24 (0,12)]	0,24 [0,06-0,92 (0,04)]	0,29 [0,07-1,19 (0,09)]	0,15 [0,03-0,75 (0,02)]	0,19 [0,04-0,96 (0,04)]	0,43 [0,15-1,26 (0,13)]	0,42 [0,14-1,27 (0,12)]	0,44 [0,12-1,61 (0,22)]	0,41 [0,11-1,67 (0,22)]
7	-	-	-	-	-	-	0,87 [0,38-1,97 (0,74)]	0,86 [0,37-2,01(0,73)]	0,30 [0,06-1,31 (0,11)]	0,26 [0,05-1,30 (0,10)]
8	0,93 [0,46-1,90 (0,85)]	0,83 [0,37-1,87 (0,66)]	1,15 [0,54-2,47 (0,71)]	0,93 [0,39-2,24 (0,88)]	1,16 [0,55-2,44 (0,70)]	0,96 [0,40-2,29 (0,93)]	-	-	-	-
1 raro	0,24 [0,01-3,80 (0,31)]	0,10 [0,001-15,82 (0,37)]	0,38 [0,05-2,75 (0,33)]	0,23 [0,02-2,47 (0,23)]	0,35 [0,05-2,62 (0,31)]	0,23 [0,02-2,51 (0,23)]	-	-	-	-
4 base	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio; *OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; em vermelho e negrito p < 0,05; em verde e negrito: dados que perderam a significância após o ajuste para as co-variáveis idade e sexo; -: dados não avaliados devido a baixa frequência do haplótipo (<0,5%)

3.4.4 Análise de desequilíbrio de ligação relativo às variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

A análise de desequilíbrio de ligação da amostra composta por 222 indivíduos saudáveis mostrou que as variantes p.N551K (rs7308720), p.R1398H (rs7133914) e p.K1423K (rs11175964) do gene *LRRK2* não estão em DL, visto que, segundo critérios estabelecidos pelo projeto *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), apenas variantes com valores de $r^2 > 80$, estão em alto DL, ou seja, elas não estão segregando juntas na forma de haplótipo (Figura 25).

Figura 25- A análise revela ausência de desequilíbrio de ligação entre as variantes p.N551K (rs7308720), p.R1398H (rs7133914) e p.K1423K (rs11175964) no gene *LRRK2* na amostra total de controles



Legenda: O número no interior do losango indica o valor de r^2 .

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise das mutações p.D620N e p.R524W no gene *VPS35*

Esse é o primeiro estudo voltado para a investigação das variantes p.D620N e p.R524W no gene *VPS35* em uma ampla casuística brasileira. Essas mutações não foram encontradas nos 901 indivíduos brasileiros analisados (582 probandos com DP e 319 controles saudáveis).

Após a recente descoberta da mutação p.D620N no gene *VPS35* como uma nova causa de doença de Parkinson autossômica dominante (Vilariño-Güell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011), estudos subsequentes têm sinalizado que essa mutação é uma causa rara de DP. Ela foi encontrada em baixa frequência nas populações japonesa (Ando *et al.*, 2012), alemã (Kumar *et al.*, 2012) e britânica (Sheerin *et al.*, 2012) e ausente nas populações chinesa (Deng *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013), italiana (Guella *et al.*, 2012; Gagliardi *et al.*, 2014), belga (Verstraeten *et al.*, 2012), indiana (Sudhaman *et al.*, 2013) e sul africana (Blanckenberg *et al.*, 2014), corroborando nossos achados que apontam a raridade dessa mutação na população brasileira (Tabela 20).

Tabela 20- Sumário dos estudos da mutação p.D620N no gene *VPS35* em pacientes com doença de Parkinson em diferentes populações

População	Nº de pacientes (Nº de pacientes mutados)	Nº de controles (Nº de controles mutados)	Referências
Japonesa	733 (4)	579 (0)	Ando <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	202 (0)	Não testada	Deng <i>et al.</i> , 2012
Italiana	475 (0)	Não testada	Guella <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	1.038 (0)	1.016 (0)	Guo <i>et al.</i> , 2012
Alemã/ Sérvia/ Americana/ Chilena	1.774 (1)	Não testada	Kumar <i>et al.</i> , 2012
19 países de quatro continentes	8.870 (7)	6.513 (0)	Sharma <i>et al.</i> , 2012
Britânica	597 (1)	Não testada	Sheerin <i>et al.</i> , 2012
Belga	677 (0)	800 (0)	Verstraeten <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	512 (0)	406 (0)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	609 (0)	600 (0)	Chen <i>et al.</i> , 2013
Caucasiana	213 (0)	272 (0)	Nuytemans <i>et al.</i> , 2013
Indiana	320 (0)	100 (0)	Sudhaman <i>et al.</i> , 2013
Sul africana	418 (0)	528 (0)	Blanckenberg <i>et al.</i> , 2014
Italiana	250 (0)	250 (0)	Gagliardi <i>et al.</i> , 2014
Brasileira	582 (0)	319 (0)	Presente estudo

A baixa frequência observada desta alteração em pacientes com DP é similar àquelas encontradas para as mutações de ponto no gene *SNCA* (Berg *et al.*, 2005a). Os pacientes com DP identificados com a mutação p.D620N possuem história familiar da doença, com herança autossômica dominante e essa mutação, como outras de transmissão dominante, está associada com penetrância incompleta associada à idade (Vilariño-Güell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011). As características clínicas observadas nos portadores da mutação são similares àquelas encontradas na DP idiopática e com boa resposta ao levodopa. Além disso, estudos de análises de haplótipo sugerem que a substituição p.D620N ocorre através de eventos mutacionais independentes, visto que os pacientes de uma mesma população não compartilham do mesmo haplótipo (Vilarino-Guell *et al.*, 2011; Ando *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012).

A substituição p.R524W no gene *VPS35*, descrita em apenas um paciente sem história familiar da DP, foi sugerida ser patogênica de acordo com três programas estatísticos (PolyPhen2, SNAP e SIFT) (Zimprich *et al.*,

2011). Após esses achados iniciais, essa mutação se mostrou ausente nos subsequentes estudos conduzidos, incluindo o nosso (Tabela 21).

Tabela 21- Sumário dos estudos da mutação p.R524W no gene *VPS35* em pacientes com doença de Parkinson de diferentes populações

População	Nº de pacientes (Nº de pacientes mutados)	Nº de controles (Nº de controles mutados)	Referências
Japonesa	733 (0)	579 (0)	Ando <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	202 (0)	Não testada	Deng <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	27 (0)	Não testada	Guo <i>et al.</i> , 2012
Britânica	96 (0)	Não testada	Sheerin <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	32 (0)	35 (0)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Caucasiana	213 (0)	272 (0)	Nuytemans <i>et al.</i> , 2013
Indiana	15 (0)	Não testada	Sudhaman <i>et al.</i> , 2013
Brasileira	582 (0)	319 (0)	Presente estudo

4.2 Análise das mutações p.R1205H e p.A502V no gene *EIF4G1*

As mutações de ponto p.R1205H e p.A502V no gene *EIF4G1* foram ausentes nos 582 pacientes brasileiros com DP e nos 319 controles saudáveis analisados, sugerindo que essas substituições são causas incomuns de DP entre os pacientes brasileiros.

A mutação p.R1205H no gene *EIF4G1* foi descrita inicialmente em uma família francesa com DP tardia segregando de modo autossômico dominante, sendo posteriormente encontrada em 7 pacientes com DP (2 americanos, 1 canadense, 1 irlandês, 2 italianos e 1 tunisiano) (Chartier-Harlin *et al.*, 2011). Corroborando os nossos achados na população brasileira, a mutação de ponto p.R1205H não foi encontrada em estudos conduzidos em populações europeias (Lesage *et al.*, 2012; Schulte *et al.*, 2012; Gagliardi *et al.*, 2014), asiáticas (Chen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Nishioka *et al.*, 2014), africana (Blanckenberg *et al.*, 2014) e indiana (Sudhaman *et al.*, 2013). A substituição p.R1205H foi encontrada em um paciente alemão sem história familiar (Huttenlocker *et al.*, 2014) e em um paciente caucasiano com história familiar da DP, entretanto, essa variante foi

descrita em um indivíduo saudável de 86 anos nessa família, sugerindo uma penetrância reduzida associada à idade (Nuytemans *et al.*, 2013). Huttenlocker e colaboradores (2014) conduziram um estudo de associação e não observaram qualquer correlação da mutação p.R1205H com o fenótipo da doença (OR= 1,3; p=0,5). Além disso, essa mutação também foi identificada em três controles saudáveis (Schulte *et al.*, 2012), levantando dúvidas se é uma mutação patogênica ou apenas uma variante benigna rara (Lesage *et al.*, 2012; Huttenlocker *et al.*, 2014) (Tabela 22).

Tabela 22- Sumário dos estudos da mutação p.R1205H no gene *E1F4G1* em pacientes com doença de Parkinson de diferentes populações

População	Nº de pacientes (Nº de pacientes mutados)	Nº de controles (Nº de controles mutados)	Referências
Europeia (maioria francesa)	251 (0)	236 (0)	Lesage <i>et al.</i> , 2012
Europeia	1.351 (0)	1.014 (3)	Schulte <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	609 (0)	600 (0)	Chen <i>et al.</i> , 2013
Chinesa	532 (0)	508 (0)	Li <i>et al.</i> , 2013
Caucasiana	213 (1)	272 (0)	Nuytemans <i>et al.</i> , 2013
Afro-americana/ americana/ Indiana/ Asiática/ Caucasiana/ outras	168 (0)	Não testada	Siitonen <i>et al.</i> , 2013
Indiana	320 (0)	100 (0)	Sudhaman <i>et al.</i> , 2013
Chinesa	425 (0)	Não testada	Yuan <i>et al.</i> , 2013
Asiática	96 (0)	Não testada	Zhao <i>et al.</i> , 2013
Sul africana	418 (0)	528 (0)	Blanckenberg <i>et al.</i> , 2014
Italiana	250 (0)	250 (0)	Gagliardi <i>et al.</i> , 2014
Alemã / Islandesa	2.146 (1)	Não testada	Huttenlocher <i>et al.</i> , 2014
Japonesa	319 (0)	374 (0)	Nishioka <i>et al.</i> , 2014
Brasileira	580 (0)	319 (0)	Presente estudo

Após a descoberta da mutação EIF4G1 p.A502V em quatro probandos com DP (3 americanos e um polonês) (Chartier-Harlin *et al.*, 2011), estudos posteriores falharam em replicar os resultados iniciais (Lesage *et al.*, 2012; Schulte *et al.*, 2012a; Li *et al.*, 2013; Nuytemans *et al.*, 2013; Siitonen *et al.*, 2013; Sudhaman *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Huttenlocker *et al.*, 2014; Nishioka *et al.*, 2014), sugerindo ser esta uma causa incomum de

doença de Parkinson, corroborando nossos achados em casuística brasileira (Tabela 23).

Tabela 23- Sumário dos estudos da mutação p.A502V no gene *E1F4G1* em pacientes com doença de Parkinson em diferentes populações

População	Nº amostral de pacientes (Nº de pacientes mutados)	Nº amostral de controles (Nº de controles mutados)	Referências
Europeia (maioria francesa)	251 (0)	236 (0)	Lesage <i>et al.</i> , 2012
Europeia	1.351 (0)	1.014 (0)	Schulte <i>et al.</i> , 2012
Chinesa	29 (0)	Não testada	Li <i>et al.</i> , 2013
Caucasiana	213 (0)	272 (0)	Nuytemans <i>et al.</i> , 2013
Afro-americana/ americana/ Indiana/ Asiática/ Caucasiana/ outras	168 (0)	Não testada	Siitonen <i>et al.</i> , 2013
Indiana	15 (0)	Não testada	Sudhaman <i>et al.</i> , 2013
Chinesa	425 (0)	Não testada	Yuan <i>et al.</i> , 2013
Asiática	96 (0)	Não testada	Zhao <i>et al.</i> , 2013
Alemã/ Islandesa	2.146 (0)	Não testada	Huttenlocher <i>et al.</i> , 2014
Japonesa	319 (0)	374 (0)	Nishioka <i>et al.</i> , 2014
Brasileira	580 (0)	319 (0)	Presente estudo

4.3 Análise da mutação p.G2019S no gene *LRRK2*

Nosso grupo rastreou a mutação de ponto p.G2019S no gene *LRRK2* em 582 probandos brasileiros com DP e identificou esta variante patogênica em heterozigose em 15 pacientes (2,6%), dos quais cinco haviam sido relatados anteriormente por Abdalla-Carvalho e colaboradores (2010). A frequência observada (2,6%), englobando uma amostra maior de probandos, foi semelhante aos nossos achados prévios (2,4%) (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010).

