



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

Camilla Pereira da Silva


**Análise fenotípica comparativa em pacientes brasileiros com
doença de Parkinson com e sem mutações nos genes *LRRK2* e
*GBA***

Rio de Janeiro

2017

Camilla Pereira da Silva

Análise fenotípica comparativa em pacientes brasileiros com doença de Parkinson com e sem mutações nos genes *LRRK2* e *GBA*



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

2017

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

S586 Silva, Camilla Pereira da.
Análise fenotípica comparativa em pacientes brasileiros com doença de Parkinson com e sem mutações nos genes LRRK2 e GBA / Camilla Pereira da Silva. – 2017.
95f.

Orientadora: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Coorientadora: Cíntia Barros Santos-Rebouças
Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

1. Parkinson, Doença de – Teses. 2. Mutação (Biologia) – Teses. 3. Heterogeneidade Genética. 4. Serina-Treonina Proteína Quinase-2 com Repetições Ricas em Leucina. I. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. II. Rebouças, Cíntia Barros Santos. 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

Camilla Pereira da Silva

Análise fenotípica comparativa em pacientes brasileiros com doença de Parkinson com e sem mutações nos genes *LRRK2* e *GBA*

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 5 de julho de 2017.

Orientadores:

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

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

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. João Santos Pereira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Mário Campos Junior
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com doença de Parkinson.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar e iluminar meu caminho.

À minha mãe pelo amor, dedicação e paciência em todos os momentos. A você que me incentivou e apoiou, que me ensinou a ser responsável, a agir com honestidade e respeito e a transformar as dificuldades em razão para seguir em frente. Devo a você o que sou hoje e toda vitória que eu venha a conquistar. À toda minha família pelo apoio e carinho.

À professora Márcia Pimentel pela orientação, dedicação, apoio, confiança e pelos valiosos ensinamentos nesses cinco anos de iniciação científica e mestrado. Agradeço por me ensinar a fazer sempre o nosso melhor.

À professora Cíntia Santos-Rebouças pela coorientação e disposição em ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

A toda a equipe do SERVGEN pelos muitos ensinamentos. À Evelyn, Sarah e Carol pela amizade e companhia no congresso, aulas, palestras e no dia-a-dia. À Sarah, Carol, Gabi e Dani pelo carinho e pela incrível ajuda que foi essencial no desenvolvimento desse projeto. À Andressa, Jussara e Luma pela paciência e pelos importantes ensinamentos de coleta, bancada e respeito a cada um dos nossos pacientes. À Débora por todo o apoio e ajuda. Ao Felipe, Bianca, Bia e Gabi pela companhia, pelo agradável convívio, conversas e momentos de descontração.

Ao Dr. João pela dedicação e ajuda com o conhecimento clínico que foi o norte desse trabalho e pela paciência e atenção em ensinar e esclarecer todas as minhas dúvidas. A todos os médicos neurologistas pela seleção e avaliação clínica dos pacientes e contribuições a esse projeto.

À Dani e ao prof Pedro pela atenção, disposição e ajuda com toda a análise estatística desse trabalho.

Ao Mário pela dedicação e auxílio durante a escrita do artigo científico.

À prof Tatiana Simão pela revisão desse trabalho e aos docentes da banca examinadora, por aceitar o convite para avaliação deste trabalho.

Ao meu bando, Aline, Vanusca, Pedro, Carol e Lari pela amizade, apoio e diferentes tipos de carinho em todos os momentos, dentro e fora da UERJ. Obrigada pela alegria nas bagunças e farinhas, que me deram a força pra seguir adiante. Obrigada por estarem sempre presentes e transformarem todos os momentos juntos em momentos especiais. Vou levar nossas histórias para sempre.

Aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa e doaram um pouquinho de si para que se possa aprimorar o conhecimento sobre a doença de Parkinson.

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

Às agências de fomento pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.
Muito obrigada!

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Marcel Proust

RESUMO

SILVA, Camilla Pereira da. *Análise fenotípica comparativa em pacientes brasileiros com doença de Parkinson com e sem mutações nos genes LRRK2 e GBA*. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por uma marcante variabilidade fenotípica. Evidência acumulada aponta que a manifestação dos sinais clínicos da DP pode ser diferentemente modificada por fatores genéticos, como mutações nos genes *LRRK2* e *GBA*. Sendo assim, o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo na DP tem importantes implicações na predição do prognóstico e pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas. O presente estudo teve como objetivo conduzir uma análise comparativa de características motoras e não motoras em portadores e não portadores de mutações nos genes *LRRK2* e *GBA* em uma amostra de pacientes brasileiros com DP. As análises moleculares para identificação das variantes ocorreram através da técnica de sequenciamento dos produtos da reação em cadeia da polimerase. Para a compilação dos dados clínicos e demográficos dos 131 pacientes com DP foi elaborado um formulário, contemplando a presença ou ausência de sintomas motores e não motores, assim como, a resposta ao tratamento com levodopa, a idade de manifestação e a história familiar da doença. A comparação dos dados de 22 probandos com alterações no gene *GBA*, 17 indivíduos com a mutação *LRRK2* G2019S e 96 pacientes com DP idiopática mostrou diferenças significativas entre os grupos em relação à idade de manifestação ($p = 0,004$), história familiar da doença ($p = 0,003$) e à presença de tremor de repouso ($p = 0,03$); complicações motoras, como congelamento da marcha ($p = 0,0498$); e complicações não motoras, como sintomas depressivos ($p = 0,04$), e disautonomia ($p < 0,0001$). As idades de manifestação dos portadores de mutações resultaram em uma média menor que a média das idades dos não portadores, sugerindo que a presença de mutações pode adiantar o início da doença. O tremor de repouso esteve em frequência menor no grupo *GBA*-PD do que nos demais. Já no *LRRK2*-PD, os pacientes mostraram uma menor incidência de congelamento da marcha e disautonomia, quando comparados aos outros grupos. Além disso, verificou-se uma menor proporção de sintomas depressivos em ambos os grupos com mutações em comparação aos probandos com DP idiopática. Esses dados clínicos revelam diferenças na evolução da doença e sugerem a existência de diferentes subtipos genéticos. Nossas observações corroboram a hipótese de que a apresentação clínica da doença pode ser modificada por mutações nesses genes. Similaridades nos fenótipos da DP entre pacientes com genótipos comparáveis podem beneficiar o esclarecimento de perfis clínicos de acordo com características genéticas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. *GBA*. *LRRK2*. Heterogeneidade clínica.

ABSTRACT

SILVA, Camilla Pereira da. *Comparative phenotypic analysis in Brazilian patients with Parkinson's disease with and without LRRK2 and GBA mutations*. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by remarkable phenotypic variability. Accumulated evidence points that the manifestation of PD clinical signs might be differentially modified by genetic factors, as mutations in *LRRK2* and *GBA* genes. In this sense, the clarification of the genotype-phenotype correlations in PD has important implications in predicting prognosis and can contribute to the development of specific therapeutic approaches. The objective of this study was to conduct a comparative analysis of motor and non-motor features in *LRRK2* and *GBA* mutations carriers and non-carriers in a cohort of Brazilian PD patients. Molecular analyzes to identify the variants were performed through the sequencing of polymerase chain reaction products. For compilation of clinical and demographic data of 131 patients with PD, a form was elaborated, contemplating the presence or absence of motor and non-motor symptoms, as well as the response to treatment with levodopa, age at onset and family history of the disease. Comparison of data from 22 probands with *GBA* mutations, 17 individuals with *LRRK2* G2019S and 96 idiopathic PD patients showed significant differences among the three groups regarding the age at onset ($p = 0.004$), family history of the disease ($p = 0.003$) and the presence of rest tremor ($p = 0.03$); motor complications, as gait freezing ($p = 0.0498$), and non-motor complications, as depressive symptoms ($p = 0.04$) and dysautonomia ($p < 0.0001$). Age at onset of mutation carriers resulted in a lower mean than the age of non-carriers, suggesting that the presence of mutations may advance the disease onset. Resting tremor was in lower frequency in *GBA*-PD than in the other groups. In *LRRK2*-PD, patients showed a lower incidence of gait freezing and dysautonomia when compared to *GBA*-PD and IPD. In addition, a lower proportion of depressive symptoms was identified in both mutation groups compared to idiopathic PD probands. These clinical data reveal differences in the disease evolution and suggest the existence of different genetic subtypes. Our observations corroborate the hypothesis that the clinical presentation of the disease can be modified by *LRRK2* and *GBA* mutations. Similarities in PD phenotypes among patients with comparable genotypes may benefit the elucidation of clinical profiles according to genetic characteristics.

Keywords: Parkinson's disease. *GBA*. *LRRK2*. Clinical heterogeneity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Sintomas clínicos associados à doença de Parkinson ao longo de sua progressão.....	21
Figura 2 -	Pirâmide de fases de evolução da doença de Parkinson.....	22
Figura 3 -	Representação dos estágios da doença de Parkinson, segundo Braak e colaboradores (2003a), mostrando a evolução dos depósitos de corpos de Lewy nas diferentes regiões do cérebro....	23
Figura 4 -	Alvos da terapia farmacológica dopaminérgica na doença de Parkinson.....	25
Figura 5 -	Representação do gene <i>LRRK2</i> , sua localização cromossômica e proteína.....	29
Figura 6 -	Frequência da mutação G2019S no gene <i>LRRK2</i> encontrada em diferentes populações do mundo.....	31
Figura 7 -	Representação do gene <i>GBA</i> , sua localização cromossômica e proteína.....	32
Figura 8 -	Frequência das mutações no gene <i>GBA</i> encontrada em diferentes populações do mundo.....	35
Figura 9 -	Gráfico das idades de manifestação da DP (em anos).....	56
Figura 10 -	Gráfico da idade de manifestação da DP (em anos) nos portadores de mutações severas e brandas no gene <i>GBA</i> e no grupo IPD.....	57
Figura 11 -	Gráfico da história familiar da DP, apresentado de acordo com a	

	proporção de casos familiares e esporádicos da desordem nos grupos analisados (LRRK2-PD e GBA-PD + IPD). ** $p < 0,01$	59
Figura 12 -	Gráfico da distribuição de gênero nos grupos LRRK2-PD, GBA-PD e IPD, apresentado de acordo com a proporção de homens e mulheres.....	59
Figura 13 -	Gráfico dos dados clínicos nos grupos analisados.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes associados à DP que seguem um padrão de herança monogênica.....	27
Tabela 2 -	Dados demográficos dos grupos de pacientes com DP em estudo.....	41
Tabela 3 -	Oligonucleotídeos utilizados na PCR da região do gene <i>GBA</i> na qual as mutações N370S e L444P estão localizadas.....	45
Tabela 4 -	Condições utilizadas na PCR para amplificação do fragmento do gene <i>GBA</i>	45
Tabela 5 -	Condições de ciclagem utilizadas na PCR da região do gene <i>GBA</i> analisada.....	45
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento das regiões nas quais as mutações N370S e L444P no gene <i>GBA</i> estão localizadas.....	47
Tabela 7 -	Condições de ciclagem utilizadas no sequenciamento dos segmentos do gene <i>GBA</i> analisados.....	48
Tabela 8 -	Dados clínicos e demográficos dos pacientes com DP de acordo com a presença ou ausência de mutações nos genes <i>GBA</i> e <i>LRRK2</i>	52
Tabela 9 -	Diferenças nos dados demográficos e clínicos nos grupos de pacientes de acordo com os genes mutados, em comparação ao grupo IPD.....	53
Tabela 10 -	Resultados da análise estatística referentes às médias da idade de manifestação da DP para todos os grupos analisados.....	55