A mutação p.G2019S no *LRRK2* é a alteração genética mais frequente associada à DP em todo o mundo, com exceção da população asiática, sendo, no entanto, sua frequência altamente variável nos diferentes grupos étnicos

(para revisão Correia-Guedes *et al.*, 2010). Em relação a outras populações latino americanas nas quais foi estudada, verificamos que as frequências encontradas foram similares a nossa: 3% em indivíduos com DP chilenos (Perez-Pastene *et al.*, 2007), 0,4% em peruanos e 4% em uruguaios (Mata *et al.*, 2009) (Tabela 24).

Tabela 24- Sumário dos estudos da mutação p.G2019S no gene *LRRK2* em pacientes com doença de Parkinson em diferentes populações

População	Média da frequência encontrada nos estudos (%)	Referências
Norueguesa	2,1%	Aasly <i>et al.</i> , 2005
Sueca	1,4%	Carmine <i>et al.</i> , 2006
Alemã	0,8%	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; Berg <i>et al.</i> , 2005b; Hedrich <i>et al.</i> , 2006; Schlitter <i>et al.</i> , 2006; Möller <i>et al.</i> , 2008
Holandesa	0,0%	Macedo <i>et al.</i> , 2009
Belga	0,0%	Nuytemans <i>et al.</i> , 2008
Polonesa	0,0%	Bialecka <i>et al.</i> , 2005
Russa	1,6%	Illarioshkin <i>et al.</i> , 2007; Pchelina <i>et al.</i> , 2008
Austríaca	0,0%	Haubenberger <i>et al.</i> , 2007
Britânica	1,5%	Gilks <i>et al.</i> , 2005; Khan <i>et al.</i> , 2005; Williams-Gray <i>et al.</i> , 2006
Irlandesa	0,7%	Gosal <i>et al.</i> , 2005
Francesa	1,3%	Lesage <i>et al.</i> , 2005; Funalot <i>et al.</i> , 2006; Lesage <i>et al.</i> , 2007
Portuguesa	6,1%	Brás <i>et al.</i> , 2005; Ferreira <i>et al.</i> , 2007
Espanhola	5,1%	Infante <i>et al.</i> , 2006; Mata <i>et al.</i> , 2006; Gaig <i>et al.</i> , 2006; González-Fernández <i>et al.</i> , 2007; Gorostidi <i>et al.</i> , 2009
Italiana	1,7%	Di Fonzo <i>et al.</i> , 2005; Goldwurm <i>et al.</i> , 2006; Marongiu <i>et al.</i> , 2006; Squillaro <i>et al.</i> , 2007; Civitelli <i>et al.</i> , 2007; De Rosa <i>et al.</i> , 2009
Grega	0,1%	Xiromerisiou <i>et al.</i> , 2007; Kalinderi <i>et al.</i> , 2007; Papapetropoulos <i>et al.</i> , 2008
Israelense (JA)	14,8%	Orr-Urtreger <i>et al.</i> , 2007
Israelense (NJA)	2,7%	Orr-Urtreger <i>et al.</i> , 2007
Árabe norte africana	39,0%	Ishihara <i>et al.</i> , 2007; Lesage <i>et al.</i> , 2008; Lesage <i>et al.</i> , 2005; Lesage <i>et al.</i> , 2006; Hulihan <i>et al.</i> , 2008
Nigeriana	0,0%	Okubadejo <i>et al.</i> , 2008
Canadense	0,6%	Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2005; Dupré <i>et al.</i> , 2007; Grimes <i>et al.</i> , 2007
Americana (C)	1,9%	Nichols <i>et al.</i> , 2005; Ishihara <i>et al.</i> , 2007; Farrer <i>et al.</i> , 2005; Hernandez <i>et al.</i> , 2005; Zabetian <i>et al.</i> , 2005; Kay <i>et al.</i> , 2006; Scholz <i>et al.</i> , 2006; Deng <i>et al.</i> , 2006; Johnson <i>et al.</i> , 2007
Americana (H)	5,0%	Deng <i>et al.</i> , 2006
Americana (J)	13,0%	Deng <i>et al.</i> , 2006; Clarck <i>et al.</i> , 2006; Ozelius <i>et al.</i> , 2006
Brasileira	2,8%	Munhoz <i>et al.</i> , 2008; Pimentel <i>et al.</i> , 2008
Chilena	3,0%	Perez-Pastene <i>et al.</i> , 2007
Peruana	0,4%	Mata <i>et al.</i> , 2009
Uruguaia	4,0%	Mata <i>et al.</i> , 2009
Indiana	0,1%	Punia <i>et al.</i> , 2006
Taiwanesa	0,0%	Lu <i>et al.</i> , 2005; Fung <i>et al.</i> , 2006; Lin <i>et al.</i> , 2008; Mata <i>et al.</i> , 2005; Calne <i>et al.</i> , 1992; Farrer <i>et al.</i> , 2007
Singapuriana	0,0%	Tan <i>et al.</i> , 2005
Sul coreana	0,0%	Cho <i>et al.</i> , 2007; Choi <i>et al.</i> , 2008
Japonesa	0,3%	Zabetian <i>et al.</i> , 2006
Australiana	1,9%	Huang <i>et al.</i> , 2007; Mellick <i>et al.</i> , 2009

JA: Judeus *Ashkenazi*; NJA: Não judeus *Ashkenazi*; C: Caucásiana; H: Hispânica; J: Judaica

4.3.1 Estudo de associação fenótipo-genótipo

Ao contrário do observado na DP idiopática, na qual a incidência no sexo masculino é 1,5 maior em comparação às mulheres, (Wooten *et al.*, 2004), assim como observado no nosso estudo (63,66%), entre os pacientes carreadores da mutação p.G2019S, geralmente, o sexo feminino é encontrado em maior proporção (Or-Urtreger *et al.*, 2007; Gan-Or *et al.*, 2010; Saunders-Pullman *et al.*, 2011; Alcalay *et al.*, 2013). Também em nosso estudo, observamos uma frequência maior da mutação no sexo feminino (9/15 - 64,3%), como mostra a tabela 5. Além disso, Trinh e colaboradores (2014), em um estudo conduzido na população tunisiana, observaram que mulheres portadoras da mutação p.G2019S manifestam a doença aproximadamente 5 anos antes do que os homens portadores. É possível que haja fatores de susceptibilidade ligados ao sexo associados à via celular da dardarina (Orr-Urtreger *et al.*, 2007), o que explicaria a maior prevalência da mutação p.G2019S entre as mulheres, entretanto, ainda não há estudos que comprovem essa teoria.

A idade de manifestação dos sintomas iniciais da DP é bem variável entre os pacientes, entretanto, ela tende a ser menor entre os carreadores da mutação p.G2019S (Orr-Urtreger *et al.*, 2007; Healy *et al.*, 2008), assim como visto no nosso estudo (carreadores $47,64 \pm 9,36$; não carreadores $52,6 \pm 13,3$). Contudo, nossos resultados não foram estatisticamente significativos ($p=0,06$), ou pode ser devido ao tamanho da amostra.

Pacientes heterozigotos para a mutação p.G2019S no gene *LRRK2* tipicamente apresentam um quadro clínico similar àqueles com DP idiopática com bradicinesia, rigidez, tremor e boa resposta ao levodopa (Paisán-Ruiz *et al.*, 2004; Haugarvoll *et al.*, 2009). Entretanto, assim como em nossos achados, a incidência do tremor parece ser elevada em portadores de mutações no gene *LRRK2* (Nuytemans *et al.*, 2008; Gan-Or *et al.*, 2010; Trinh *et al.*, 2014). Estudos com um maior tamanho amostral de portadores da p.G2019S serão necessários para determinar a influência dessa mutação no fenótipo clínico dos pacientes.

4.4 Análise das variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene *LRRK2*

Até o momento, a maior parte dos estudos conduzidos como o intuito de analisar o significado de variantes no gene *LRRK2* na etiologia da DP foram realizados em populações de origem europeia, asiática e norte-americana. Assim, pesquisas voltadas para a identificação do efeito de variantes no gene *LRRK2* associada à DP em populações latino-americanas são escassas. Tendo em vista a composição genética única da população brasileira, resultante da miscigenação interétnica entre europeus, africanos e ameríndios (Pena *et al.*, 2011) e a variabilidade das frequências dessas variantes encontradas entre grupos étnicos diferentes, estudos com esse enfoque são de extrema importância.

Nossas análises conduzidas nos 551 indivíduos brasileiros (329 probandos com DP e 222 controles saudáveis) para as variantes exônicas raras p.Q1111H, p.T1410M, p.M1646T, p.S1761R e p.Y2189C no gene *LRRK2* não mostraram qualquer associação estatisticamente significativa.

A mutação p.S1761R no gene *LRRK2* não foi por nós encontrada entre os 329 probandos com DP da região sudeste do Brasil e nos 222 controles saudáveis analisados. Nosso estudo sugere que essa variante é rara entre os brasileiros. Um estudo conduzido em 1.217 pacientes oriundos de países latino-americanos, incluindo o Brasil, também não identificou a variante em questão, suportando nossa hipótese (Mata *et al.*, 2013). Evidências sugerem que essa mutação tenha surgido a partir de um efeito fundador na Espanha, visto que dos três pacientes espanhóis identificados com a alteração, dois compartilhavam o mesmo haplótipo (Lorenzo-Betencor *et al.*, 2012).

O alelo raro (T) da variante exônica p.Q1111H foi encontrado com mesma frequência alélica (0,3%) entre os pacientes da região sudeste do Brasil e controles saudáveis analisados nesse estudo, não havendo portanto diferença estatística. Essa baixa frequência encontrada está de acordo com os dados anteriormente publicados que sugerem que essa variante foi originada entre os ameríndios puros, visto a alta incidência em controles saudáveis ameríndios (18,4%) e em pacientes (10%) e controles (7,4%) do Peru e em

pacientes (4,6%) e controles (3,4%) do Chile comparada às frequências encontradas nos pacientes da Argentina (1%), Uruguai (1%) que historicamente tiveram uma menor mistura ameríndia (Mata *et al.*, 2011). Considerando que a patogenicidade dessa variante ainda não foi comprovada, nossos estudos corroboram achados anteriores (Mata *et al.*, 2011) de que essa variante pode ser um polimorfismo não patogênico.

Diferentemente dos achados por Ross e colaboradores (2011) que descreveram uma associação de risco (OR= 1,43, IC= 1,15-1,78; $p=0,0012$) entre a variante exônica LRRK2 p.M1646T e indivíduos brancos com DP oriundos de diferentes países, nossos resultados não apontaram qualquer significância dessa variante em pacientes brasileiros com DP (IC= 0,50-159; $p=0,08$), apesar dessa alteração ter sido encontrada apenas no grupo de pacientes e do valor de OR ter sido consideravelmente alto (8,91) (Tabela 25).

Tabela 25- Frequência do alelo menos frequente (C) da variante p.M1646T no gene *LRRK2* em pacientes e controles saudáveis e OR de acordo com a população

População	Nº de pacientes (% do alelo raro C nos pacientes)	Nº de controles (% do alelo raro C nos controles)	OR*	IC	Referências
Francesa	581 (1,92%)	145 (0,35%)	5,68	0,76-42,58	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Grega	509 (1,24%)	430 (0,37%)	2,5	0,69-9,11	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Polonesa	381 (0,94%)	344 (0,76%)	1,25	0,39-3,98	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Americana	1.326 (2,03%)	648 (0,88%)	2,06	1,04-4,07	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Alemã	1.131 (2,02%)	905 (0,97%)	2,13	1,20-3,78	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Sueca	93 (2,25%)	184 (1,1%)	2,09	0,51-8,58	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Norueguesa	697 (1,31%)	614 (1,12%)	1,17	0,56-2,42	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Italiana	491 (2,85%)	412 (1,83%)	1,43	0,74-2,76	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Irlandesa	392 (2,24%)	462 (1,87%)	1,21	0,61-2,40	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Australiana	994 (1,85%)	760 (1,88%)	0,98	0,60-1,63	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Belga	314 (2,45%)	590 (2,27%)	1,08	0,53-2,23	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Sul africana	86 (0,6%)	101 (2,55%)	0,23	0,03-1,98	Ross <i>et al.</i> , 2011 Heckman <i>et al.</i> , 2013
Brasileira	321 (0,9%)	222 (0%)	8,91	0,50-159	Presente estudo

OR*: OR ajustado; IC: Intervalo de confiança (Fonte: Ross *et al.*, 2011)

A variante rara *LRRK2* p.T1410M foi inicialmente descrita em pacientes (9,3%) e controles saudáveis (4,9%) caribenhos (Lesage *et al.*, 2009). Apesar dessa substituição ter sido descrita como possivelmente patogênica por análises *in silico* (Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010), ela foi encontrada em maior frequência entre os controles (0,9%) do que na amostra de pacientes (0,6%), mas não foi observada diferença estatisticamente significativa. Assim como sugerido por estudos anteriores (Lesage *et al.*, 2009; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010), nossos resultados apontam a variante *LRRK2* p.T1410M como um polimorfismo não patogênico sem associação com a DP.

A variante *LRRK2* p.Y2189C, previamente descrita em um paciente belga com DP de herança autossômica dominante (Nuytemans *et al.*, 2008), foi encontrada em maior frequência entre os nossos controles saudáveis (0,9%)

do que no grupo de probandos (0,6%). Contrariando os achados de Jasinska-Myga e colaboradores (2010) que encontraram uma associação de risco estatisticamente significativa ($p= 0,0053$) entre a variante p.Y2189C e a DP, nossos dados sinalizam que essa variante é um polimorfismo não patogênico.

4.5 Análise das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

As análises das variantes exônicas comuns p.N551K e p.R1398H no gene *LRRK2* não apresentaram qualquer associação alélica, genotípica ou de carreador estatisticamente significativa nas diferentes estratificações, no entanto, o genótipo raro (AA) da variante p.K1423K parece conferir risco para doença de Parkinson.

A realização de estratificações da amostra atua como uma força seletiva, visto que a seleção amostral deixa de ser ao acaso, sendo assim, seria esperado que as frequências genotípicas nas amostras estratificadas de pacientes não estivessem em EHW, assim como foi observado nas estratificações sudeste familiar para as três variantes comuns p.N551K (Tabela 10), p.R1398H (Tabela 11) e p.K1423K (Tabela 12) e na estratificação sudeste ≥ 50 anos para as variantes p.R1398H (Tabela 11) e p.K1423K (Tabela 12).

As análises conduzidas na amostra de 329 pacientes brasileiros com DP naturais da região sudeste do Brasil e nas estratificações (DP esporádica; DP familiar; DP tardia (≥ 50 anos); Estado do Rio de Janeiro), para a variante exônica comum *LRRK2* p.N551K (c.1653C>G), ao serem comparadas ao grupo de 222 controles saudáveis do Estado do Rio de Janeiro, revelaram uma maior frequência do genótipo heterozigoto (CG) no grupo controle. No entanto, as análises de regressão logística não mostraram qualquer associação alélica, genotípica e de carreador estatisticamente significativa, mesmo após as correções para as variáveis sexo e idade.

Com exceção dos trabalhos conduzidos nas populações asiáticas que mostraram associação de proteção da p.N551K em relação à DP (Tan *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011; Gopalai *et al.*, 2013), a análise dessa variante em

diferentes grupos étnicos não indicou significância estatística, mostrando somente tendência à proteção ou ao risco, assim como o observado em nosso estudo (Tabela 26).

Tabela 26- Valor do *Odds Ratio* para o alelo raro (G) da variante exônica LRRK2 p.N551K encontrado em diferentes populações

População	OR*	IC	Referências
Grega	1,05	0,59-1,85	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2006
Finlandesa	1,06	0,58-1,94	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2007
Caucasiana	0,93	0,68-1,26	Pankratz <i>et al.</i> , 2008
Caucasiana	0,92	0,59-1,45	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009
Caucasiana	0,88	0,66-1,15	Simón-Sanchez <i>et al.</i> , 2009
Tunisiana	0,87	0,53-1,40	Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010
Afro-descendente	1,97	0,83-4,67	Ross <i>et al.</i> , 2010
Singapuriana	0,89	0,52-1,53	Tan <i>et al.</i> , 2010
Singapuriana	0,64	0,42-0,98	Tan <i>et al.</i> , 2010
Taiwanesa	0,58	0,39-0,87	Tan <i>et al.</i> , 2010
Chinesa	0,87	0,64-1,20	Tan <i>et al.</i> , 2010
Caucasiana	0,89	0,79-1,00	Ross <i>et al.</i> , 2011
Asiática	0,74	0,60-0,91	Ross <i>et al.</i> , 2011
Árabe	0,84	0,48-1,46	Ross <i>et al.</i> , 2011
Taiwanesa	0,91	0,67-1,25	Wu <i>et al.</i> , 2013
Brasileira (região sudeste)	1,07	0,59-1,95	Presente estudo
Brasileira (sudeste esporádico)	0,97	0,49-1,92	Presente estudo
Brasileira (sudeste familiar)	1,16	0,53-2,50	Presente estudo
Brasileira (sudeste ≥50 anos)	1,12	0,61-2,06	Presente estudo
Brasileira (Rio de Janeiro)	1,14	0,59-2,23	Presente estudo

OR*: OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; IC: Intervalo de confiança (Fonte: <http://www.pdgene.org/meta.asp?geneid=13&polyID=255>, com modificações).

As análises realizadas para a variante LRRK2 p.R1398H (c.4193G>A) revelaram uma maior frequência do alelo raro (A) na amostra de pacientes da região sudeste do Brasil, embora em todas as estratificações realizadas ela tenha sido encontrada em maior frequência no grupo controle. Apesar do OR bruto e ajustado do alelo raro (A) ter mostrado uma tendência à proteção (OR<1), em todas as análises eles não tiveram poder estatisticamente significativo (p<0,05). O mesmo foi observado para a análise de genótipo (GA) e de carreador do alelo menos frequente (A). Assim como a variante p.N551K, a variante exônica p.R1398H mostrou um efeito protetor apenas nas populações asiáticas (Tan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2011; Gopalai *et al.*, 2013), não mostrando qualquer associação nos demais grupos

étnicos estudados, sugerindo uma associação à proteção à DP apenas entre os asiáticos (Tabela 27).

Tabela 27- Valor do *Odds Ratio* para o alelo raro (A) da variante exônica LRRK2 p.R1398H encontrado em diferentes populações

População	OR*	IC	Referências
Caucasiana	0,94	0,65-1,34	Biskup <i>et al.</i> , 2005
Caucasiana	1,14	0,68-1,90	Paisán-Ruíz- <i>et al.</i> , 2005
Grega	0,93	0,52-1,64	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2006
Finlandesa	1,27	0,66-2,44	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2006
Caucasiana	0,91	0,68-1,23	Pankratz <i>et al.</i> , 2008
Caucasiana	0,87	0,56-1,35	Nuytemans <i>et al.</i> , 2009
Caucasiana	0,91	0,70-1,20	Simón-Sánchez <i>et al.</i> , 2009
Caucasiana	0,96	0,61-1,53	Sutherland <i>et al.</i> , 2009
Asiática	0,81	0,58-1,13	Chen <i>et al.</i> , 2010
Caucasiana	1,44	1,02-2,04	Chung <i>et al.</i> , 2010
Africana	0,93	0,59-1,48	Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010
Afro-americana	1,04	0,37-2,93	Ross <i>et al.</i> , 2010
Singapuriana	0,89	0,52-1,53	Tan <i>et al.</i> , 2010
Singapuriana	0,64	0,42-0,98	Tan <i>et al.</i> , 2010
Chinesa	0,87	0,64-1,20	Tan <i>et al.</i> , 2010
Asiática	0,79	0,66-0,96	Chen <i>et al.</i> , 2011
Caucasiana	0,90	0,80-1,02	Ross <i>et al.</i> , 2011
Asiática	0,73	0,59-0,90	Ross <i>et al.</i> , 2011
Árabe	1,05	0,62-1,77	Ross <i>et al.</i> , 2011
Taiwanesa	0,79	0,62-1,23	Wu <i>et al.</i> , 2013
Brasileira (região sudeste)	0,81	0,45-1,49	Presente estudo
Brasileira (sudeste esporádico)	0,72	0,36-1,47	Presente estudo
Brasileira (sudeste familiar)	0,92	0,42-2,00	Presente estudo
Brasileira (sudeste ≥50 anos)	0,91	0,49-1,69	Presente estudo
Brasileira (Rio de Janeiro)	0,84	0,42-1,67	Presente estudo

OR*: OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; IC: Intervalo de confiança (Fonte: <http://www.pdgene.org/meta.asp?geneid=13&polyID=132>, com modificações).

Enquanto a mutação patogênica p.G2019S no gene *LRRK2* aumenta a atividade quinase da proteína dardarina (Greggio *et al.*, 2006; Lu & Tan *et al.*, 2008), a variante p.R1398H parece ter um resultado oposto, levando a um efeito protetor. A variante p.R1398H está localizada no domínio ROC, que pertence a superfamília GTPase Ras, e a ativação da atividade quinase da dardarina é dependente da ativação por GTPase. Sendo assim, uma alteração

no domínio ROC, como a substituição p.R1398H, pode influenciar na ligação ou na hidrólise do GTP ou na saída do GDP, levando a uma diminuição da atividade quinase da proteína e, conseqüentemente, a uma melhora em termos da toxicidade celular (Tan *et al.*, 2008, 2010).

As análises conduzidas na amostra sudeste e nas diferentes estratificações para a variante p.K1423K (c.4269G>A) para o genótipo heterozigoto (GA), o alelo raro (A) e de carreador do alelo raro (A) não mostraram qualquer associação com poder estatisticamente significativo, semelhante ao encontrado em estudos anteriores (Pankratz *et al.*, 2008; Simón-Sánchez *et al.*, 2009, Ross *et al.* 2010; Tan *et al.*, 2010; Wu-Chou *et al.*, 2013) (Tabela 28).

Tabela 28- Valor do *Odds Ratio* para o alelo raro (A) da variante exônica LRRK2 p.K1423K encontrado em diferentes populações

População	OR*	IC	Referências
Caucasiana	0,9	0,67-1,21	Pankratz <i>et al.</i> , 2008
Caucasiana	0,91	0,77-1,08	Simón-Sánchez <i>et al.</i> , 2009
Caucasiana	1,45	1,02-2,05	Chung <i>et al.</i> , 2010
Africana	0,41	0,21-0,82	Jasinska-Myga <i>et al.</i> , 2010
Afro-americana	1,70	0,32-9,09	Ross <i>et al.</i> , 2010
Asiática	0,72	0,47-1,11	Tan <i>et al.</i> , 2010
Caucasiana	0,83	0,74-0,94	Ross <i>et al.</i> , 2011
Asiática	0,75	0,61-0,92	Ross <i>et al.</i> , 2011
Árabe	0,42	0,20-0,89	Ross <i>et al.</i> , 2011
Taiwanesa	0,78	0,59-1,03	Wu-Chou <i>et al.</i> , 2013
Brasileira (região sudeste)	1,30	0,62-2,72	Presente estudo
Brasileira (sudeste esporádico)	1,08	0,50-2,33	Presente estudo
Brasileira (sudeste familiar)	1,79	0,73-4,04	Presente estudo
Brasileira (sudeste ≥50 anos)	1,41	0,67-2,97	Presente estudo
Brasileira (Rio de Janeiro)	1,47	0,65-3,35	Presente estudo

OR*: OR ajustado para as co-variáveis sexo e idade; IC: Intervalo de confiança (Fonte: <http://www.pdgene.org/meta.asp?geneid=13&polyID=230>, com modificações).