Tabela 11 - Resultados da análise estatística para a história familiar, distribuição de gênero e sintomas da DP para todos os grupos analisados.....	58
Tabela 12 - Resultados da análise estatística para a história familiar, distribuição de gênero e sintomas da DP para todos os grupos analisados.....	61
Tabela 13 - Tamanho amostral de estudos de comparação de dados clínicos entre portadores de mutações nos genes <i>LRRK2</i> (G2019S) ou <i>GBA</i> e não portadores.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-O-M-DOPA	3-O-metil-dopa
A	adenina
AADC	aminoácido aromático descarboxilase
AD	autossômico dominante
Akt1	protein kinase B1
ANK	domínio ankyrin repeat
ANOVA	análise de variâncias
AR	autossômico recessivo
ARM	domínio armadillo
<i>ATP13A2</i>	gene <i>ATPase type 13A2</i>
C	citossina
°C	grau Celsius
<i>CHCHD2</i>	gene <i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COMT	catecol-O-metiltransferase
COR	domínio C-terminal of ROC
D1R	receptor D1 de dopamina
D2R	receptor D2 de dopamina
DAT	transportador de dopamina
DG	doença de Gaucher
<i>DJ-1</i>	<i>oncogene DJ-1</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>DNAJC6</i>	gene <i>DnaJ (Hsp40) homolog</i>
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DOPAC	ácido 3,4-dioxi-fenilacético
DP	doença de Parkinson
dp	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>EIF4G1</i>	gene <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-gamma 1</i>
F	<i>forward / senso</i>

<i>FBX07</i>	gene <i>F-box only protein 7</i>
G	guanina
<i>GBA</i>	gene <i>Glicocerebrosidase</i>
GBA-PD	grupo de pacientes com mutações no gene <i>GBA</i>
GEPD	Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease study
GTPase	enzima hidrolase da guanosina trifostato
<i>HTRA2</i>	gene <i>HtrA serine peptidase 2</i>
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IC	Intervalo de confiança
IINEURO	Instituto Integrado de Neurociências de Goiânia
INDC	Instituto de Neurologia Deolindo Couto
IPD	grupo de pacientes com DP idiopática
L-Dopa	levodopa
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
LRRK2-PD	grupo de pacientes com a mutação LRRK2 G2019S
MAOB	monoamina oxidase tipo B
MARK1	microtubule affinity-regulating kinase 1
MS	Ministério da Saúde
n	tamanho amostral
NSF	proteína N-ethylmaleimide sensitive fusion
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>odds ratio</i>
<i>p</i>	probabilidade
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDCGC	PD Cognitive Genetics Consortium
pH	potencial hidrogeniônico

<i>PINK1</i>	gene <i>PTEN-Induced Putative Kinase 1</i>
<i>PLA2G6</i>	gene <i>group VI phospholipase A2</i>
<i>PRKN</i>	gene <i>Parkin</i>
R	<i>reverse / antissenso</i>
Rab	Ras-related proteins in brain
<i>RAB39B</i>	gene <i>Ras-related protein Rab-39B</i>
<i>RIC3</i>	<i>RIC3</i> acetylcholine receptor chaperone
ROC	domínio Ras-renin-angiotensin system
rpm	rotações por minuto
RPS15	Ribosomal protein s15
SCMRJ	Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro
<i>SNCA</i>	gene <i>α-Sinucleína</i>
SNpc	parte compacta da substância negra
<i>SYNJ1</i>	gene <i>synaptojanin 1</i>
T	timina
TBE	tampão tris, ácido bórico, EDTA
TE	tampão tris, EDTA
TH	tirosina hidroxilase
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</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
UK	United Kingdom
V	Volt
<i>VPS13C</i>	gene <i>Vacuolar protein sorting 13C</i>
<i>VPS35</i>	gene <i>Vacuolar Protein Sorting 35</i>
vs	versus

LISTA DE SÍMBOLOS

χ^2	qui-quadrado
μL	microlitro
μM	micromolar
ng	nanograma
kb	kilobase
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
nº	número
X	vezes

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	OBJETIVOS	38
1.1	Objetivos específicos	38
2	METODOLOGIA	39
2.1	Pacientes com DP	39
2.2	Coleta de Material Biológico	41
2.3	Extração de DNA	42
2.4	Estimativa de integridade e concentração do DNA	42
2.5	Análise molecular	43
2.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
2.7	Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da PCR	45
2.8	Purificação dos produtos da PCR	45
2.9	Reação de sequenciamento	46
2.10	Coleta dos dados clínicos	48
2.12	Análise estatística	48
3	RESULTADOS	50
3.1	Idade de Manifestação	53
3.2	História Familiar e Distribuição de Gênero	57
3.3	Dados Clínicos	59
4	DISCUSSÃO	64
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com DP	88
	ANEXO B – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ	90

ANEXO C – Manuscrito publicado no periódico Journal of the Neurological Sciences.....	91
--	----

INTRODUÇÃO

A neuropatologia da doença de Parkinson e seus sinais clínicos

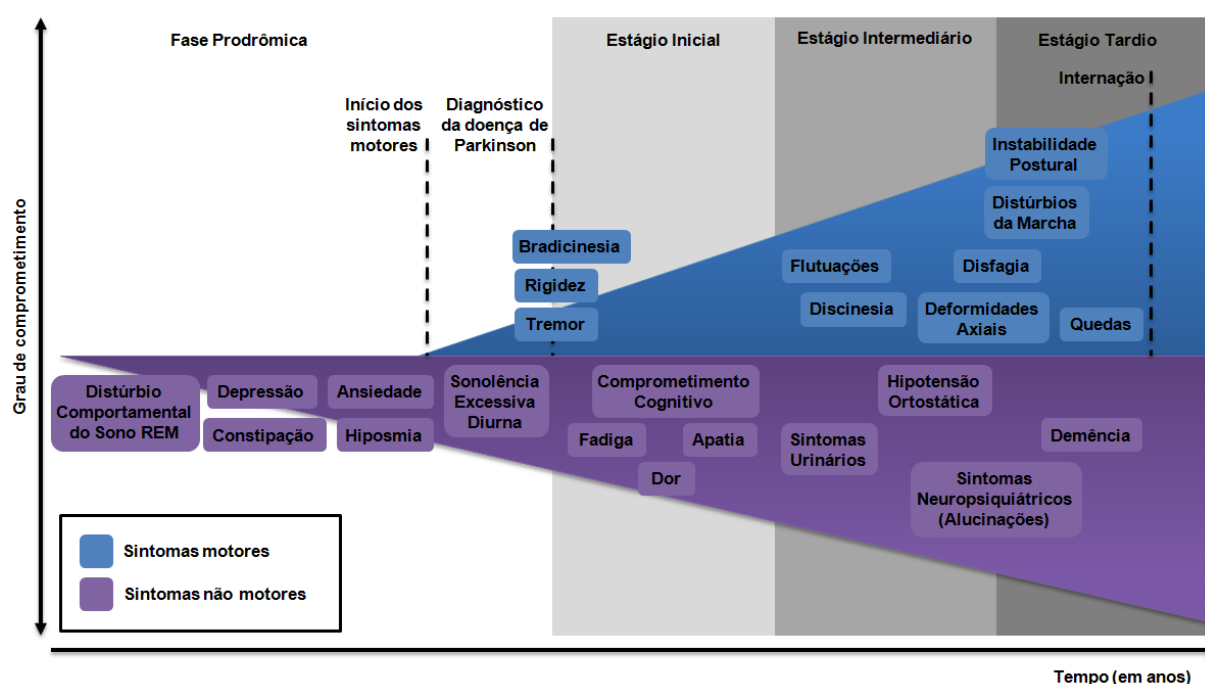
A doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) é uma condição neurodegenerativa, progressiva e irreversível, que acomete ambos os sexos e cursa com distúrbios do movimento (Singh *et al.*, 2007; Henchcliffe & Severt, 2011). A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em idosos depois da doença de Alzheimer e apresenta alta prevalência, estimada em 1% a 4% dos indivíduos com mais de 65 anos (de Rijk *et al.*, 2000; de Lau & Breteler, 2006).

Clinicamente, sintomas motores como rigidez muscular, tremor em repouso, bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntários) e instabilidade postural são característicos da doença (Litvan *et al.*, 2003; Jankovic, 2008). Os sintomas motores observados são decorrentes da intensa perda dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNpc), na base do mesencéfalo, embora neurônios de outras regiões do cérebro também estejam envolvidos no curso da doença, o que torna a DP complexa e multissistêmica (Lang & Lozano, 1998; O'Malley, 2010; Tsui & Isacson, 2011). A patogênese molecular da DP está relacionada a diversas vias e mecanismos, como a proteostase da α -sinucleína, a função mitocondrial, o estresse oxidativo, a homeostase de cálcio, o transporte axonal e a neuroinflamação (Poewe *et al.*, 2017). Entretanto, a principal característica patológica da doença é a presença dos corpos de Lewy, que são inclusões intracelulares de agregados proteicos, formados principalmente pela deposição da proteína α -sinucleína nos neurônios sobreviventes (Spillantini *et al.*, 1997; 1998; para revisão ver Goedert *et al.*, 2013).

Além dos sinais motores cardinais, a maioria dos pacientes com DP apresentam também características não motoras (Chaudhuri & Schapira, 2009; Siderowf & Lang, 2012). Esses sintomas envolvem diversas funções, incluindo distúrbios de sono (insônia, sonolência excessiva diurna, sonhos vívidos, distúrbio comportamental do sono REM, síndrome das pernas inquietas, entre outros), sintomas neuropsiquiátricos (depressão, apatia, ansiedade, déficit de atenção, disfunção cognitiva, alucinações e demência), sintomas disautonômicos (distúrbios

urinários, sudorese, hipotensão ortostática, disfunção urogenital, distúrbios gastrointestinais – sialorreia, disfagia, refluxo, náusea, constipação intestinal) e sintomas sensoriais (distúrbios de olfato, disfunção visual e dor) (Chaudhuri & Schapira, 2009) (Figura 1).

Figura 1 – Sintomas clínicos associados à doença de Parkinson ao longo de sua progressão



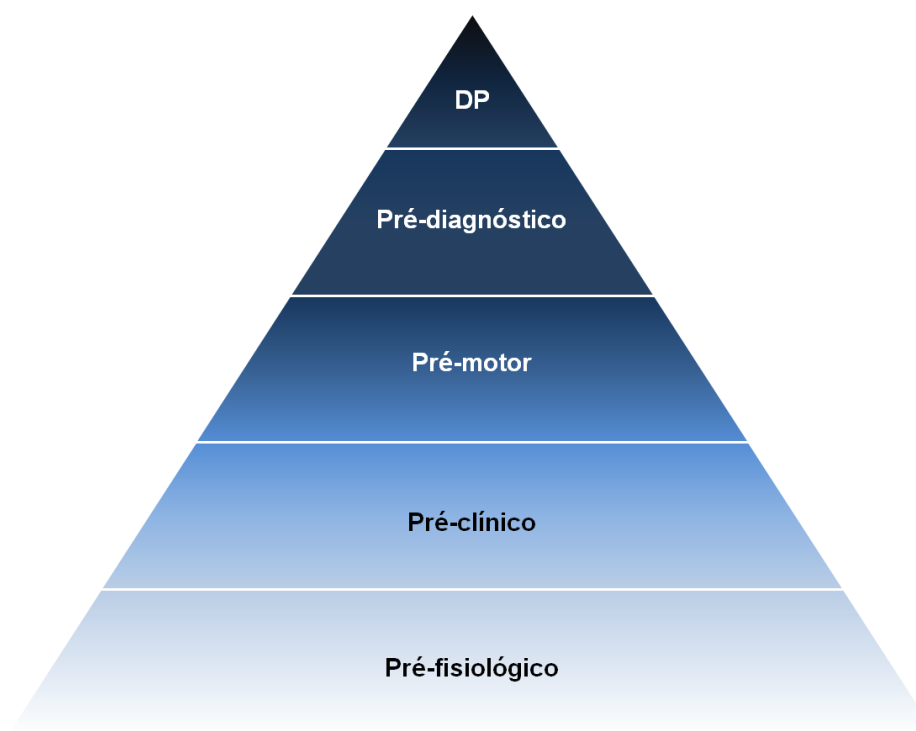
Legenda: O diagnóstico da DP ocorre próximo ao início dos sintomas motores clássicos (estágio inicial), mas pode ser precedido por uma fase prodrômica, caracterizada por sinais não motores. Os sintomas não motores tornam-se cada vez mais prevalentes conforme a doença avança, mas podem estar presentes em um grau variável ao longo de toda a sua evolução. A progressão debilitante da DP é conduzida pela combinação destes sinais não motores com o aumento da severidade dos sintomas motores cardinais, o desenvolvimento de complicações motoras induzidas por L-Dopa (estádio intermediário) e a evolução de deficiências motoras pouco responsivas ao L-Dopa, como instabilidade postural, problemas de marcha (incluindo congelamento) e disfagia (estádio tardio).