Entretanto, o estudo de associação com o genótipo raro (AA) na estratificação sudeste familiar mostrou uma associação de risco à DP com um OR de 10,66 ($p= 0,03$). Mesmo após os ajustes para as co-variáveis sexo e idade, o genótipo AA não perdeu a significância estatística passando a ter um OR ainda maior (15,22; $p= 0,02$), porém, o intervalo de confiança não foi

preciso (não corrigido= 1,23-92,56; corrigido= 1,54-150,22), deixando dúvidas do valor real do risco que essa variante pode proporcionar. Interessantemente, o genótipo raro (AA) não foi encontrado entre o grupo sudeste esporádico, reforçando a hipótese de que esta variante possa proporcionar um risco para a DP familiar, apesar de ser uma variante silenciosa. Diferentemente dos nossos achados, estudos anteriores descreveram a variante p.K1423K como um fator protetor (Jasinska-Myga *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2011). Entretanto, populações distintas podem apresentar resultados opostos devido às diferenças nas frequências alélicas e genótípicas observadas em diferentes grupos étnicos, o que explicaria os resultados divergentes.

4.5.1 Análise de haplótipos relativos às combinações alélicas das variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

O haplótipo 2 (C-A-G) formado pela combinação das variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*, revelou ser protetor contra o desenvolvimento da DP na amostra sudeste (OR= 0,35; IC= 0,13 – 0,93; p= 0,04), padrão mantido após os ajustes para as co-variáveis (OR= 0,32; IC= 0,12 – 0,89; p= 0,03). O haplótipo 6 (G-A-G) também mostrou susceptibilidade à proteção na estratificação Rio de Janeiro (OR= 0,15; IC= 0,03 – 0,75; p= 0,02) mesmo após os ajustes (OR= 0,19; IC= 0,04 – 0,96; p= 0,04). Apesar de não ter sido encontrada associação com o haplótipo 5 (G-A-A), anteriormente descrito como protetor (Ross *et al.*, 2011), em ambos haplótipos (2 e 6) encontrados, a variante p.R1398H estava presente. Dessa forma, nosso estudo suporta a hipótese de que a p.R1398H é a variante funcional que confere o efeito protetor ao haplótipo, como mostrado em estudos anteriores (Tan *et al.*, 2010; Heckman *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* mostraram que a variante p.1398H apresentou diminuição na atividade quinase quando comparada com a forma selvagem p.R1398 (Tan *et al.*, 2010).

4.5.2 Análise de desequilíbrio de ligação relativo às variantes exônicas comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K no gene *LRRK2*

Tan e colaboradores (2010) observaram que as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K segregam juntas na forma de haplótipo ($r^2 > 80$) na população chinesa. O mesmo foi confirmado em estudos posteriores envolvendo asiáticos (Ross *et al.*, 2011; Wu-chou *et al.*, 2013), árabes norte africanos e caucasianos (Ross *et al.*, 2011). Nosso estudo foi o primeiro trabalho com este enfoque em uma população latino-americana e, ao contrário dos estudos anteriores, as variantes p.N551K, p.R1398H e p.K1423K não estão em DL na amostra de 222 indivíduos controles brasileiros ($r^2 \leq 45$). O mesmo foi observado em um estudo conduzido na população afro-americana ($r^2 = 16$) (Ross *et al.*, 2010). Os resultados divergentes sugerem que este haplótipo está em alto DL apenas nas populações dos continentes asiático e africano, mas não no continente americano. Entretanto, esse resultado pode ser um falso-negativo devido à limitação do tamanho da amostra controle.

Em se tratando do primeiro estudo caso-controle com enfoque em variantes exônicas no gene *LRRK2* na população brasileira, reinteramos a importância de estudos futuros de replicação envolvendo maior número amostral, de modo a confirmar as associações observadas nesse estudo. Além disso, é de extrema importância que este estudo seja conduzido em indivíduos de diferentes regiões do Brasil, já que ocorre uma predominância de ameríndios na região amazônica (norte), uma predominância de linhagens africanas no nordeste do país, um equilíbrio no sudeste e uma dominância europeia no sul (Parra *et al.*, 2003).

CONCLUSÕES

A análise dos genes *VPS35* e *EIF4G1*, conduzida em uma amostra de 582 probandos brasileiros com DP, mostrou que mutações nesses genes são causas raras da doença em nossa população.

A mutação p.G2019S no gene *LRRK2*, presente em 15 pacientes avaliados (2,6%), reforça a importância desta mutação como causa da DP em nossa população.

A mutação patogênica p.G2019S afeta em maior frequência o sexo feminino.

Os pacientes portadores da mutação p.G2019S tipicamente possuem boa resposta ao medicamento L-dopa e apresentam bradicinesia, rigidez e tremor em repouso.

A mutação p.S1761R do gene *LRRK2* se mostrou ausente nos 551 indivíduos brasileiros analisados.

As variantes raras p.Q1111H, p.M1646T, p.T1410M e p.Y2189C do gene *LRRK2* não mostraram qualquer associação genotípica estatisticamente significativa na amostra sudeste analisada.

A análise das variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* na amostra total do sudeste e nas estratificações sudeste esporádico, sudeste ≥ 50 anos e Rio de Janeiro não revelaram associações alélicas, genotípicas e de carreador. Na análise estratificada dos pacientes com história familiar da DP, a variante p.K1423K se mostrou associada ao risco da doença (OR= 15,22; IC= 1,54-150,22; p=0,02).

A análise de haplótipos formados pelas combinações alélicas das variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* revelou que o haplótipo 2 (C-A-G) está associado à proteção na amostra sudeste (OR= 0,32; IC= 0,12-0,89 p= 0,03) e o haplótipo 6 (G-A-G) mostrou estar associado à proteção na estratificação Rio de Janeiro (OR= 0,19; IC= 0,04 – 0,96; p= 0,04).

A análise de desequilíbrio de ligação para as variantes comuns p.N551K, p.R1398H e p.K1423K do gene *LRRK2* revelou que elas não estão em DL ($r^2 < 80$).

REFERÊNCIAS

- AASLY JO, VILARIÑO-GÜELL C, DACHSEL JC, et al. Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 25, p. 2156-2163, 2010.
- AASLY JO, TOFT M, FERNANDEZ-MATA I, et al. Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in central Norway. *Ann Neurol*, v. 57, p. 57: 762-765, 2005.
- ABBOTT RD, PETROVITCH H, WHITE LR, et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*, v. 57, p. 456-462, 2001.
- ABBOTT RD, ROSS GW, WHITE LR, et al. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology*, v. 65, p. 1442, 2005.
- ABDALLA-CARVALHO CB. *Relação entre a doença de Parkinson e o gene LRRK2: um estudo na população brasileira*. 2011. 172 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- ABDALLA-CARVALHO CB, SANTOS-REBOUÇAS CB, GUIMARÃES BC, et al. Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 17, p. 1479-1481, 2010.
- ALCALAY RN, MIRELMAN A, SAUNDERS-PULLMAN R, et al. Parkinson disease phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord*, v. 28(14), p. 1966-1971, 2013.
- ANDO M, FUNAYAMA M, LI Y, et al. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 27, p. 1413-1417, 2012.
- ANITEI M, HOFACK B. Exit from the trans-Golgi network: from molecules to mechanism. *Curr Opin Cell Biol*, v. 23, p. 443-451, 2011.
- ATTAR N, CULLEN PJ. The retromer complex. *Adv Enzyme Regul*, v. 50, p. 216-236, 2010.
- BERG D, NIWAR M, MAASS S, et al. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord*, v. 20(9), p. 1191-1194, 2005a.
- BERG D, SCHWEITZER K, LEITNER P, et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain*, v. 128: p. 3000-3011, 2005b.

BERWICK DC, HARVEY K. LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6. *Hum Mol Genet*, v. 21, p. 4966-4979, 2012.

BERWICK DC, HARVEY K. LRRK2 signaling pathways: the key to unlocking neurodegeneration? *Trends Cell Biol*, v. 21, p.257-265, 2011.

BIALECKA M, HUI S, KLODOWSKA-DUDA G, et al. Analysis of LRRK2 G2019S and I2020T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, v. 390, p. 1-3, 2005.

BLANCKENBERG J, NTSAPI C, CARR JA, et al. *EIF4G1* R1205H and *VPS35* D620N mutations are rare in Parkinson's disease from South Africa. *Neurobiol Aging*, v. 35(2), p. 445.e1-3, 2014.

BONIFACINO JS, ROJAS R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 568-579, 2006.

BONIFATI V, RIZZU P, SQUITIERI F, et al. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci*, v. 24, p. 159-160, 2003.

BONIFATI V. Genetic of Parkinson's disease – state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 20, p. S1:S23-S8, 2014.

BRAAK H, BOHL JR, MÜLLER CM, et al. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord*, v. 21, p. 2042-2051, 2006.

BRAAK H, DEL TREDICI K, RÜB U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, v. 24(2), p. 197-211, 2003.

BRÁS JM, GUERREIRO RJ, RIBEIRO MH, et al. G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort. *Mov Disord*, v. 20(12), p. 1653-1655, 2005.

CARMINE BELIN A, WESTERLUND M, SYDOW O, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) mutations in a Swedish Parkinson cohort and a healthy nonagenarian. *Mov Disord*, v. 21(10), p.1731-1734, 2006.

CAUNE DB, SNOW BJ, LEE C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 32(S1), p.S125-S127, 1992.

CASALS J, ELIZAN TS, YAHR MD. Postencephalitic parkinsonism - a review. *J Neural Transm*, v. 105, p. 645-676, 1998.

CAUDLE WM, COLEBROOKE RE, EMSON PC, et al. Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci*, v. 31, p. 303-308, 2008.

CHARTIER-HARLIN MC, DACHSEL JC, VILARIÑO-GÜELL C, et al. Translation initiator *EIF4G1* mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, v. 89, p.398-406, 2011.

- CHEN D, XIAO H, ZHANG K, et al. Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor recycling. *Science*, v. 327, p. 1261-1264, 2010.
- CHEN L, ZHANG S, LIU Y, et al. LRRK2 R1398H polymorphism is associated with decreased risk of Parkinson's disease in a Han Chinese population. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 17, p. 291-292, 2011.
- CHEN Y, CHEN K, SONG W, et al. VPS35 Asp620Asn and EIF4G1 Arg1205His mutations are rare in Parkinson disease from Southwest China. *Neurobiol Aging*, v. 34, p. 1709.e7–1709.e8, 2013.
- CHO JW, KIM SY, PARK SS, et al. The G2019S LRRK2 mutation is rare in Korean patients with Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, v. 34, p. 53-55, 2007.
- CHOI JM, WOO MS, MA HI, et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008; 9: 263-269.
- CIVITELLI D, TARANTINO P, NICOLETTI G, et al. LRRK2 G6055A mutation in Italian patients with familial or sporadic Parkinson's disease. *Clin Genet*, v. 71, p. 367-370, 2007.
- CLARK LN, WANG Y, KARLINS E, et al. Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease. *Neurology*, v. 67, p. 1786-1791, 2006.
- CONNOLLY BS, LANG AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, v. 311(16), p. 1670-1683, 2014.
- COOKSON MR. Cellular effects of LRRK2 mutations. *Biochem Soc Trans*, v. 40, p. 1070-1073, 2012.
- COOKSON MR. α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener*, v. 4, p. 9, 2009.
- CORREIA-GUEDES L, FERREIRA JJ, ROSA MM, et al. Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 16(4), p. 237-242, 2010.
- DE LAU LML, BRETILER MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, v. 5, p. 525-535, 2006.
- DE ROSA A, CRISCUOLO C, MANCINI P, et al. Genetic screening for LRRK2 gene G2019S mutation in Parkinson's disease patients from Southern Italy. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15(3), p. 242-244, 2009.
- DENG J, LEWIS PA, GREGGIO E, et al. Structure of the Roc domain from the Parkinson's disease associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, p. 1499-1504, 2008.
- DENG H, LE W, GUO Y, et al. Genetic analysis of LRRK2 mutations in patients with Parkinson disease. *J Neurol Sci*, v. 251(1e2), p. 102-106, 2006.

- DENG H, XU H, DENG X, et al. VPS35 mutation in Chinese Han patients with late-onset Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 19, p. e96-e97, 2012.
- DENG H, LE W, GUO Y, et al. Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with LRRK2 G2019S mutation. *Ann Neurol*, v. 57, p. 933-934, 2005.
- DI FONZO A, ROHE CF, FERREIRA J, et al. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*, v. 365(9457), p. 412-415, 2005.
- 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*, v. 14(3), p. 322-331, 2006.
- DOTY RL, DEEMS DA, STELLAR S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*, v. 38, p. 1237-1244, 1988.
- DUPRÉ N, RIVIÈRE JB, MYERS RH, et al. LRRK2 is not a significant cause of Parkinson's disease in Frenche Canadians. *Can J Neurol Sci*, v. 34, p. 333-335, 2007.
- EDGAR AJ, POLAK JM. Human homologues of yeast vacuolar protein sorting 29 and 35. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 277, p. 622-630, 2000.
- FAHN, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*, v. 47, p. S2-S9, 2000.
- FARRER M, ROSS AO. LRRK2-related Parkinson disease. GeneReviews. Seattle, WA: University of Washington, 2006.
- FARRER M, STONE J, MATA IF, et al. LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *Neurology*, v. 65, p. 738-740, 2005.
- FARRER MJ, STONE JT, LIN CH, et al. Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 13, p. 89-92, 2007.
- FARRER MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Ver Genet*, v. 7, p. 306-318, 2006.
- FERREIRA JJ, CORREIA GUEDES L, ROSA MM, et al. High prevalence of LRRK2 mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal. *Mov Disord*, v. 22(8), p. 1194-1201, 2007.
- FUNALOT B, NICHOLS WC, PÉREZ-TUR J, et al. Genetic screening for two LRRK2 mutations in French patients with idiopathic Parkinson's disease. *Genet Test*, v. 10(4), p. 290-293, 2006.

FUNG HC, CHEN CM, HARDY J, et al. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 21(6), p. 880-881, 2006.

GAGLIARDI M, ANNESI G, TARANTINO P, et al. Frequency of the Asp620Asn mutation in VPS35 and Arg1205His mutation in EIF4G1 in familial Parkinson's disease from South Italy. *Neurobiol Aging*, v. 35(10), p. 2422e1-2422e2, 2014.

GAIG C, EZQUERRA M, MARTI MJ, et al. LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol*, v. 63, p. 377-382, 2006.

GAIG C, TOLOSA E. When does parkinson's disease begin? *Mov Disord*, v. 24, p. S656-S664, 2009.

GAN-OR Z, BAR-SHIRA A, MIRELMAN A, et al. The age at motor symptoms onset in LRRK2-associated Parkinson's disease is affected by a variation in the MAPT locus: a possible interaction. *J Mol Neurosci*, v. 46, p. 541-544, 2012.

GAN-OR Z, BAR-SHIRA A, MIRELMANN A, et al. LRRK2 and GBA mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease. *Neurogenetics*, v. 11, p. 121-125, 2010.

GASSER T, HARDY J, MIZUNO Y. Milestones in PD genetics. *Mov Disord*, v. 26, p. 1042-1048, 2011.

GEHRKE S, IMAI Y, SOKOL N, et al. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*, v. 466, p. 637-641, 2010.

GILKS WP, ABOU-SLEIMAN PM, GANDHI S, et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365: 415-416.

GOLDMAN SM, TANNER CM, OAKES D, et al. Head injury and Parkinson's disease risk in Twins. *Ann Neurol*, v. 60 (1), p. 65-72, 2006.

GOLDWURM S, ZINI M, DI FONZO A, et al. LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: a clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Italian sample. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 12, p. 410-419, 2006.

GONERA EG, VAN'T HOF M, BERGER HJC, et al. Symptoms and duration of the prodromal phase in Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 12, p. 871-876, 1997.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ MC, LEZCANO E, ROSS AO, et al. Lrrk2-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 13(8), p. 509-515, 2007.

GOPALAI AA, LI HH, LIM SY, et al. Analysis of N551K and R1398H LRRK2 variants in an Asian cohort [abstract]. *Mov Disord*, v. S1, p. 1111, 2013.

GOROSTIDI A, RUIZ-MARTÍNEZ J, LOPEZ DE MUNAIN A, et al. LRRK2 G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics*, v. 10(2), p. 157-159, 2009.

GOSAL D, ROSS AO, WILEY J, et al. Clinical traits of LRRK2-associated Parkinson's disease in Ireland: a link between familial and idiopathic PD. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 11(6), p.349-352, 2005.

GREGGIO E, JAIN S, KINGSBURY A, et al. Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis*, v. 23, p. 329-341, 2006.

GRIMES DA, RACACHO L, HAN F, et al. LRRK2 screening in a Canadian Parkinson's disease cohort. *Can J Neurol Sci*, v. 34(3), p. 336-338, 2007.

GUELLA I, SOLDA G, CILIA R, et al. The Asp620asn mutation in VPS35 is not a common cause of familial Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 27, p. 800-801, 2012.

GUIMARÃES BC. *Análise das mutações p.G2019S e p.T1410M na proteína dardarina como causa da Doença de Parkinson em pacientes brasileiros*. 2009. 83f. Monografia – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

GUO JF, SUN QY, LV ZY, et al. VPS35 gene variants are not associated with Parkinson's disease in the mainland Chinese population. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 18, p. 983-985, 2012.

HAEHNER A, BOESVELDT S, BERENDSE HW, et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease. A multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15, p. 490-494, 2009.

HALL TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, v. 41, p.95-98, 1999.

HALLIDAY G, LEES A, STERN M. Milestones in Parkinson's disease – Clinical and Pathologic features. *Mov Disord*, v. 26, p.1015-1021, 2011.

HALLIDAY GM & MCCANN H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci*, v. 1184, p.188-195, 2010.

HANCOCK DB, MARTIN ER, MAYHEW GM, et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*, v. 8, p. 6, 2008.

HARDY J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron*, v. 68(2), p. 201-206, 2010.

HAUBENBERGER D, BONELLI S, HOTZY C, et al. A novel LRRK2 mutation in an Austrian cohort of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 22(11), p. 1640-1643, 2007.

- HAUGARVOLL K, WSZOLEK ZK. Clinical features of LRRK2 parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15 (S3), p. S205-S208, 2009.
- HEALY DG, FALCHI M, O'SULLIVAN SS, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, v. 7(7), p.583-590, 2008.
- HECKMAN MG, SOTO-ORTOLAZA AI, AASLY JO, et al. Population specific frequencies for *LRRK2* susceptibility variants in the genetic epidemiology of parkinson's disease (GEO-PD) consortium. *Mov Disord*, v. 28(12), p. 1740-1744, 2013.
- HEDRICH K, WINKLER S, HAGENAH J, et al. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 21(9), p. 1506-1510, 2006.
- HELY, MA, REID WG, ADENA MA, et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord*, v. 23, p. 837-844, 2008.
- HERNÁN MA, TAKKOUCHE B, CAAMAÑO-ISORNA F, et al. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 52, p. 276-284, 2002.
- HERNANDEZ D, PAISAN RUIZ C, CRAWLEY A, et al. The dardarin G2019S mutation is a common cause of Parkinson's disease but not other neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*, v. 389, p. 137-139, 2005.
- HUANG Y, HALLIDAY GM, VANDEBONA H, et al. Prevalence and clinical features of common LRRK2 mutations in Australians with Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 22(7), p. 982-989, 2007.
- HULIHAN MM, ISHIHARA-PAUL L, KACHERGUS J, et al. LRRK2 Gly2019Ser penetrance in Arabe Berber patients from Tunisia: a case control genetic study. *Lancet Neurol*, v. 7(7), p. 591-594, 2008.
- HUTTENLOCKER J, KRÜGER R, CAPETIAN P, et al. EIF4G1 is neither a strong nor a common risk factor for Parkinson's disease: evidence from large European cohorts. *J Med Genet*, v. 0, p. 1-5, 2014.
- ILLARIOSHKIN SN, SHADRINA MI, SLOMINSKY PA, et al. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *Eur J Neurol*, v. 14(4), p. 413-417, 2007.
- INFANTE J, RODRIGUEZ E, COMBARROS O, et al. LRRK2 G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, v. 395, p. 224-226, 2006.
- IRANZO A, LOMENA F, STOCKNER H, et al. Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperechogenicity as risk markers of

synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study. *Lancet Neurol*, v. 9, p. 1070-1077, 2011.

ISHIHARA L, GIBSON RA, WARREN L, et al. Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families. *Mov Disord*, v. 22(1), p. 55-61, 2007.

ITO G, OKAI T, FUJINO G, et al. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry*, v. 46(5), p. 1380-1388, 2007.

JASINSKA-MYGA B, KACHERGUS J, VILARIÑO-GÜELL C, et al. Comprehensive Sequencing of the LRRK2 Gene in Patients with Familial Parkinson's Disease from North Africa. *Mov Disord*, v. 13, p. 2052-2058, 2010.

JELLINGER KA. Different tau pathology pattern in two clinical phenotypes of progressive supranuclear palsy. *Neurodegener Dis*, v. 5, p.339-346, 2008.

JOHNSON J, PAISÁN-RUIZ C, LOPEZ G, et al. Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for LRRK2 mutation. *Neurodegener Dis*, v. 4(5), p. 386-391, 2007.

JUH R, KIM J, MOON D, et al. Different metabolic patterns analysis of Parkinsonism on the 18F-FDG PET. *Eur J Radiol*, v. 51, p. 223-233, 2004.

KALINDERI K, FIDANI L, BOSTANTJOPOULOU S, et al. The G2019S LRRK2 mutation is uncommon amongst Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 14(10), p.1088-1090, 2007.

KARBE H, HOLTTHOFF V, HUBER M, et al. Positron emission tomography in degenerative disorders of the dopaminergic system. *J Neural Transm*, v. 4, p. 121-130, 1992.

KAY DM, KRAMER P, HIGGINS D, et al. Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the LRRK2 G2019S mutation. *Mov Disord*, v. 20, p. 1077-1078, 2005.

KAY DM, ZABETIAN CP, FACTOR SA, et al. Parkinson's disease and LRRK2: frequency of a common mutation in U.S. movement disorder clinics. *Mov Disord*, v. 21(4), p. 519-523, 2006.

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

KIEBURTZ K, WUNDERLE KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord*, v. 28(1), p. 8-13, 2013.

KITADA T. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, v. 392, p. 605-608, 1998.