Fonte: Adaptado de Poewe *et al.*, 2017.

Alguns sinais clínicos não motores podem anteceder os sintomas motores clássicos da DP, de forma que a evolução da doença pode ser dividida em etapas (Siderowf & Stern, 2006) (Figura 2). Na fase pré-fisiológica, os pacientes não apresentam evidências que sugiram a presença da condição, mas podem portar mutações genéticas, que representam fatores de risco para o desenvolvimento da DP (Siderowf & Stern, 2006; Stern & Siderowf, 2010). A fase pré-clínica se refere àquela na qual alterações fisiológicas iniciais podem ser detectadas através de

exames de neuroimagem e de testes olfatórios (Marek *et al.*, 1996; Stern, 2004; Siderowf & Lang, 2012; Jennings *et al.*, 2014). Na fase pré-motora, indivíduos podem apresentar sintomas como a diminuição da sensibilidade do olfato, disfunção autonômica, constipação intestinal, distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão e ansiedade, e de sono (Shiba *et al.*, 2000; Abbott *et al.*, 2001; 2005; Ross *et al.*, 2008; Siderowf & Lang, 2012). Na fase pré-diagnóstica, os pacientes têm algumas características clínicas sutis da DP, que ocorrem antes de atenderem aos critérios de diagnóstico (Siderowf & Stern, 2006; Stern & Siderowf, 2010; Noyce *et al.*, 2016).

Figura 2 – Pirâmide de fases de evolução da doença de Parkinson



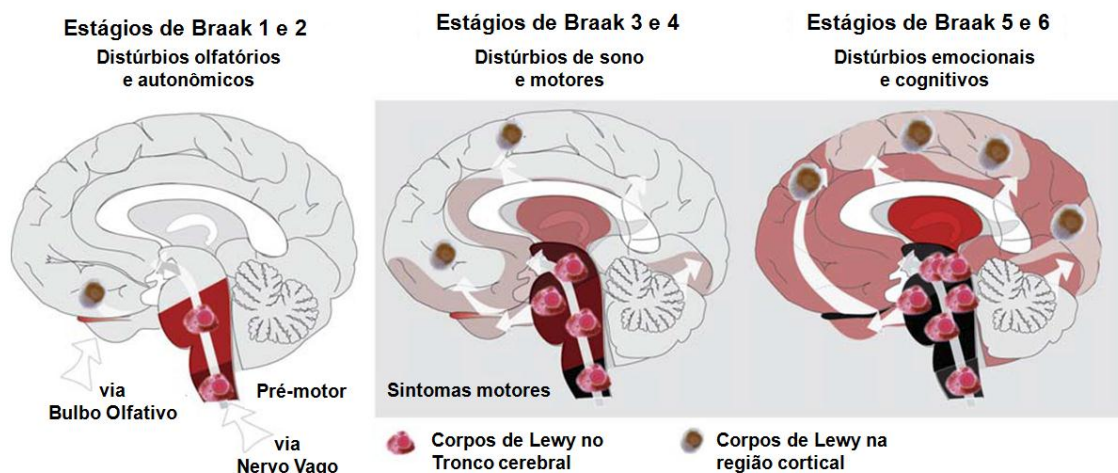
Legenda: Nesse modelo, há quatro estágios que precedem às manifestações clássicas da desordem. Embora um número relativamente grande de indivíduos tenha predisposição para desenvolver a doença, apenas alguns deles progridem a cada nível, de forma que o número dos que desenvolvem a DP é uma pequena fração do grupo de risco.

Fonte: Adaptado de Siderowf & Stern, 2006 e de Siderowf & Lang, 2012.

Braak e colaboradores (2003a) desenvolveram a hipótese de seis estágios de formação de corpos de Lewy na DP, na qual o dano neuronal segue uma sequência de eventos marcada por alterações características, que permitem distinguir fases da doença (Figura 3). Nos estágios 1 e 2, inicia-se a formação e deposição dos

corpúsculos de Lewy nas regiões do nervo vago, bulbo olfatório e medula oblonga (Braak *et al.*, 2003b; 2004; 2006), o que causa um déficit autonômico e olfativo (Halliday *et al.*, 2011). Nos estágios 3 e 4, quando nota-se redução de mais de 50% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Fearnley & Lees, 1991), começam a ser afetadas as regiões do tronco encefálico, amígdala e mesocórtex (Braak *et al.*, 2003a; 2004; 2006), causando perturbações do sono e motoras (Halliday *et al.*, 2011). A partir desse momento, torna-se possível o reconhecimento macroscópico das lesões e a fase pré-sintomática evolui para a fase clinicamente reconhecível da doença (Braak *et al.*, 2003a; 2006). As regiões neocorticais (Braak *et al.*, 2003b; 2004; 2006) são finalmente atingidas nos estágios 5 e 6, além da substância negra apresentar um grande déficit de neurônios (Braak *et al.*, 2003b; 2006), causando, assim, comprometimento neurocomportamental, cognitivo e emocional (Halliday *et al.*, 2011).

Figura 3 – Representação dos estágios da doença de Parkinson



Legenda: Segundo Braak e colaboradores (2003a), mostrando a evolução dos depósitos de corpos de Lewy nas diferentes regiões do cérebro.

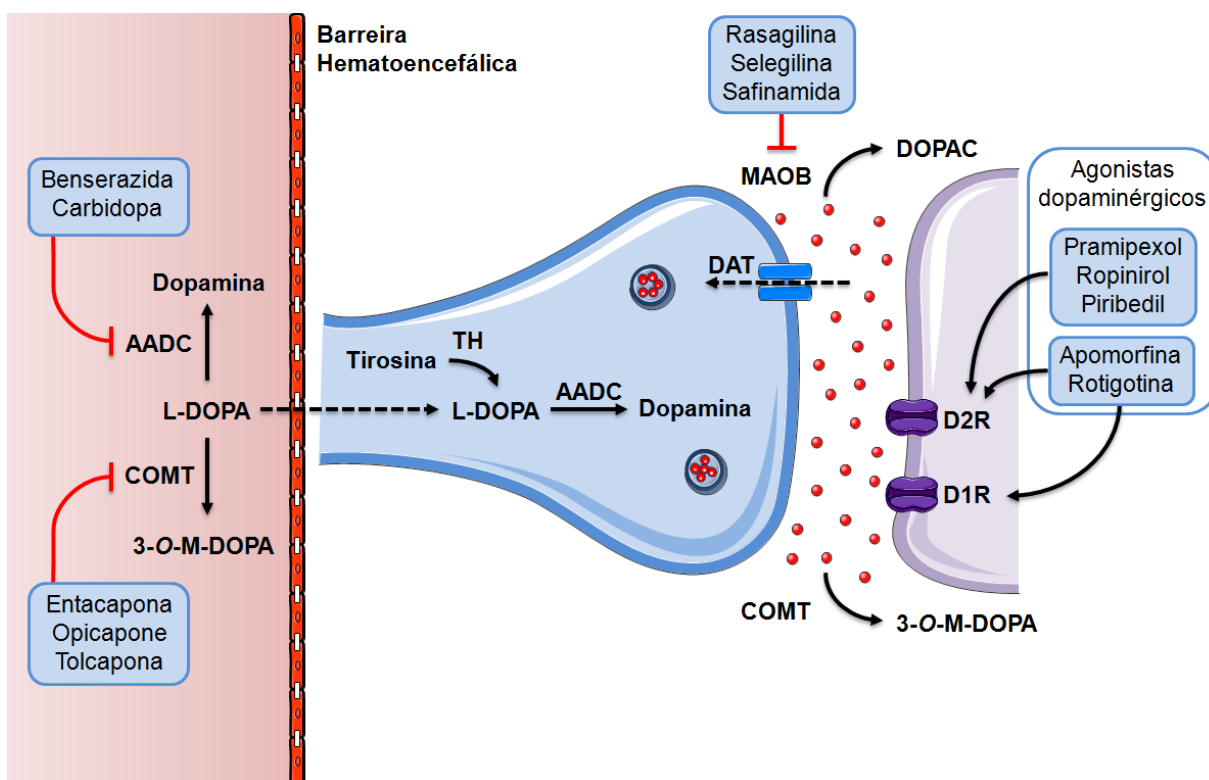
Fonte: Adaptado de Halliday *et al.*, 2011.

Tratamento

A patogênese e a etiologia da DP têm sido objeto de muitos estudos, na esperança de que um tratamento efetivo seja alcançado. Os avanços terapêuticos trazem a possibilidade de um efetivo gerenciamento e controle dos sintomas e da qualidade de vida durante anos após o início da doença (Poewe *et al.*, 2017). No entanto, o desafio maior ainda é o desenvolvimento de terapias que possam impedir, desacelerar ou reverter a neurodegeneração associada à doença (Schapira, 2015).

Atualmente, o tratamento medicamentoso é o principal meio utilizado no controle dos sintomas da DP e o objetivo dessa terapia é suprir a deficiência de dopamina estriatal nos gânglios da base através da administração de precursor ou agonistas de dopamina (Olanow *et al.*, 2001; Tarrants *et al.*, 2010; Connolly & Lang, 2014; Poewe *et al.*, 2017). O precursor levodopa (L-Dopa) é a droga mais prescrita e eficaz por promover uma melhora dos distúrbios motores, com boa repercussão na qualidade e na expectativa de vida dos pacientes, embora seu uso contínuo possa causar efeitos adversos, como flutuações motoras e discinesias (Olanow *et al.*, 2004; Schapira *et al.*, 2007; Aquino & Fox, 2015). Além do L-Dopa e dos agonistas de dopamina, a terapia farmacológica dopaminérgica inclui também inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT), que previnem o metabolismo periférico da dopamina e aumentam sua biodisponibilidade e meia-vida, e inibidores da monoamina oxidase tipo B (MAOB), que disponibilizam a recaptção da dopamina e aumentam suas concentrações sinápticas (Schapira, 2011; Müller, 2015; Poewe *et al.*, 2017) (Figura 4). O tratamento farmacológico não dopaminérgico também pode ser utilizado em casos de complicações motoras e de resistência à terapia de substituição de dopamina (Poewe *et al.*, 2017).