- KUMAR KR, WEISSBACH A, HELDMANN M, et al. Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch Neurol*, v. 69, p. 1360-1364, 2012.
- LANGSTON JW, BALLARD P, TETRUD JW, et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, v. 219, p. 979-980, 1983.
- LEES AJ, HARDY J, REVESZ T. Parkinson's disease. *Lancet*, v. 373, p. 2055-2066, 2009.
- LESAGE S, BELARBI S, TROIANO A, et al. Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? *Neurology*, v. 71(19), p. 1550-1552, 2008.
- LESAGE S, BRICE A. Role of Mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 18, p. S66-S70, 2012.
- LESAGE S, CONDROYER C, KLEBE S, et al. *EIF4G1* in familial Parkinson's disease: pathogenic mutations or rare benign variants? *Neurobiol Aging*, v. 33(9), p. 2233.e1-2233.e5, 2012.
- LESAGE S, CONDROYER C, LANNUZEL A, et al. Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet*, v. 46(7), p. 458-464, 2009.
- LESAGE S, DURR A, TAZIR M, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med*, v. 354(4), p. 422-423, 2006.
- LESAGE S, IBANEZ P, LOHMANN E, et al. G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 58(5), p. 784-787, 2005.
- LESAGE S, JANIN S, LOHMANN E, et al. LRRK2 exon 41 mutations in sporadic Parkinson disease in Europeans. *Arch Neurol*, v. 64, p. 425-430, 2007.
- LI K, TANG BS, GUO JF, et al. Analysis of *EIF4G1* in ethnic Chinese. *BMC Neurol*, v. 26, p. 13-38, 2013.
- LIN CH, TZEN KY, YU CY, et al. LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease in a Taiwanese population: clinical, PET, and functional studies. *J Biomed Sci*, v. 15(5), p. 661-667, 2008.
- LITVAN I, AGID Y, CALNE D, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology*, v. 47, p. 1-9, 1996.
- LORENZO-BETANCOR O, SAMARANCH L, EZQUERRA M, et al. *LRRK2* haplotype-sharing analysis in parkinson's disease reveals a novel p.S1761R mutation. *Mov Disord*, v. 27(1), p.146-151, 2012.

- LOUIS ED, BENNETT DA. Mild parkinsonism signs: an overview of an emerging concept. *Mov Disord*, v. 22, p. 1681-1688, 2007.
- LU CS, SIMONS EJ, WU-CHOU YH, et al. The LRRK2 I2012T, G2019S and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 11, p. 521-522, 2005.
- LU YW, TAN EK. Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, v. 86, p.1895-1901, 2008.
- LUCKING CB, DURR A, BONIFATI V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, v. 342, p. 1560-1567, 2000.
- MACEDO MG, VERBAAN D, FANG Y, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 24(2), p. 196-203, 2009.
- MACKENZIE IRA. The pathology of Parkinson's disease. *BCM J*, v. 43, p. 142-147, 2001.
- MACLEOD D, DOWMAN J, HAMMOND R, et al. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, v. 52, p. 587-593, 2006.
- MARÍN I, VAN EGMOND WN, VAN HAASSTERT PJM. The Roco protein family: a functional perspective. *FASEB J*, v. 22, p. 3103-3110, 2008.
- MARONGIU R, GUEZZI D, LALONGO T, et al. Frequency and phenotypes of LRRK2 G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 21(8), p. 1232-1235, 2006.
- MATA IF, ALVAREZ V, RIBACOBA R, et al. Novel Lrrk2-pS1761R mutation is not a common cause of parkinson's disease in Spain. *Mov Disord*, v. 28(2), p. 248, 2013.
- MATA IF, COSENTINO C, MARCA V, et al. LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease from Peru and Uruguay. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15(5), p. 370-373, 2009.
- MATA IF, KACHERGUS JM, TAYLOR JP, et al. Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics*, v. 6(4), p. 171-177, 2005.
- MATA IF, ROSS OA, KACHERGUS J, et al. LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol*, v. 13, p. 391-394, 2006.
- MATA IF, WILHOITE GJ, YEAROUT D, et al. Lrrk2 p.Q1111H substitution and Parkinson's disease in Latin America. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 17, p. 629-631, 2011.
- MATTA S, VAN KOLEN K, DA CUNHA R, et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron*, v. 75, p. 1008-1021, 2012.

MCGOUGH IJ, CULLEN PJ. Recent advances in retromer biology. *Traffic*, v. 12, p. 963-971, 2011.

MELLICK GD, SIEBERT GA, FUNAYAMA M, et al. Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15 (2), p.105-109, 2009.

MÖLLER JC, RISSLING I, MYLIUS V, et al. The prevalence of the G2019S and R1441C/G/H mutations in LRRK2 in German patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 15(7), p. 743-745, 2008.

MULLER A, REICHMANN H, LIVERMORE A, et al. Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *J Neural Trans*, v. 109, p. 805-811, 2002.

MUNHOZ RP, WAKUTANI Y, MARRAS C, et al. The G2019S LRRK2 mutation in Brazilian patients with Parkinson's disease: phenotype in monozygotic twins. *Mov Disord*, v. 23(2), p. 290-294, 2008.

NICHOLS WC, ELSAESSER VE, PANKRATZ N, et al. LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8. *Neurology*, v. 69(18), p. 1737-1744, 2007.

NICHOLS WC, PANKRATZ N, HERNANDEZ D, et al. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*, v. 365, p. 410-412, 2005.

NISHIOKA K, FUNAYAMA M, VILARIÑO-GÜELL, et al. EIF4G1 gene mutations are not a common cause of Parkinson's disease in the Japanese population. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 20(6), p. 659-661, 2014.

NUYTEMANS K, BADEMCI G, INCHAUSTI V, et al. Whole exome sequencing of rare variants in *EIF4G1* and *VPS35* in Parkinson disease. *Neurology*, v. 80, p. 982-989, 2013.

NUYTEMANS K, MEEUS B, CROSIERS D, et al. Relative Contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat*, v. 30 (7), p. 1054-1061, 2009.

NUYTEMANS K, RADEMAKERS R, THEUNS J, et al. Founder mutation p.R1441C in the Leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. *Eur J Hum Genet*, v. 16(4), p. 471-479, 2008.

OKUBADEJO N, BRITTON A, CREWS C, et al. Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3. *PLoS One*, v. 3(10), p. 3421, 2008.

ORR-URTREGER A, SHIFRIN C, ROZOVSKI U, et al. The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology*, v. 69, p. 1595-1602, 2007.

OZELIUS LJ, SENTHIL G, SAUNDERS-PULLMAN R, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi jews. *N Engl J Med*, v. 354(4), p. 424-425, 2006.

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Sci USA*, v. 100, p. 177-182, 2003.

PAISÁN-RUÍZ C, EVANS EW, JAIN S, et al. Testing association between LRRK2 and Parkinson's disease and investigating linkage disequilibrium. *J Med Genet*, v. 43, p. e9, 2006.

PAISÁN-RUÍZ C, JAIN S, EVANS EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, v. 44, p. 595-600, 2004.

PAISÁN-RUÍZ C, LANG AE, KAWARAI T, et al. LRRK2 gene in Parkinson disease. Mutation analysis and case control association study. *Neurology*, v. 65, p. 696-700, 2005.

PAISÁN-RUÍZ C, NATH P, WASHECKA N, et al. Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neuro-logically normal controls. *Hum Mutat*, v. 29(4), p. 485-490, 2008.

PAISÁN-RUÍZ C, EVANS EW, JAIN S. et al. Testing association between LRRK2 and Parkinson's disease and investigating linkage disequilibrium. *J Med Genetic*, v. 43(2), p. e9, 2006.

PAPAPETROPOULOS S, ADI N, SHEHADEH L, et al. Is the G2019S LRRK2 mutation common in all southern European populations? *J Clin Neurosci*, v. 15(9), p.1027-1030, 2008.

PANKRATZ N, MARDER K, HALTER C, et al. Clinical correlates of depressive symptoms in familial Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 23(15), p. 2216-2223, 2008.

PCHELINA SN, YAKIMOVSKII AF, EMELYANOV AK, et al. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. *Eur J Neurol*, v. 15(7), p. 692-696, 2008.

PEREZ-PASTENE C, COBB SA, DÍAZ-GREZ F, et al. Lrrk2 mutations in South America: a study of Chilean Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, v. 422(3), p. 193-197, 2007.

PENA SD, DI PIETRO G, FUCHSHUBER-MORAES M, et al. The genomic ancestry of individuals from diferente geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*, v. 6, p. e17063, 2011.

PIMENTEL MM, MOURA KC, ABDALLA CB, et al. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett*, v. 433(1), p. 17-21, 2008.

PINKHARDT EH, JURGENS R, BECKER W, et al. Differential diagnostic value of eye movement recording in PSP-parkinsonism, Richardson's syndrome, and idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol*, v. 255, p. 1916-1925, 2008.

PLAZZI G, CORTELLI P, MONTAGNA P, et al. REM sleep behaviour disorder differentiates pure autonomic failure from multiple system atrophy with autonomic failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 64, p. 683-685, 1998.

POEWE W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 1, p. 14-20, 2008.

POLYMEROPOULOS MH, LAVEDAN C, LEROY E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, v. 276, p. 2045-2047, 1997.

POSTUMA RB, GAGNON JF, VENDETTE M, et al. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*, v. 72, p. 1296-1300, 2009.

POSTUMA RB, MONTPLAISIR J. Predicting Parkinson's disease- Why, When, and How? *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15(S3), p.S105-S109, 2009.

PUNIA S, BEHARI M, GOVINDAPPA ST, et al. Absence/ rarity of commonly reported LRRK2 mutations in Indian Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, v. 409, p. 83-88, 2006.

ROSS GW, PETROVITCH H, ABBOTT RD, et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 63, p. 167-173, 2008.

ROSS OA, SOTO-ORTOLAZA AI, HECKMAN MG, et al. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, v. 10, p. 898-908, 2011.

ROSS OA, WILHOITE GJ, BACON JA. LRRK2. Variation and Parkinson's disease in African Americans. *Mov Disord*, v. 25(12), p. 1973-1992, 2010.

SAUNDERS-PULLMAN R, STANLEY K, SAN LUCIANO M, et al. Gender differences in the risk of familial parkinsonism: beyond LRRK2? *Neurosci Lett*, v. 496, p. 125-128, 2011.

SAVICA R, ROCCA WA, AHLSSKOG JE. When does Parkinson disease start? *Arch Neurol*, v. 67, p.798-801, 2010.

SCHAPIRA AH. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 76, p.1472-1478, 2005.

SCHLITTER AM, WOITALLA D, MUELLER T, et al. The LRRK2 gene in Parkinson's disease: mutation screening in patients from Germany. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 77(7), p. 891-892, 2006.

SCHOLZ S, MANDEL RJ, FERNANDEZ HH, et al. LRRK2 mutations in a clinic-based cohort of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 13(12), p. 1298-1301, 2006.

SCHULTE EC, MOLLENHAUER B, ZIMPRICH A, et al. Variants in eukaryotic translation initiation factor 4G1 in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics*, v. 13, p. 281-285, 2012.

SEAMAN MN. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol*, v. 15, p. 68-75, 2005.

SHARMA M, IOANNIDIS JP, AASLY JO, et al. A multi-centre clinicogenetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease associated variants. *J Med Genet*, v. 49, p. 721-726, 2012.

SHEERIN UM, CHARLESWORTH G, BRAS J, et al. Screening for VPS35 mutations in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, v. 33, p. 831-838, 2012.

SHIBA M, BOWER JH, MARAGANORE DM, et al. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord*, v. 15, p. 669-677, 2000.

SIDEROWF A, LANG AE. Premotor Parkinson's Disease: Concepts and Definitions. *Mov Disord*, v. 27, p. 608-616, 2012.

SIITONEN A, MAJOUNIE E, FEDEROFF M, et al. Mutations in *EIF4G1* are not a common cause of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, v. 20, p. e59, 2013.

SIMÓN-SÁNCHEZ J, SCHULTE C, BRAS JM, et al. Genome wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, v. 41: p. 1308-1312, 2009.

SQUILLARO T, CAMBI F, CIACCI G, et al. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in Italian patients affected by Parkinson's disease. *J Hum Genet*, v. 52, p. 201-204, 2007.

SUDHAMAN S, BEHARI M, GOVINDAPPA ST, et al. *VPS35* and *EIF4G1* mutations are rare in Parkinson's disease among Indians. *Neurobiol Aging*, v. 34, p. 2442.e1-2442.e3, 2013.

SUTHERLAND GT, HALLIDAY GM, SILBURN PA, et al. Do polymorphisms in the familial Parkinsonism genes contribute to risk for sporadic Parkinson's disease? *Mov Disord*, v. 24(6), p.833-838, 2009.

TAN EK, LIM HQ, YUEN Y, et al. Pathogenicity of LRRK2 P755L variant in Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 23, p. 734-736, 2008;.

TAN EK, PENG R, TEO YY, et al. Multiple LRRK2 variants modulate risk of Parkinson disease: a Chinese multicenter study. *Hum Mutat*, v. 31(5), p. 561-568, 2010.

TAN EK, SHEN H, TAN LC, et al. The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, v. 384(3), p.327-329, 2005.

TAN EK, SKIPPER LM. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum Mutat*, v. 28, p.641-653, 2007.

- TANNER CM, OTTMAN R, GOLDMAN SM, et al. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA*, v. 281, p.341-346, 1999.
- TANNER CM, ROSS GW, JEWEL SA, et al. Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol*, v. 66(9), p. 1106-1113, 2009.
- TEUNE LK, BARTELS AL, DE JONG BM, et al. Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases. *Mov Disord*, v. 25, p. 2395-2404, 2010.
- THACKER EL, CHEN H, PATEL AV, et al. Recreation physical activity and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 23(1), p. 69-74, 2008.
- THERMO FISHER. Applied Biosystem 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Genotyping Experiments, v. 1, p. 8, 2010.
- TRINH J, AMOURI R, DUDA J, et al. A comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p.G2019S parkinsonism. *Neurobiol Aging*, v. 35(5), p. 1125-1131, 2014.
- TSIKA E, MOORE DJ. Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*, v. 12, p. 251-260, 2012.
- TSUI A, ISACSON O. Functions of the nigrostriatal dopaminergic synapse and the use of neurotransplantation in Parkinson's disease. *J Neurol*, v. 258(8), p. 1393-1405, 2011.
- TSUJI S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum Mol Genet*, v. 19(R1), p. R65-R70, 2010.
- VALENTE EM, ABOU-SLEIMAN PM, CAPUTO V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, v. 304, p. 1158-1160, 2004.
- VERSTRAETEN A, WAUTERS E, CROSIERS D, et al. Contribution of VPS35 genetic variability to LBD in the Flanders-Belgian population. *Neurobiol Aging*, v. 33, p.1811-1844, 2012.
- VILARIÑO-GÜELL C, WIDER C, ROSS OA, et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, v. 89, p. 162-167, 2011.
- WILLIAMS DR, HOLTON JL, STRAND C, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*, v. 130(6), p. 1566-1576, 2007.
- WILLIAMS-GRAY CH, GORIS A, FOLTYNE T, et al. Prevalence of the LRRK2 G2019S mutation in a UK community based idiopathic Parkinson's disease cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 77, p. 665-667, 2006.
- WIRDEFELDT K, GATZ M, REYNOLDS CA, et al. Heritability of Parkinson disease in Swedish twins: a longitudinal study. *Neurobiol Aging*, v. 32, p. 1923.e1–1923.e8, 2011.

- WOOTEN GF, CURRIE LJ, BOVBJERG VE, et al. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 75, p. 637-639, 2004.
- WU-CHOU YH, CHEN YT, YEH TH, et al. Genetic variants of SNCA and LRRK2 genes are associated with sporadic PD susceptibility: a replication study in a Taiwanese cohort. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 19(2), p. 251-255, 2013.
- WU YR, CHANG KH, CHANG WT, et al. Genetic Variants of LRRK2 in Taiwanese Parkinson's disease. *PLoS One*, v. 8(12), p. e82001, 2013.
- XIROMERISIOU G, HADJIGEORGIOU GM, GOURBALI V, et al. Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants. *Eur J Neurol*, v. 14(1), p. 7-11, 2007.
- YUAN L, SONG Z, XU H, et al. EIF4G1 Ala502Val and Arg1205His variants in Chinese patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, v. 543, p. 69-71, 2013.
- ZABETIAN CP, MORINO H, UJIKE H, et al. Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. *Neurology*, v. 67(4), p. 697-699, 2006.
- ZABETIAN CP, SAMII A, MOSLEY AD, et al. A clinic based study of the LRRK2 gene in Parkinson's disease yields new mutations. *Neurology*, v. 65, p. 741-744, 2005.
- ZHANG P, YU L, GAO J, et al. Cloning and characterization of human VPS35 and mouse Vps35 and mapping of VPS35 to human chromosome 16q13-q21. *Genomics*, v. 70, p. 253-257, 2000.
- ZHANG Y, CHEN S, XIAO Q, et al. Vacuolar protein sorting 35 Asp620Asn mutation is rare in the ethnic Chinese population with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 18, p. 638-640, 2012.
- ZHAO Y, HO P, PRAKASH KM, et al. Analysis of EIF4G1 in Parkinson's disease among Asians. *Neurobiol Aging*, v. 34, p. 1311.e5-1311.e6, 2013.
- ZIMPRICH A, BENET-PAGES A, STRUHAL W, et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, v. 89, p.168-175, 2011.
- ZIMPRICH A, BISKUP S, LEITNER P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, v. 44, p. 601- 607, 2004.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continua)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
1	1142	64	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	1143	68	63	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	1144	69	65	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	1145	74	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	1146	79	73	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	1147	47	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
7	1148	48	42	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
8	1149	65	64	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
9	1153	54	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
10	1154	70	66	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
11	1155	55	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
12	1156	56	52	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
13	1157	76	65	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
14	1158	64	60	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
15	1159	71	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
16	1160	68	58	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17	1161	59	49	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
18	1162	64	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
19	1163	83	65	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
20	1164	64	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
21	1168	66	62	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
22	1169	74	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
23	1170	57	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
24	1171	65	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
25	1172	74	61	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
26	1173	62	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
27	1174	55	54	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
28	1175	75	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
29	1176	57	49	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
30	1177	77	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
31	1182	39	26	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
32	1183	58	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
33	1184	69	66	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
34	1185	62	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
35	1186	57	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
36	1190	55	54	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
37	1191	72	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
38	1192	69	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
39	1193	72	68	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
40	1194	72	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
41	1195	79	60	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
42	1196	47	40	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
43	1203	74	73	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
44	1208	63	52	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
45	1209	55	51	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
46	1211	58	57	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
47	1218	55	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
48	1219	74	64	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
49	1221	55	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
50	1223	78	74	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
51	1224	65	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
52	1229	56	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
53	1230	71	65	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
54	1231	66	56	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
55	1232	54	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
56	1247	48	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
57	1248	70	58	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
58	1263	67	66	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
59	1270	73	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
60	1280	67	59	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
61	1287	56	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
62	1288	66	59	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
63	1292	66	54	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
64	1293	53	48	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
65	1294	61	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
66	1296	58	42	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
67	1297	57	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
68	1304	65	63	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
69	1305	38	36	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
70	1306	65	55	M	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
71	1307	54	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
72	1308	56	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
73	1314	72	69	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
74	1315	63	58	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
75	1320	54	51	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
76	1321	50	40	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
77	1322	54	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
78	1323	54	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
79	1324	64	63	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
80	1325	67	64	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
81	1329	71	64	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
82	1330	33	31	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
83	1335	61	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
84	1344	56	52	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
85	1345	33	14	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
86	1355	64	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
87	1358	76	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
88	1359	59	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
89	1366	71	58	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
90	1375	64	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
91	1376	78	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
92	1377	48	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
93	1386	49	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
94	1394	43	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
95	1397	53	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
96	1398	67	53	F	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
97	1399	42	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
98	1401	43	37	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
99	1402	71	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
100	1404	62	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
101	1405	38	35	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
102	1407	58	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
103	1408	66	60	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
104	1409	47	33	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
105	1410	82	72	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
106	1420	72	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
107	1426	68	67	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
108	1427	63	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
109	1428	71	70	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
110	1435	79	78	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
111	1436	41	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
112	1437	71	62	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
113	1438	42	37	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
114	1440	69	59	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
115	1441	62	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
116	1442	43	38	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
117	1443	61	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
118	1444	69	53	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
119	1445	70	66	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
120	1447	57	52	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
121	1448	58	52	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
122	1449	74	70	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
123	1450	34	26	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
124	1451	68	55	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
125	1452	64	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
126	1453	48	36	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
127	1454	61	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
128	1455	57	47	M	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
129	1456	70	46	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
130	1457	80	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
131	1458	59	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
132	1459	46	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
133	1460	60	42	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
134	1461	71	59	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
135	1462	59	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
136	1463	53	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
137	1464	74	67	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
138	1493	74	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
139	1494	64	63	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
140	1495	61	52	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
141	1499	77	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
142	1503	76	72	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
143	1504	70	60	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
144	1510	73	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
145	1511	71	65	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
146	1512	54	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
147	1602	61	59	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
148	1625	78	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
149	1635	60	60	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
150	1636	47	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
151	1637	60	56	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
152	1645	80	64	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
153	1646	47	45	M	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
154	1647	71	68	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
155	1648	61	56	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
156	1649	57	49	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
157	1650	53	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
158	1660	67	57	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
159	1661	49	27	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
160	1662	54	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
161	1666	87	78	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
162	1667	38	35	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
163	1695	61	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
164	1696	68	58	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
165	1697	62	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
166	1699	88	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
167	1701	66	53	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
168	1702	67	54	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
169	1703	35	25	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
170	1704	56	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
171	1705	38	34	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
172	1722	67	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
173	1728	70	55	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
174	1729	73	60	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
175	1730	61	55	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
176	1732	87	83	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
177	1738	71	69	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
178	1747	58	54	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
179	1760	67	62	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
180	1765	61	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
181	1799	80	69	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
182	1801	90	89	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
183	1805	50	22	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
184	1807	60	56	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
185	1814	71	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
186	1963	43	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
187	1964	40	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
188	1965	44	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
189	1966	39	36	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
190	1967	48	37	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
191	1968	41	38	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
192	1969	40	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
193	1989	70	64	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
194	1997	55	48	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
195	1998	61	53	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
196	1999	78	68	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
197	2011	46	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
198	2037	58	58	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
199	2038	57	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
200	2039	70	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
201	2041	74	64	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
202	2042	79	76	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
203	2043	71	69	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
204	2044	70	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
205	2045	70	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
206	2046	96	33	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
207	2056	59	39	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
208	2057	78	75	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
209	2058	71	63	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
210	2064	62	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
211	2065	59	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
212	2066	78	78	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
213	2067	70	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
214	2068	56	28	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
215	2069	63	57	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
216	2079	71	66	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
217	2080	63	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
218	2081	59	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
219	2083	59	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
220	2084	69	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
221	2085	48	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
222	2086	78	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
223	2087	70	54	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
224	2088	63	61	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
225	2089	84	77	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
226	2096	73	61	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
227	2098	58	49	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
228	2099	21	12	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
229	2100	58	56	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
230	2101	44	33	F	-	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
231	2108	78	75	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
232	2116	58	56	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
233	2117	73	65	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
234	2118	58	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
235	2119	58	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
236	2120	57	53	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
237	2126	80	73	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
238	2127	57	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
239	2128	81	79	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
240	2133	50	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
241	2143	58	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
242	2145	50	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
243	2172	42	29	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
244	2173	67	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
245	2219	81	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
246	2255	78	73	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
247	2256	45	37	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
248	2257	42	38	F	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
249	2258	70	61	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
250	2259	42	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
251	2264	70	66	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
252	2265	81	78	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
253	2266	43	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
254	2267	49	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
255	2268	52	43	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
256	2269	70	63	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
257	2270	70	69	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
258	2271	68	62	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
259	2278	67	66	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
260	2279	62	54	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
261	2285	49	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
262	2286	79	76	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
263	2291	85	81	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
264	2299	84	77	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
265	2300	56	42	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
266	2301	73	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
267	2302	36	34	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
268	2303	34	29	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
269	2304	45	32	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
270	2318	76	65	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
271	2319	68	66	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
272	2320	85	80	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
273	2326	71	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
274	2327	55	53	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
275	2335	78	76	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
276	2343	64	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
277	2344	76	61	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
278	2345	41	38	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
279	2352	41	20	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
280	2353	69	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
281	2354	67	63	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
282	2355	54	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
283	2356	66	58	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
284	2357	51	46	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
285	2358	64	49	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
286	2359	69	67	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
287	2360	74	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
288	2362	50	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
289	2363	63	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
290	2364	74	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
291	2365	67	59	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
292	2366	72	72	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
293	2367	49	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
294	2368	51	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
295	2369	34	31	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
296	2370	63	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
297	2371	62	49	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
298	2373	63	55	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
299	2374	52	40	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
300	2375	38	34	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
301	2376	40	37	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
302	2377	52	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
303	2378	61	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
304	2379	53	51	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
305	2380	52	37	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
306	2381	46	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
307	2382	63	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
308	2383	83	75	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
309	2384	46	38	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
310	2385	55	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
311	2386	46	43	M	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
312	2387	56	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
313	2388	55	48	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
314	2389	47	37	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
315	2390	59	54	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
316	2391	24	24	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
317	2392	63	62	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
318	2393	71	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
319	2394	68	62	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
320	2395	50	39	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
321	2396	69	46	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
322	2397	57	50	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
323	2401	74	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
324	2402	81	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
325	2405	69	67	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
326	2446	70	57	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
327	2703	49	48	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
328	2734	53	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
329	2735	60	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
330	2736	45	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
331	2737	60	60	F	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
332	2738	63	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
333	2739	53	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
334	2740	56	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
335	2741	78	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
336	2742	65	63	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
337	2743	48	-	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
338	2744	49	47	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
339	2745	71	55	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
340	2746	53	-	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
341	2747	87	76	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
342	2748	45	-	M	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
343	2749	57	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
344	2750	66	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
345	2751	59	53	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
346	2752	67	65	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
347	2753	67	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
348	2754	67	-	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
349	2861	47	32	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
350	2862	47	32	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
351	2888	54	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
352	2893	76	73	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
353	2941	62	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
354	2997	82	79	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
355	2998	61	-	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
356	2999	54	-	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
357	3000	72	-	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
358	3001	85	73	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
359	3002	42	41	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
360	3003	62	61	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
361	3004	58	10	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
362	3005	80	-	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
363	3006	64	60	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
364	3007	43	39	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
365	3008	66	59	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
366	3009	68	64	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
367	3010	49	41	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
368	3011	72	58	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
369	3012	76	68	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
370	3013	57	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
371	3014	50	42	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
372	3015	47	40	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
373	3016	68	65	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
374	3147	59	33	F	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
375	3170	47	30	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
376	3171	51	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
377	3172	53	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
378	3173	50	40	F	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
379	3174	57	47	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
380	3175	77	75	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
381	3176	56	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
382	3177	51	49	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
383	3178	48	41	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
384	3179	49	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
385	3180	51	44	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
386	3181	46	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
387	3182	55	41	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
388	3183	47	41	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
389	3184	52	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
390	3187	76	74	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
391	3188	56	38	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
392	3189	-	-	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
393	3191	55	49	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
394	3192	58	48	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
395	3193	36	32	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
396	3194	54	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
397	3204	65	54	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
398	3213	50	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
399	3214	53	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
400	3215	54	46	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
401	3216	41	37	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
402	3222	56	56	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
403	3265	46	43	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
404	3266	56	50	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
405	3279	53	40	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
406	3280	36	35	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
407	3281	64	62	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
408	3282	52	48	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
409	3283	54	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
410	3284	55	53	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
411	3285	66	65	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
412	3286	59	58	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
413	3287	62	60	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
414	3288	65	64	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
415	3289	63	59	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
416	3290	60	45	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
417	3291	74	71	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
418	3292	64	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
419	3293	66	65	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
420	3294	54	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
421	3295	77	77	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
422	3296	50	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
423	3297	64	54	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
424	3298	66	64	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
425	3299	42	38	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
426	3300	53	43	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
427	3301	52	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
428	3303	54	40	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
429	3304	59	47	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
430	3305	65	62	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
431	3306	69	65	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
432	3324	64	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
433	3325	48	46	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
434	3326	66	59	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
435	3327	45	44	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
436	3328	17	16	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
437	3329	48	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
438	3380	59	35	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
439	3381	64	18	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
440	3422	57	52	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
441	3423	47	37	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
442	3424	45	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
443	3425	54	44	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
444	3426	55	49	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
445	3686	72	70	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
446	3833	62	51	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
447	3834	73	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
448	3835	93	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
449	3836	80	-	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
450	3837	91	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
451	3838	73	51	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
452	3839	67	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
453	3840	71	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
454	3841	71	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
455	3842	63	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
456	3843	60	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
457	3844	57	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
458	3845	51	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
459	3846	80	51	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
460	3848	68	-	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
461	3849	69	51	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
462	3850	62	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
463	3851	60	51	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
464	3852	59	51	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
465	3853	65	51	M	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
466	3855	46	43	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
467	3856	47	18	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
468	3932	16	9	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
469	3939	80	72	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
470	3940	44	42	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
471	3955	63	53	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
472	3956	48	37	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
473	3963	76	70	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
474	3965	49	44	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
475	3966	47	39	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
476	3968	75	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
477	3973	78	65	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
478	3977	91	85	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
479	3978	75	46	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
480	3986	88	81	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
481	3996	80	75	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
482	3999	74	67	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
483	4003	61	57	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
484	4009	59	12	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
485	4022	71	62	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
486	4025	81	75	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
487	4035	68	58	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
488	4036	48	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
489	4037	32	29	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
490	4038	70	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
491	4039	69	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
492	4040	78	74	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
493	4041	50	46	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
494	4042	49	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
495	4043	32	23	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
496	4045	59	55	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
497	4046	59	57	F	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
498	4047	76	76	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
499	4048	63	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
500	4049	52	51	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
501	4050	54	52	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
502	4051	52	25	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
503	4061	56	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
504	4062	63	-	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
505	4063	60	58	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
506	4064	51	51	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
507	4065	67	66	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
508	4066	57	55	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
509	4067	67	62	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
510	4068	52	43	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
511	4069	58	57	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
512	4070	65	59	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
513	4071	53	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
514	4072	56	50	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
515	4073	62	60	F	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
516	4074	61	58	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
517	4075	57	52	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
518	4076	52	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
519	4077	43	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
520	4078	53	-	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (continuação)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
521	4079	64	60	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
522	4080	59	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
523	4081	54	38	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
524	4082	69	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
525	4088	35	31	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
526	4091	56	54	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
527	4097	72	64	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
528	4098	58	52	F	-	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
529	4099	54	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
530	4100	52	30	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
531	4106	70	65	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
532	4107	49	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
533	4108	52	45	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
534	4109	60	56	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
535	4110	45	42	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
536	4117	51	47	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
537	4123	78	75	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
538	4124	66	64	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
539	4125	54	43	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
540	4126	66	57	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
541	4127	66	47	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
542	4128	77	75	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
543	4129	53	.	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
544	4130	58	40	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
545	4131	69	53	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
546	4132	80	65	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
547	4133	84	74	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
548	4134	62	57	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
549	4135	64	45	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
550	4136	37	.	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
551	4137	75	51	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
552	4138	57	54	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
553	4139	56	51	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
554	4140	62	57	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
555	4141	50	45	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
556	4142	53	47	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
557	4143	73	68	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
558	4144	42	41	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
559	4145	69	68	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
560	4152	74	70	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