Figura 4 – Alvos da terapia farmacológica dopaminérgica na doença de Parkinson



Legenda: Os alvos pré-sinápticos incluem a substituição de L-Dopa combinada a inibidores periféricos de aminoácido aromático descarboxilase (AADC) ou catecol-O-metiltransferase (COMT). Os inibidores de monoamina oxidase tipo B (MAOB) aumentam a disponibilidade sináptica de dopamina, enquanto os agonistas de dopamina atuam na região pós-sináptica. A seta tracejada do sangue para o cérebro designa o transporte da barreira hematoencefálica de L-Dopa. A seta tracejada através do transportador de dopamina (DAT) denota a recaptação de dopamina a partir da fenda sináptica. 3-O-M-DOPA: 3-O-metil-dopa; D1R: receptor D1 de dopamina; D2R: receptor D2 de dopamina; DOPAC: ácido 3,4-dioxi-fenilacético; TH: tirosina hidroxilase.

Fonte: Adaptado de Poewe *et al.*, 2017 e Servier Medical Art.

Etiologia

Embora as causas que levam à DP não sejam completamente conhecidas, fatores de risco ambientais e genéticos têm sido associados à etiologia da doença (Delamare & Meissner, 2017). Dados da literatura mostram que fatores ambientais, como a exposição a toxinas (pesticidas) e traumas na cabeça (traumatismo craniano), estão relacionados ao desenvolvimento da DP (Tanner *et al.*, 2009; Wan & Lin, 2016; Taylor *et al.*, 2016). Além disso, evidências sugerem que hábitos de vida, como a prática de atividades físicas e a alimentação (consumo de cafeína) também podem contribuir para reduzir o risco de desenvolvimento da doença

(Hernán *et al.*, 2002; Thacker *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Nos últimos anos, a descoberta de inúmeros fatores genéticos associados à etiologia da DP tem enfatizado o envolvimento de mutações patogênicas ou variantes de risco como importantes causas da doença (Schulte & Gasser, 2011; Bonifati, 2014; Delamare & Meissner, 2017).

Em relação aos fatores genéticos associados à DP, mutações em diferentes genes são conhecidas por causar formas monogênicas raras da doença (de herança autossômica dominante ou recessiva) (Schulte & Gasser, 2011; Bonifati, 2014; Delamare & Meissner, 2017) (Tabela 1). Além dessas, variantes de risco em diversos genes também contribuem para a etiologia da DP, reforçando a complexidade da arquitetura genética desta condição (Schulte & Gasser, 2011; Kumar *et al.*, 2012; Delamare & Meissner, 2017). Dentre os diversos fatores genéticos relacionados à DP, mutações nos genes *Leucine-Rich repeat Kinase 2 (LRRK2)* e *Glicocerebrosidase (GBA)* chamam a atenção por sua alta incidência, com frequências diferindo de acordo com o *background* populacional.

Tabela 1 – Genes associados à DP que seguem um padrão de herança monogênica

Gene	Localização	Herança	Proteína	Fenótipo	Referências
SNCA	4q21	AD	α -Sinucleína	DP de início precoce e curso agressivo	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997
LRRK2	12q12	AD	Dardarina / LRRK2	DP típica e início tardio	Zimprich <i>et al.</i> , 2004; Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
GBA	1q21	AD (?)	Glicocerebrosidase	DP típica e início tardio	Neudorfer <i>et al.</i> , 1996; Aharon-Peretz <i>et al.</i> , 2004
VPS35	16q11.2	AD	Vps35	DP típica e início tardio	Zimprich <i>et al.</i> , 2011; Vilariño-Güell <i>et al.</i> , 2011
EIF4G1	3q27.1	AD (?)	eIF4G1	DP de início tardio	Chartier-Harlin <i>et al.</i> , 2011
CHCHD2	7p11.2	AD	CHCHD2	DP típica e de início tardio	Funayama <i>et al.</i> , 2015
RIC3	11p15	AD	RIC3	DP típica e fenótipos não motores	Sudhamaan <i>et al.</i> , 2016
PRKN	6q25.2-q27	AR	Parkin	DP de início precoce e curso lento	Kitada, 1998
PINK1	1p35-36	AR	PINK1	DP de início precoce e curso lento	Valente <i>et al.</i> , 2004
DJ-1	1p36	AR	DJ-1	DP de início precoce e curso lento	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
HTRA2	2p12	AR	Omi/Htra2	DP típica	Strauss <i>et al.</i> , 2005

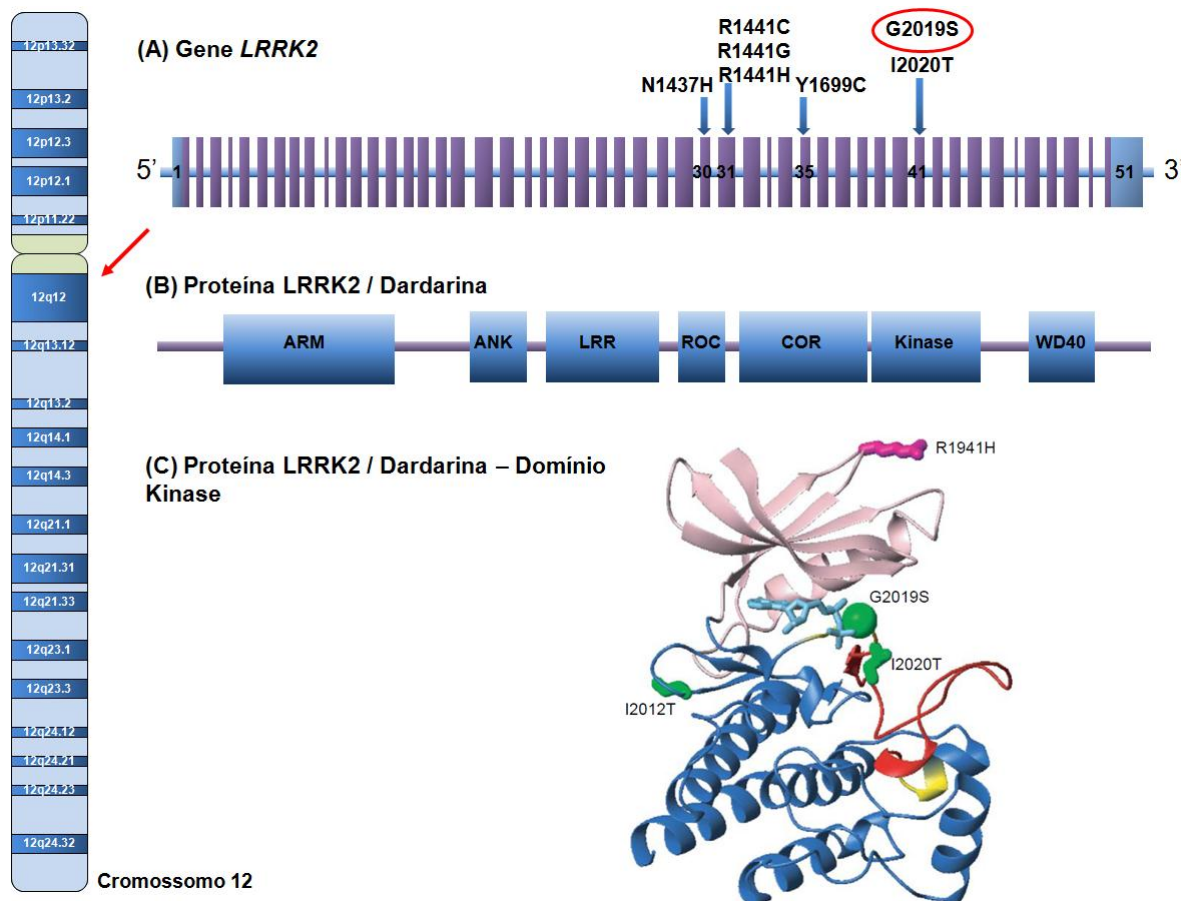
Legenda: SNCA: α -Sinucleína; LRRK2: Leucine-Rich repeat Kinase 2; GBA: Glicocerebrosidase; VPS35: Vacuolar Protein Sorting 35; GBA: Glicocerebrosidase; EIF4G1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-gamma 1; CHCHD2: Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2; RIC3: RIC3 acetylcholine receptor chaperone; PRKN: Parkin; PINK1: PTEN-Induced Putative Kinase 1; DJ-1: oncogene DJ-1; HTRA2: HtrA serine peptidase 2. AD: autossômico dominante; AR: autossômico recessivo. Os genes associados a formas atípicas e juvenis da DP não foram incluídos na tabela – ATP13A2: ATPase type 13A2; PLA2G6: group VI phospholipase A2; FBXO7: F-box only protein 7; DNAJC6: DnaJ (Hsp40) homolog; SYNJ1: synaptojanin 1; VPS13C: Vacuolar protein sorting 13C; RAB39B: Ras-related protein Rab-39B.

Fonte: Adaptado de Bonifati, 2014.

Gene *LRRK2*

O gene *Leucine-Rich repeat Kinase 2* (*LRRK2*; PARK8; OMIM 609007) localiza-se em 12q12. Com 144 kb de comprimento, o gene possui 51 exons e codifica a proteína dardarina ou *LRRK2*, composta por sete domínios e 2.527 aminoácidos (Zimprich *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2006a, Sheng *et al.*, 2010) (Figura 5). A dardarina possui domínios com atividade kinase, GTPase e múltiplos domínios de interação proteína-proteína (Mata *et al.*, 2005; Bonifati, 2014; Islam and Moore, 2017). Alguns dos substratos da dardarina são Akt1, tau associada à tubulina, RPS15, MARK1, NSF e diversas proteínas e GTPases Rab (Ohta *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2014; Krumova *et al.*, 2015; Belluzzi *et al.*, 2016; Steger *et al.*, 2016). Sugere-se que a proteína dardarina esteja envolvida em diversos processos, como organização do citoesqueleto e tráfego de vesículas, resposta imune, autofagia, função e morfologia mitocondrial, controle da tradução, vias de regulação de síntese e degradação de proteína, eventos de sinalização, endocitose sináptica e morte celular (Gardet *et al.*, 2010; Gehrke *et al.*, 2010; Cookson, 2012; Berwick & Harvey, 2012; Matta *et al.*, 2012; Tsika & Moore, 2012; Islam and Moore, 2017). Além disso, estudos mostram que o *LRRK2* é expresso em diversas áreas do cérebro, incluindo regiões dos gânglios da base, que são associadas à disfunção motora na DP, e em áreas relacionadas a funções não motoras, como o hipocampo (Simón-Sánchez *et al.*, 2006; Higashi *et al.*, 2007).

Figura 5 – Representação do gene *LRRK2*, sua localização cromossômica e proteína



Legenda: (A) Esquema do gene *LRRK2*, indicando sua localização no cromossomo 12 (seta vermelha). As setas azuis apontam para os exons onde se encontram as variantes patogênicas. O círculo vermelho destaca a mutação G2019S. (B) Esquema da proteína dardarina e seus domínios ARM (*armadillo*), ANK (*ankyrin repeat*), LRR (*leucine-rich repeat*), ROC (*Ras-renin-angiotensin system*), COR (*C-terminal of ROC*), cinase e WD40. (C) Modelo da estrutura do domínio cinase da proteína dardarina. As regiões N-terminal e C-terminal do domínio estão representadas em rosa e azul escuro, respectivamente. A esfera verde representa o resíduo de glicina na posição 2019 e sinaliza o local onde ocorre a mutação G2019S, no circuito de ativação quinase mostrado em vermelho.

Fonte: Adaptado de Mata *et al.*, 2006a e Corti *et al.*, 2011.

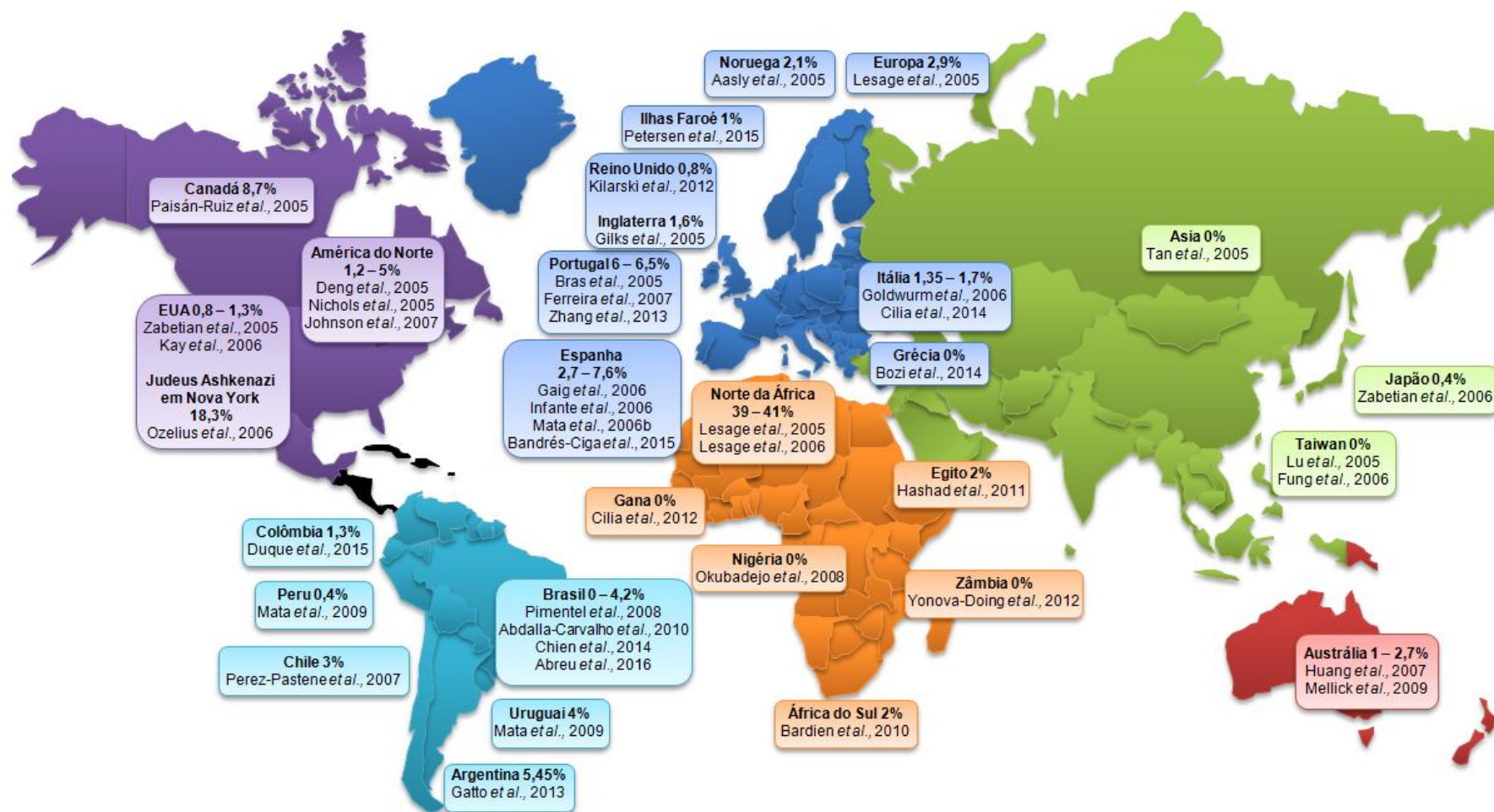
Mutações no gene *LRRK2* são a causa mais comum da DP autossômica dominante (Bonifati, 2014). Até o momento, mais de 100 mutações foram descritas nesse gene, porém apenas algumas são bem caracterizadas (Delamare & Meissner, 2017). Dentre elas, sete mutações são consideradas patogênicas: N1437H, R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S e I2020T (Bonifati, 2014) (Figura 5). A mutação patogênica mais frequentemente relatada em diversas populações é a

G2019S, sendo encontrada em aproximadamente 40% de árabes norte africanos (Lesage *et al.*, 2006) e em 18% de Judeus Ashkenazi (Ozelius *et al.*, 2006) (Figura 6). No entanto, essa variante é rara ou ausente em populações asiáticas, com frequências inferiores a 0,4% (Tan *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2006; Zabetian *et al.*, 2006; Wu-Chou *et al.*, 2013).

A G2019S apresenta penetrância incompleta associada à idade, com um risco de desenvolvimento da DP de 28% aos 59 anos, 51% aos 69 anos e 74% aos 79 anos (Healy *et al.*, 2008). Além disso, dados da literatura sugerem que mutações no *LRRK2*, em particular a G2019S, contribuem para o desenvolvimento da DP através de um mecanismo de ganho de função tóxica, por aumentar a atividade quinase da dardarina (West *et al.*, 2005; 2007).

A experiência de nosso grupo em relação ao estudo do gene *LRRK2* em pacientes brasileiros com e sem história familiar da DP (Pimentel *et al.*, 2008) levou à identificação da mutação G2019S em heterozigose em três de 154 pacientes analisados (1,95%), não sendo a mesma observada entre 250 controles saudáveis da mesma população. Em outro estudo de nosso grupo, Abdalla-Carvalho e colaboradores (2010) analisaram 204 pacientes brasileiros com DP, sendo rastreados todos os exons do gene *LRRK2* nos 154 casos já relatados, além de 50 pacientes adicionais, e identificaram a mutação G2019S em cinco deles (2,4%) e em nenhum indivíduo controle. Além disso, Abreu e colaboradores (2016) detectaram a variante em seis dos 141 pacientes brasileiros com DP, com história familiar compatível com herança autossômica dominante, sendo encontrada em uma frequência de 4,2%. Entretanto, em uma pesquisa conduzida em 100 pacientes com DP esporádica de início tardio e 100 controles saudáveis, na cidade de São Paulo, Chien e colaboradores (2014) não detectaram a presença da variante G2019S nos indivíduos avaliados (Figura 6).

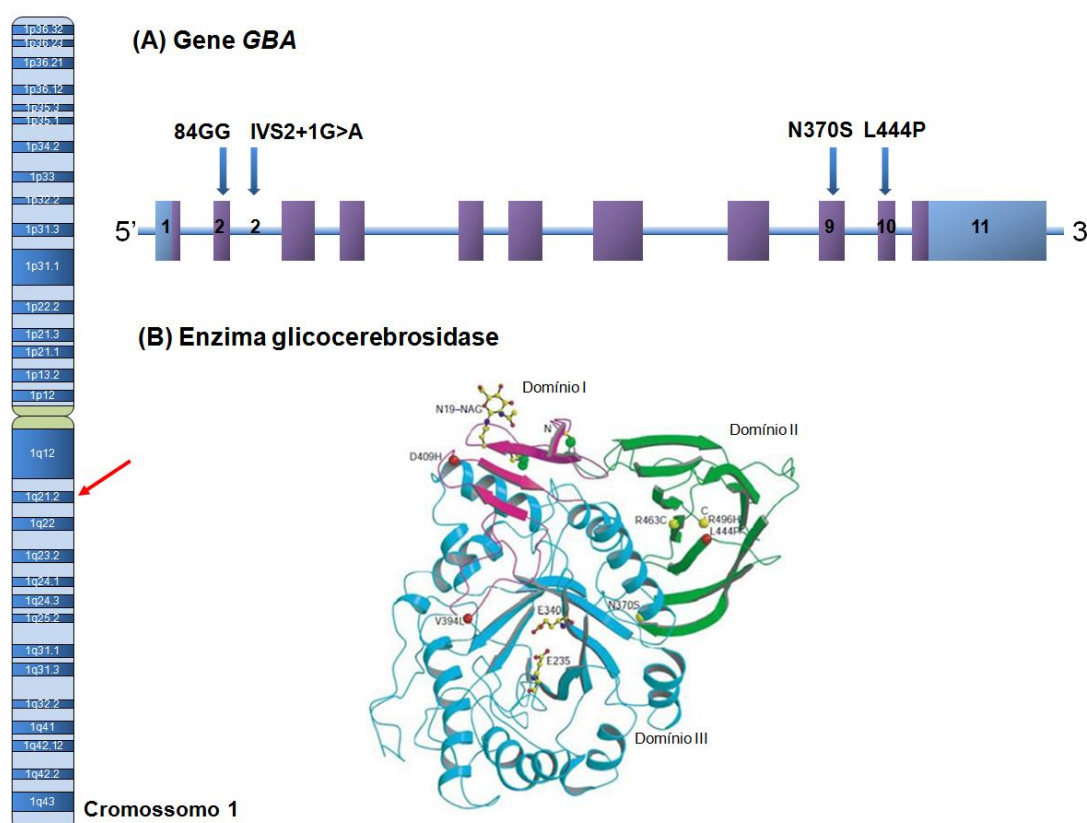
Figura 6 – Frequência da mutação G2019S no gene *LRRK2* encontrada em diferentes populações do mundo



Gene *GBA*

O gene *Glicocerebrosidase* (*GBA*; OMIM 606463) mapeia em 1q21 (Winfield *et al.*, 1997; Schapira, 2015) e possui 7,6 kb de extensão, com 11 exons e 10 introns (Horowitz *et al.*, 1989) (Figura 7). Ele codifica a proteína glicocerebrosidase, com três domínios e 497 aminoácidos (Dvir *et al.*, 2003). Trata-se de uma enzima lisossômica, que catalisa a hidrólise do glicocerebrosídeo glicosilceramida, um glicolípido de membrana, convertendo-o em glicose e ceramida (Beutler, 1992; Sidransky, 2004). Outro substrato dessa enzima é o glicolípido glicosilesfingosina (Sidransky, 2004).

Figura 7 – Representação do gene *GBA*, sua localização cromossômica e proteína



Legenda: (A) Esquema do gene *GBA*, indicando sua localização no cromossomo 1 (seta vermelha). As setas azuis apontam para o íntron 2 e para os exons 2, 9 e 10, onde se encontram as mutações mais comuns. (B) Modelo da estrutura da enzima glicocerebrosidase, com a localização de seus domínios. No centro da enzima, se encontram os sítios catalíticos do sítio ativo. As esferas vermelhas representam as mutações severas mais comuns enquanto as amarelas, as mutações brandas mais comuns.

Fonte: Adaptado de Dvir *et al.*, 2003.

A presença de mutações no gene *GBA* em homozigose ou heterozigose composta é reconhecida como causa de uma doença lisossômica de armazenamento de lipídios, a doença de Gaucher (DG, OMIM 606463) (Hruska *et al.*, 2008; Schulte & Gasser, 2011). Além disso, variantes em heterozigose nesse gene têm sido identificadas como um importante fator de risco para a DP (Aharon-Peretz *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2009; Lesage *et al.*, 2011a).