APÊNDICE - Pacientes analisados para as mutações nos genes *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1* (conclusão)

Nº	NR	Idade	IM	Sexo	F/I	<i>LRRK2</i> G2019S	<i>VPS35</i> D620N	<i>VPS35</i> R524W	<i>EIF4G1</i> A502V	<i>EIF4G1</i> R1205H
561	4153	77	67	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
562	4160	64	55	M	F	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
563	4161	54	42	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
564	4162	60	55	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
565	4163	50	44	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
566	4164	49	40	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
567	4165	72	-	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
568	4166	54	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
569	4167	71	58	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
570	4175	66	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
571	4176	72	60	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
572	4177	82	70	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
573	4178	68	59	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
574	4179	54	36	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
575	4180	57	48	F	I	G2019S	Normal	Normal	Normal	Normal
576	4189	55	-	F	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
577	4190	55	50	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
578	4191	53	-	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
579	4206	32	31	M	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
580	4207	25	21	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
581	4208	56	50	M	I	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
582	4216	48	-	F	F	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
583	1797	80	72	F	F	Normal	NT	NT	NT	NT
584	2015	63	60	F	F	Normal	NT	NT	NT	NT

NR: Número de registro; IM: Idade de Manifestação; F: Histórico familiar da DP e I: Sem história familiar da DP; NT: Não testado; -: Sem informação; Pacientes do sudeste estão destacados em cinza.

ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com DP
(Continua)



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

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do Projeto: Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisador responsável: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

NOME DO PACIENTE: _____ **DN:** _____

REGISTRO: _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira", 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 quatro 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 5 mL 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

ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com DP
(Conclusão)

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 501F -
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 - 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 responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3018, bloco E, 3º andar, - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ.
E-mail: etica@uerj.br - Telefone: (021) 2334-2180

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido da amostra controle
(Continua)



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

TERMO DE CONSENTIMENTO DA AMOSTRA CONTROLE

Título do Projeto: Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisador responsável: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

NOME DO PARTICIPANTE: _____ **DN:** _____

REGISTRO: _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira", 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 genéticas 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 quatro 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 5 mL 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.

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido da amostra controle (Conclusão)

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 paciente

Assinatura do pesquisador

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 501F -
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013
Tel: (021) 2334.0039 - 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 responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3018, bloco E, 3º andar, - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ.
E-mail: etica@uerj.br - Telefone: (021) 2334-2180

ANEXO C - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ



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 - email: etica@uerj.br - Telefone: (21) 2334-2180

PARECER COEP SOBRE ADENDO AO PROJETO

Documento nº. 026/2013
Protocolo de pesquisa nº 032.2.2008

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: Estudos recentes, nos últimos três anos, relatam novas variantes genéticas nos genes já descritos, bem como mutações em dois outros genes, *VPS35* e *EIF4G1* (Vilariño-Guell *et al.*, 2011; Zimprich *et al.*, 2011; Chartier-Harlin *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012; Lesage *et al.*, 2012; Sheerin *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013) em pacientes com doença de Parkinson, gerando grande interesse sobre o papel desses fatores genéticos na etiologia da doença, em paralelo aos genes já em investigação. A partir da experiência acumulada por nosso grupo nesta área do conhecimento (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2012) e as recentes descobertas, foi julgado pertinente, em continuidade a essa linha de pesquisa, incorporar as novas variantes genéticas identificadas aos nossos estudos, reconhecendo que a análise genética população-dirigida é de fundamental importância para melhorar a predição de risco da doença e, na prática, o perfil genético do paciente pode contribuir sobremaneira na caracterização dos subtipos da doença e em seu prognóstico, bem como, na estratificação de risco dos pacientes com história familiar de DP.

Objetivos : Diante da identificação destes novos fatores de risco para a DP do interesse nesta importante linha de pesquisa voltada para a elucidação de fatores genéticos associados à DP em nossa população, é proposta uma extensão aos objetivos iniciais do projeto acima, objetivando Incluir em nossa proposta o rastreamento de mutações nos genes *VPS35* e *EIF4G1* nos pacientes com doença de Parkinson, selecionados para o estudo, com a finalidade de verificar se alterações nestes genes estão envolvidas na etiologia da doença e também um ajuste no título do projeto, que passaria a ser: “Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira”.

Considerações finais: O adendo ao projeto foi apresentado, descrevendo de forma satisfatória os resultados da pesquisa, até o momento. Identifica novos fatores de risco para a DP e solicita a extensão aos objetivos iniciais ao projeto e também a modificação no título da pesquisa. **A COEP aprovou as modificações apresentadas.**

Situação do Projeto : APROVADO

Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2013

Profª. Dra. Rosa M. E. Moreira da Costa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa/UERJ
Mat 34509-0