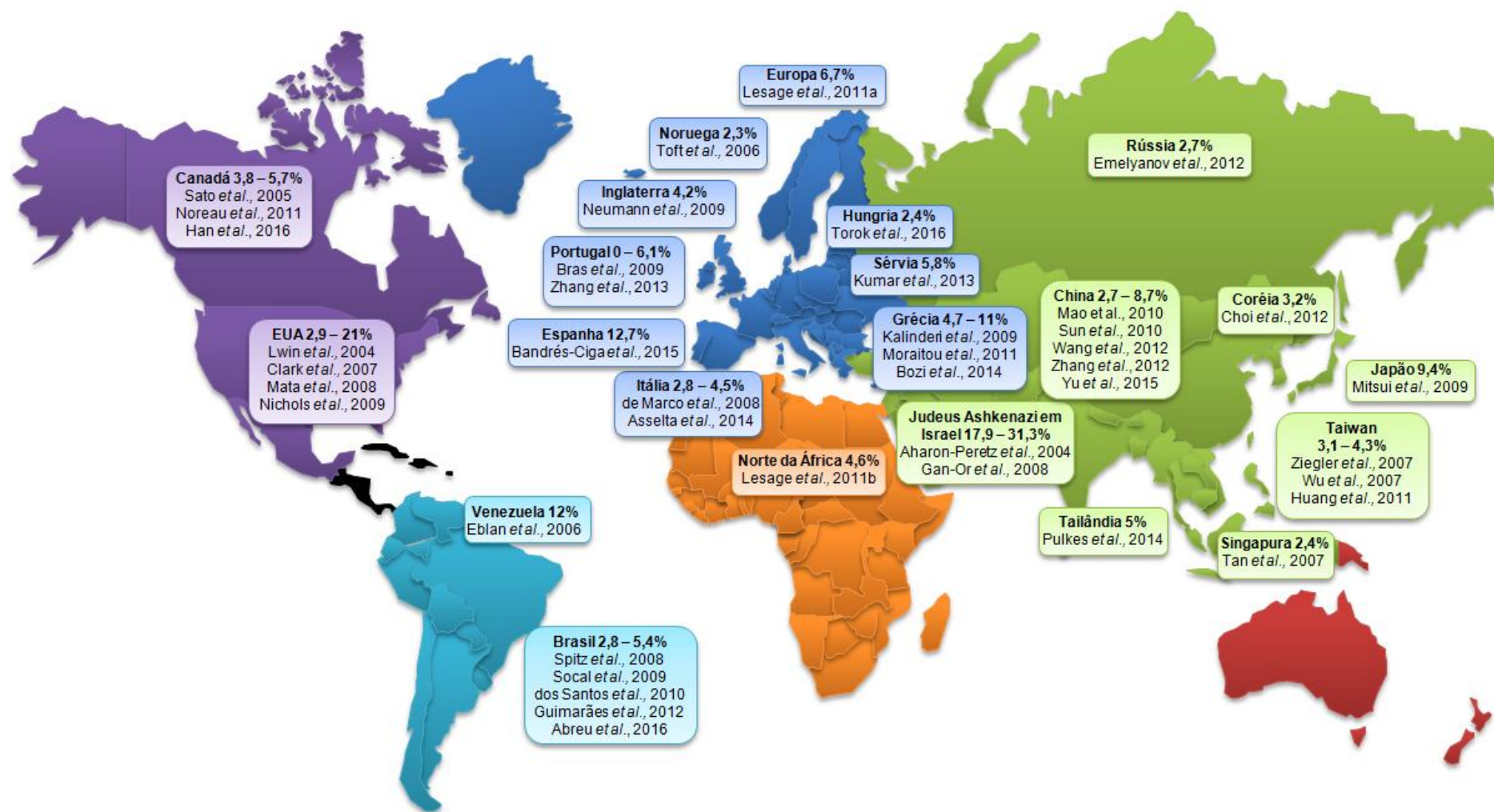
Até o momento, mais de 300 mutações e polimorfismos no gene *GBA* têm sido identificados em pacientes com DG, incluindo alterações de sentido trocado, sem sentido, *frameshift*, pequenas deleções e inserções (Hruska *et al.*, 2008; Schapira, 2015). As mutações mais comuns na DG são: N370S; L444P; 84GG e IVS2+1G>A (Koprivica *et al.*, 2000) (Figura 7). Entre as mutações e polimorfismos do gene *GBA* relacionados à DP, a N370S e a L444P são as mais frequentemente estudadas em todos os grupos étnicos (Swan & Saunders-Pullman, 2013) e representam 70% dos alelos mutados no gene *GBA* em pacientes com DP (Lesage *et al.*, 2011a).

As mutações no *GBA* são relativamente mais frequentes na população judaica Ashkenazi, chegando a 31,3% em pacientes com DP e 6,2% em controles saudáveis (Aharon-Peretz *et al.*, 2004) (Figura 8). Em populações asiáticas, a proporção de casos de DP portando mutações no *GBA* varia de 2,4 a 9,4%, comparada a frequências inferiores a 1,5% nos controles normais (Mitsui *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2015).

Na população brasileira, de etnia altamente miscigenada (Giolo *et al.*, 2012), cinco estudos relataram dados de frequência das mutações no gene *GBA* em pacientes com DP, sendo três deles conduzidos por nosso grupo de pesquisa (Figura 8). Dentre eles, dos Santos e colaboradores (2010) identificaram seis portadores de mutações em uma amostra de 110 pacientes brasileiros com e sem história familiar da DP (5,4%, sendo dois probandos com a L444P, dois portadores da N370S e um com a IVS2+1G>A), e nenhum dentre os 155 controles saudáveis. Em 2012, Guimarães e colaboradores estendeu essa análise ao rastrear as mutações L444P e N370S em mais 237 brasileiros com DP e identificaram oito portadores (3,4%, sendo três com a N370S e cinco com a L444P). Em outro estudo de nosso grupo, Abreu e colaboradores (2016) rastrearam as alterações N370S e L444P em 141 indivíduos brasileiros com DP, com história familiar compatível com herança autossômica dominante, e observaram mutações no *GBA* em quatro deles

(2,8%), sendo três com a variante L444P e um com a N370S. Em uma pesquisa conduzida com um grupo de 65 pacientes da cidade de São Paulo que manifestaram a DP antes dos 55 anos de idade, Spitz e colaboradores (2008) identificaram 2 probandos (3,0%) com a variante L444P no gene *GBA*, com história familiar da doença, não observando alterações em 267 indivíduos saudáveis. Em 2009, Socal e colaboradores investigaram uma amostra de 62 indivíduos com DP, da cidade de Porto Alegre (RS), com idade de manifestação média da doença de $41,4 \pm 10$ anos, e identificaram as mutações L444P e N370S em dois pacientes (3,0%).

Figura 8 – Frequência das mutações no gene *GBA* encontrada em diferentes populações do mundo



Embora os mecanismos pelos quais variantes no *GBA* em heterozigose contribuem para o parkinsonismo ainda sejam desconhecidos, foram postuladas tanto hipóteses de perda quanto de ganho de função tóxica pela enzima mutada, implicando uma relação próxima entre a glicocerebrosidase e a α -sinucleína (Velayati *et al.*, 2010; Westbroek *et al.*, 2011; Swan & Saunders-Pullman, 2013). Correlações genótipo-fenótipo fornecem algum suporte para a hipótese de perda de função devido a mutações que resultam na ausência da proteína, como 84GG e IVS2+1G>A, aumentarem o risco de desenvolvimento de parkinsonismo (Velayati *et al.*, 2010).

Deve-se ressaltar, também, que o efeito das diferentes alterações no gene *GBA* parece ocasionar diferenças na atividade enzimática. As mutações variam entre brandas, que causam uma ligeira diminuição na atividade da enzima; severas, que resultam em uma enzima altamente não funcional; ou nulas, que geram a não produção de proteína (Sidransky, 2004; Swan & Saunders-Pullman, 2013). As variantes no *GBA* foram assim categorizadas de acordo com diferenças de efeitos a nível fenotípico que causam na doença de Gaucher, com mutações severas e nulas associadas à forma neuropática da desordem (Tipos II e III) e mutações brandas associadas à DG não neuropática (Tipo I) (Beutler *et al.*, 2005). Da mesma maneira, o risco de desenvolvimento de parkinsonismo parece estar correlacionado com o tipo de mutação no *GBA*, de forma que mutações brandas (como a N370S, por exemplo) aumentam cerca de duas vezes o risco de desenvolvimento da doença em relação a indivíduos sem a alteração, enquanto as variantes severas e nulas (IVS2+1G>A e L444P, por exemplo) aumentam em mais de 13 vezes esse risco (Gan-Or *et al.*, 2008). Além disso, o tipo de mutação pode afetar diferentemente a idade de manifestação da doença, sendo mais precoce entre os portadores de mutações severas do que entre os pacientes com mutações brandas (Gan-Or *et al.*, 2008).

Heterogeneidade clínica

A apresentação clínica da doença de Parkinson mostra uma importante heterogeneidade em sua progressão, na idade de início e na severidade dos sintomas motores e não motores, incluindo a manifestação de sinais neuropsiquiátricos, como o declínio cognitivo (Foltynie *et al.*, 2002). A doença pode se apresentar com progressão lenta e curso benigno ou de forma progressiva rápida e incapacitante (Selikhova *et al.*, 2009; van Rooden *et al.*, 2010; Lawton *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). A DP pode se iniciar cedo, em torno dos 30 anos, ou mais tarde, próximo à nona década de vida (Giladi *et al.*, 2016). Dentre os sintomas clínicos, o tremor pode ser predominante ou o fenótipo pode revelar outras características principais, como incapacidades posturais e de marcha, rigidez ou bradicinesia e não mostrar nenhum sinal de tremor (Selikhova *et al.*, 2009; van Rooden *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2015). Pacientes com DP podem desenvolver mudanças comportamentais e cognitivas, diferentes aspectos de dor, distúrbios de sono e autonômicos (Jankovic *et al.*, 2008; Selikhova *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015; Giladi *et al.*, 2016). Ainda, a doença de Parkinson, no geral, parece acometer mais homens do que mulheres, sustentando a hipótese de um efeito protetor causado por hormônios femininos, por um mecanismo genético associado ao sexo ou por diferenças específicas na exposição a fatores ambientais de risco (Baldereschi *et al.*, 2000; Van Den Eeden *et al.*, 2003; Poewe *et al.*, 2017).

Atualmente, embora se acredite que a origem da variabilidade fenotípica observada na doença esteja relacionada às complexas interações entre fatores genéticos e ambientais, essa questão permanece pouco compreendida (Zorzon *et al.*, 2002; Bekris *et al.*, 2010). Dados da literatura mostram que a DP associada a variantes no gene *LRRK2* parece apresentar um fenótipo com menor comprometimento cognitivo (Somme *et al.*, 2015; Srivatsal *et al.*, 2015), melhor função olfativa (Saunders-Pullman *et al.*, 2014) e, mais frequentemente, correlacionado à dificuldade de marcha e instabilidade postural (Alcalay *et al.*, 2015), quando comparada à DP idiopática. Em contraste, pacientes portadores de mutações no gene *GBA* mostram uma idade de início mais precoce (Wang *et al.*, 2014), com maior prevalência de sintomas não motores, como o declínio cognitivo

(Alcalay *et al.*, 2012; Brockmann *et al.*, 2011) e distúrbios neuropsiquiátricos (Brockmann *et al.*, 2011), se comparados a pacientes não portadores de mutações.

Ainda que comparações diretas da apresentação clínica da DP entre grupos de pacientes com genótipos específicos sejam escassas (Gan-Or *et al.*, 2010; Angeli *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), as características clínicas observadas em indivíduos com mutações nos genes *LRRK2* e *GBA* comparados com não portadores revelam diferenças na evolução da doença (Sidransky *et al.*, 2009; Pulkes *et al.*, 2014; Giladi *et al.*, 2016). Isso indica que a apresentação dos sinais clínicos da DP pode ser diferentemente modificada por mutações nesses genes (Gan-Or *et al.*, 2010), dando suporte à existência de diferentes subtipos genéticos da doença (Foltynie *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014). Sendo assim, o esclarecimento de correlações genótipo-fenótipo na DP tem uma importante implicação na predição do prognóstico e no acompanhamento médico, podendo, também, contribuir para o desenvolvimento e implementação de estratégias terapêuticas específicas (Gan-Or *et al.*, 2015; Giladi *et al.*, 2016).

Embora nossa experiência em estudos prévios aponte que as mutações *LRRK2* G2019S e *GBA* L444P e N370S são as causas genéticas associadas à DP mais comuns em nossa população (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2012; Abreu *et al.*, 2016), nenhuma correlação em relação ao quadro clínico da doença em indivíduos com DP portadores de mutações nesses genes e aqueles com DP idiopática foi até então conduzida em uma população com alto nível de miscigenação como a nossa. Assim, através do presente estudo, uma análise comparativa de fenótipos clínicos da DP associados a mutações específicas nos genes *LRRK2* e *GBA* em relação a probandos com DP idiopática foi conduzida em uma amostra de pacientes brasileiros.

1. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal conduzir uma análise comparativa em relação ao quadro clínico da doença de Parkinson entre pacientes brasileiros com mutações específicas nos genes *LRRK2* e *GBA* e probandos com DP idiopática, de forma a inferir se existe uma correlação entre o genótipo específico e o perfil fenotípico da doença.

1.1 Objetivos específicos

- a) Comparar a presença de sintomas motores e não motores, resposta ao tratamento com levodopa, história familiar, assim como o sintoma inicial e a idade de manifestação entre portadores da variante *LRRK2* G2019S, pacientes com as mutações *GBA* N370S, L444P e IVS2+1G>A e probandos não portadores de mutações.

2 METODOLOGIA

2.1 Pacientes com DP

Nesse estudo, dados clínicos e demográficos de 131 pacientes brasileiros com DP, não aparentados, foram colhidos e avaliados, sendo: 16 indivíduos com a variante LRRK2 G2019S (grupo LRRK2-PD), 21 portadores de mutações no *GBA* (grupo GBA-PD), um paciente com mutações em ambos os genes (incluído em ambos os grupos) e 93 probandos com DP idiopática, ou seja, não portadores de mutações (grupo IPD) (Tabela 2). Alguns desses casos foram, anteriormente, caracterizados do ponto de vista genético por nosso grupo (Pimentel *et al.*, 2008; Abdalla-Carvalho *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2012; Spitz *et al.*, 2015; Abreu *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Dados demográficos dos grupos de pacientes com DP em estudo

Informações	DP idiopática (IPD)	G2019S (LRRK2-PD)	GBA-PD			Ambas LRRK2 G2019S e GBA L444P	Total
			Efeito severo		Efeito brando		
			L444P	IVS2+1G>A	N370S		
N (%)	93	16	12	1	8	1	131
Número de homens (%)	57 (61,3)	7 (43,8)	7 (58,33)	1	3 (37,5)	0	75 (57,3)
Idade em anos	38 - 92	46 - 76	36 - 84	63	34 - 71	48	34 - 92
Idade (média ± dp)	66,2 ± 2,0	60,4 ± 9,0	63,1 ± 12,2	--	60,0 ± 11,2	--	64,4 ± 12,1
Idade de manifestação em anos	29 - 87	29 - 60	29 - 61	49	23 - 67	38	23 - 87
Idade de manifestação (média ± dp)	55,0 ± 2,4	47,3 ± 9,1	46,8 ± 9,5	--	50,1 ± 13,9	--	52,9 ± 12,4
Duração da doença em anos	0 - 28	4 - 31	7 - 25	14	2 - 19	10	0 - 31
Duração da doença (média ± dp)	11,1 ± 6,7	12,9 ± 6,8	12,9 ± 6,4	--	10,9 ± 6,4	--	11,5 ± 6,5
História familiar da doença (%)	14 (15,1)	8 (50,0)	5 (41,7)	0	1 (12,5)	1	30 (22,9)

Legenda: IPD: DP idiopática; LRRK2-PD: portadores da mutação LRRK2 G2019S; GBA-PD: portadores de mutações no GBA; dp: desvio padrão.

Os pacientes incluídos nessa pesquisa foram provenientes de ambulatórios de Neurologia e Distúrbios do Movimento do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC/UFRJ), Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro (SCMRJ), Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP/UFF), Instituto Integrado de Neurociências de Goiânia (IINEURO) e Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV/UFAM). Todos os pacientes foram avaliados por médicos neurologistas especialistas em distúrbios do movimento ligados a esses centros de referência, seguindo os critérios clínicos do UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (Hughes *et al.*, 1992). Os indivíduos testados foram classificados como casos familiares, quando relataram ao menos um parente próximo com DP ou como casos isolados, quando relataram não haver história familiar da doença.

Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e convidados a participar do estudo. Somente após a autorização do participante, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), a coleta do material biológico para a análise molecular foi realizada. 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 B) e os procedimentos adotados obedeceram às normas éticas do CNS/MS (Resolução 466/2012), que regem as pesquisas envolvendo seres humanos.

2.2 Coleta de Material Biológico

O DNA de cada paciente foi obtido a partir de sangue periférico ou saliva. Na primeira opção, foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), sob condições de plena assepsia. A saliva foi colhida em recipientes do kit Oragene™ DNA self-collection (*DNAGENOTEK*), delicadamente misturada com a solução contida no frasco coletor e mantida à temperatura ambiente. Para que a coleta da saliva se desse de forma adequada, algumas recomendações foram não beber, comer ou fumar 30 minutos antes do procedimento.

2.3 Extração de DNA

Após a coleta de sangue periférico ou saliva, o DNA genômico foi extraído com a utilização de kits comerciais próprios para esta finalidade. A extração de DNA a partir de sangue se deu com a utilização do Kit Wizard® Genomic DNA Purification (*Promega*), seguindo as instruções contidas no protocolo descrito pelo fabricante. A extração de DNA a partir de saliva foi realizada com o Kit ORAGENE™ DNA self-collection (*DNAGENOTEK*), utilizando o protocolo descrito pelo fabricante. Para ambos os métodos, uma alíquota da solução final contendo o DNA de cada paciente foi armazenada em microtubo de 1,5 mL a 4°C e as demais alíquotas estocadas em tubos de 1,5 mL a -20°C.

2.4 Estimativa de integridade e concentração do DNA

A integridade das amostras de DNA foi avaliada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (*Bioagency*) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare*), ácido bórico 89 mM (*MERCK*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare*)]. O preparo das amostras foi feito com 1 µL da alíquota de DNA e 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 da solução de 1 µL de GelRed™ previamente diluído em 500 µL de água destilada (*UNISCIENCE*) e 8 µL de água deionizada (MilliQ). Essa etapa se deu em cuba horizontal [MS 250V Power Supply (*Major Science*)], a 60 V por 1 hora, utilizando como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare*), ácido bórico 89 mM (*MERCK*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare*)]. Após a eletroforese, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação L-Pix® Ex (*Loccus Biotecnologia*). A integridade e intensidade da banda apresentada pelas amostras de DNA genômico foram comparadas com um padrão de DNA de Bacteriófago λ (*Thermo Fisher Scientific*) de 100 ng/µL.

As amostras de DNA tiveram sua concentração estimada através de um espectrofotômetro modelo NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Essa estimativa, assim como, o grau de pureza das amostras (como a contaminação por

proteínas, fenóis e carboidratos) foi calculado pelo equipamento com a configuração para ácidos nucleicos de fita dupla (modo double strand). O preparo das amostras foi realizado com 1 µL da alíquota de DNA extraído. Foi utilizada a solução de reidratação do kit comercial como branco na calibração do equipamento para DNA que foi extraído de sangue periférico e o tampão TE [Tris 10 mM (*GE Healthcare*), HCl (*MERCK*), EDTA 1 mM (*GE Healthcare*); pH 7,4] para DNA extraído a partir da saliva.

2.5 Análise molecular

Para rastrear a presença das mutações N370S (c.1226A>G) e L444P (c.1448T>C) no gene *GBA*, foi realizada a amplificação do DNA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida por sequenciamento automático. A confirmação das mutações encontradas se deu através do sequenciamento dos produtos de uma nova reação de PCR. A identificação da mutação *LRRK2* G2019S (c.6055G>A) ocorreu através da técnica de sequenciamento automático. As análises moleculares para identificação da variante G2019S no gene *LRRK2* foram realizadas por Gabriella de Medeiros Abreu como parte dos experimentos de sua dissertação de Mestrado em Biociência (IBRAG-UERJ) e encontram-se detalhadas em sua dissertação (Abreu, 2015).

2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O fragmento genômico da região na qual as mutações L444P e N370S, no gene *GBA*, ocorrem foi amplificado por PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), conforme mostrado na Tabela 3. Essa reação produziu um fragmento longo, abrangendo a sequência entre os exons 8 e 11 do gene *GBA*. As reações de amplificação foram realizadas em tubos de 0,2 µL, dentro de uma capela de fluxo laminar, sob condições de plena assepsia, seguindo as condições detalhadas na Tabela 4. A PCR ocorreu em um termociclador Veriti 9902 (*Thermo*

Fisher Scientific) com os parâmetros de ciclagem descritos na Tabela 5. Ao final, os produtos foram armazenados a -20°C.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados na PCR da região do gene *GBA* na qual as mutações N370S e L444P estão localizadas

Região	Tamanho do Fragmento	Oligonucleotídeos	Referências
Exons 8 a 11	1682 pb	F 5' TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG 3' R 5' ACCACCTAGAGGGGAAAGTG 3'	Mitsui <i>et al.</i> , 2009

Tabela 4 – Condições utilizadas na PCR para amplificação do fragmento do gene *GBA*

Reagentes	PCR dos Exons 8 a 11
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
Oligonucleotídeo F 10 µM (<i>INVITROGEN/Life Technologies</i>)	0,4 µM
Oligonucleotídeo R 10 µM (<i>INVITROGEN/Life Technologies</i>)	0,4 µM
<i>Tth</i> DNA polimerase 1 U/µL (<i>BIOTOOLS</i>)	1,0 U
DNA ~50 ng	1,0 µL
Volume final	25,0 µL

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

Tabela 5 – Condições de ciclagem utilizadas na PCR da região do gene *GBA* analisada

Etapas	PCR dos Exons 8 a 11	
Desnaturação inicial	94°C – 2'	
Desnaturação	} 35 X	
Anelamento		94°C – 30"
Extensão		61°C – 1' 30"
Extensão Final		72°C – 2'
	72°C – 10'	

2.7 Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento da PCR

Os produtos da PCR foram visualizados através da 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*)]. O preparo das amostras foi feito com 3 μ L da alíquota do produto da PCR, 1 μ L de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (*GE Healthcare*); xileno cianol 0,25% (*GE Healthcare*); glicerol 30% (*ISOFAR*)] e 1 μ L da solução de 1 μ L de GelRed™ previamente diluído em 500 μ L de água destilada (*UNISCIENCE*).

A eletroforese se deu em cuba horizontal [MS 250V Power Supply (*Major Science*)], por, aproximadamente, 1 hora a 80 V, utilizando como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare*), ácido bórico 89 mM (*MERCK*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare*)]. Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação L-Pix® Ex (*Loccus Biotecnologia*).

Para confirmar o tamanho do fragmento amplificado, as bandas dos produtos foram comparadas com um padrão de peso molecular 1 kb DNA Ladder Plus (*Life Technologies*). A análise do rendimento da PCR e da qualidade dos fragmentos amplificados foi realizada através de estimativa visual da intensidade das bandas e da presença de uma única banda. Ao final, os produtos foram armazenados a -20°C até a próxima etapa.

2.8 Purificação dos produtos da PCR

Antes da reação de sequenciamento, os produtos da amplificação foram purificados com a enzima ExoSAP-IT® (*Affymetrix*), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A purificação teve por objetivo a remoção de resíduos resultantes dos reagentes da PCR.

2.9 Reação de sequenciamento

Para a identificação da mutação N370S, utilizou-se *primers* para o exon 9, no qual ela se localiza e, para o rastreamento da alteração L444P, a reação se deu com *primers* para o exon 10, descritos na Tabela 6. Para a reação de sequenciamento utilizou-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras foram preparadas com 1 µL do oligonucleotídeo senso ou anti-senso a 3,2 µM, 1 µL de tampão de sequenciamento 5X (*Thermo Fisher Scientific*), 1 µL de DNA amplificado e purificado (cerca de 50 ng), 0,5 µL do Kit e água deionizada (*MilliQ*) suficiente para um volume final de 10 µL. Essas reações foram conduzidas em um termociclador Veriti modelo 9902 (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as condições de ciclagem apresentadas na Tabela 7.

Tabela 6 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento das regiões nas quais as mutações N370S e L444P no gene *GBA* estão localizadas

Região	Mutação	Oligonucleotídeos	Referências
Exon 9	N370S	F 5' ACCCTTACCTACACTCTCTG 3' R 5' GTGATGTAAGCCATCCGATG 3'	Mitsui <i>et al.</i> , 2009
Exon 10	L444P	F 5' GGGTGACTTCTTAGATGAGG 3' R 5' AGCTGAGAGTGTGATCCTGC 3'	Mitsui <i>et al.</i> , 2009

Tabela 7 – Condições de ciclagem utilizadas no sequenciamento dos segmentos do gene *GBA* analisados

Etapas		Sequenciamento
Desnaturação inicial		96°C – 1'
Desnaturação	} Ciclos	96°C – 10" } 15 X
Anelamento		
Extensão		
Desnaturação	} Ciclos	96°C – 10" } 5 X
Anelamento		
Extensão		
Desnaturação	} Ciclos	96°C – 10" } 5 X
Anelamento		
Extensão		
		60°C – 2'

Os produtos foram, então, precipitados para a remoção do excesso dos reagentes não incorporados na reação. Com esta finalidade, 80 μ L de isopropanol 75% foram adicionados ao produto da reação e, em seguida, a placa de 96 poços [MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (*Thermo Fisher Scientific*)] foi centrifugada por 50 minutos a 3000 rpm (*SIGMA*, 2-16). O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e a placa com as amostras precipitadas foi centrifugada em posição invertida por 1 minuto a 900 rpm, sendo em seguida levada ao termociclador Veriti 9902 (*Thermo Fisher Scientific*) a 75°C por 5 minutos para secagem.

O material foi ressuspenseo em 10 μ L de solução de formamida Hi Di (*Thermo Fisher Scientific*). A placa com as amostras foi levada ao termociclador Veriti 9902 (*Thermo Fisher Scientific*) por 5 minutos a 95°C para desnaturação e, imediatamente, incubada em gelo para manter a desnaturação do DNA. A placa foi novamente centrifugada a 900 rpm por 1 minuto e inserida em um sequenciador ABI Prism 3130 (*Life Technologies*) para processamento.

Na análise das sequências obtidas pela reação de sequenciamento, utilizou-se o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (*Isis Pharmaceuticals, Inc*) e essas sequências foram alinhadas e comparadas ao

fragmento correspondente à sequência do gene *GBA* sem alterações, acessado no banco de dados Ensembl online (transcrito: ENST0000368373).

2.10 Coleta dos dados clínicos

Para a compilação dos dados clínicos e demográficos dos pacientes com DP foi elaborado um formulário, contemplando a presença ou ausência de sintomas motores e não motores, assim como, a resposta ao tratamento com levodopa, a idade de manifestação e a história familiar da doença. O formulário de cada participante da pesquisa foi preenchido de acordo com as informações presentes no prontuário e/ou pelo médico neurologista responsável pelo paciente. Os sintomas incluíram bradicinesia, rigidez, tremor em repouso, instabilidade postural, congelamento da marcha (*freezing*), discinesia, flutuações motoras (*wearing off* - deterioração de final de dose da medicação; *delayed on* - atraso no início do efeito de dose da levodopa; fenômeno *on* e *off* – oscilação da resposta motora, ou seja, mudanças bruscas e aleatórias do estado de mobilidade, sem relação com a administração da dose), declínio cognitivo, alucinações, sintomas depressivos, alteração de voz (hipofonia), alteração do sono (insônia, sono fragmentado, distúrbio do sono REM, sonhos vívidos, pesadelos, síndrome da apnéia-hipopnéia do sono, sonolência excessiva diurna ou síndrome das pernas inquietas), disautonomia (sialorréia, seborreia, sudorese, disfagia, constipação intestinal, incontinência urinária, disfunção sexual, hipotensão postural - lipotímia ou síncope), distúrbios do olfato (hiposmia ou anosmia) e resposta ao levodopa. Sintomas como distúrbios do olfato, declínio cognitivo e sintomas depressivos foram obtidos a partir de queixas dos pacientes.

2.12 Análise estatística

As informações dos pacientes portadores de mutações nos genes *GBA* (GBA-PD) e *LRRK2* (LRRK2-PD) e dos não portadores (IPD) foram comparadas e os valores de p estão mostradas nas Tabelas 8, 9 e 10, nos resultados. Para averiguar a normalidade da distribuição das variáveis contínuas (idade de manifestação), foi conduzido o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como esse dado seguiu a distribuição normal, os valores foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão. Diferenças entre os três grupos em relação a variáveis contínuas foram testadas utilizando análise de variâncias (*one-way ANOVA*), seguida do teste de Tukey. As análises comparativas das variáveis categóricas foram realizadas através do teste de Qui-quadrado (χ^2) (Tabela 10, nos resultados). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os valores de odds ratio (OR) e o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%) também foram calculados. Considerando os valores de p e de IC, $OR > 1$ aponta para susceptibilidade, $OR < 1$ indica proteção e $OR = 1$ representa não associação entre o sintoma e o grupo em questão. As análises dos dados foram feitas com o auxílio do programa estatístico SPSS versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3 RESULTADOS

A comparação de dados demográficos entre os grupos GBA-PD, LRRK2-PD e IPD mostrou diferenças significativas na idade de manifestação da DP e presença de história familiar relatada pelo paciente ($p = 0,004$ e $p = 0,003$, respectivamente). No entanto, não foi observada diferença na proporção de homens e mulheres entre os três grupos analisados ($p = 0,24$) (Tabela 8).

Em relação às características clínicas, as análises revelaram diferenças significativas entre os grupos de portadores de mutações nos genes *GBA* e *LRRK2* e o de não portadores quanto à presença de tremor de repouso ($p = 0,03$), congelamento da marcha ($p = 0,0498$), sintomas depressivos ($p = 0,04$) e disautonomia ($p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferenças entre os grupos quando comparamos a presença de rigidez ($p = 0,47$), instabilidade postural ($p = 0,16$), distúrbios de olfato ($p = 0,14$), discinesia ($p = 0,59$), flutuações motoras ($p = 0,54$), alucinações ($p = 0,09$) e alteração na voz e de sono ($p = 0,85$ e $p = 0,13$, respectivamente). Além disso, não foi observada diferença significativa entre os grupos GBA-PD, LRRK2-PD e IPD, relativa ao sintoma inicial ($p = 0,15$) e à resposta ao tratamento com levodopa ($p = 0,17$) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes com DP de acordo com a presença ou ausência de mutações nos genes *GBA* e *LRRK2*

Características	GBA-PD	LRRK2-PD	IPD	p ^a
Tamanho da amostra (N)	22	17	93	
Idade de manifestação (variação)	47,82 ± 11,30 (23 - 67)	46,76 ± 9,14 (29 - 60)	55,02 ± 12,36 (29 - 87)	0,004 ^d
Proporção homens / mulheres	11/11	7/10	57/36	0,24
Proporção casos familiares / esporádicos	7/15	9/8	15/78	0,003 ^d
Sintoma Inicial				
Tremor (%)	13/22 (59,09)	9/17 (52,94)	66/90 (73,33)	
Bradicinesia (%)	4/22 (18,18)	2/17 (11,76)	1/90 (1,11)	
Rigidez (%)	2/22 (9,09)	1/17 (5,88)	4/90 (4,44)	
Rigidez + Tremor (%)	0/22 (0,0)	0/17 (0,0)	4/90 (4,44)	0,15 ^b
Rigidez + Bradicinesia (%)	2/22 (9,09)	2/17 (11,76)	1/90 (1,11)	
Tremor + Bradicinesia (%)	0/22 (0,0)	2/17 (11,76)	1/90 (1,11)	
Rigidez + Tremor + Bradicinesia (%)	0/22 (0,0)	0/17 (0,0)	1/90 (1,11)	
Outros(s) (%)	1/22 (4,55)	1/17 (5,88)	12/90 (13,33)	
Sintomas presentes				
Bradicinesia (%)	22/22 (100,0)	17/17 (100,0)	93/93 (100,0)	
Rigidez (%)	20/22 (90,91)	16/17 (94,12)	90/93 (96,77)	0,47
Tremor de repouso (%)	16/22 (72,73)	14/17 (82,35)	85/92 (92,39)	0,03 ^c
Instabilidade postural (%)	17/21 (80,95)	10/17 (58,82)	54/92 (58,70)	0,16
Distúrbios do olfato (%) ⁱ	8/14 (57,14)	11/13 (84,62)	21/39 (53,85)	0,14
Complicações motoras				
Congelamento da marcha (%)	13/18 (72,22)	8/17 (47,06)	48/62 (77,42)	0,0498 ^c
Discinesia (%)	12/22 (54,55)	12/17 (70,59)	50/83 (60,24)	0,59
Flutuações motoras (%) ^g	17/22 (77,27)	15/17 (88,24)	51/59 (82,98)	0,54
Complicações não motoras				
Declínio cognitivo (%)	8/21 (38,1)	5/16 (31,25)	13/82 (15,85)	0,055 ^f
Alucinações (%)	11/22 (50,0)	3/17 (17,65)	39/90 (43,33)	0,09
Sintomas depressivos (%)	18/22 (81,82)	13/17 (76,47)	51/90 (56,67)	0,04 ^c
Alteração na voz (hipofonia) (%)	17/21 (80,95)	13/17 (76,47)	52/63 (82,54)	0,85
Alteração de sono (%) ^h	18/21 (85,71)	13/17 (76,47)	76/82 (92,68)	0,13
Disautonomia (%) ⁱ	20/22 (90,91)	9/16 (56,25)	76/78 (97,44)	0,000002 ^e
Resposta ao levodopa (%)	22/22 (100,0)	16/16 (100,0)	83/91 (91,21)	0,17

Legenda: A idade de manifestação é apresentada como média ± desvio padrão, em anos. ^a Teste de χ^2 e ANOVA. A diferença é considerada significativa quando $p < 0,05$. O valor de p se refere ao teste com todos os grupos. ^b Para tremor vs todos os outros sintomas iniciais. ^c $p < 0,05$. ^d $p < 0,01$. ^e $p < 0,001$. ^f Valor de p na borda de significância. ^g Flutuações motoras consistiram de *wearing off*, *delayed on* e fenômeno *on/off*. ^h Alteração de sono foi avaliado como insônia, sono fragmentado, distúrbio do sono REM, sonhos vívidos, pesadelos, síndrome da apneia-hipopneia do sono, sonolência excessiva diurna e síndrome das pernas inquietas. ⁱ Disautonomia incluiu sialorreia, seborreia, sudorese, disfagia, constipação intestinal, incontinência urinária, disfunção sexual, hipotensão postural (lipotímia e síncope). ^j Distúrbios de olfato se referem à presença de hiposmia ou anosmia. Sintomas como distúrbios do olfato, declínio cognitivo e sintomas depressivos foram obtidos a partir de queixas dos pacientes.

Tabela 9 – Diferenças nos dados demográficos e clínicos nos grupos de pacientes de acordo com os genes mutados, em comparação ao grupo IPD

Características	GBA-PD	LRRK2-PD
Tamanho da amostra (n)	22	17
Idade de manifestação	Mais precoce que IPD	Mais precoce que IPD
Distribuição de gênero	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Casos familiares	Similar à IPD	Mais frequente que IPD e GBA-PD
Sintoma Inicial	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Sintomas presentes		
Rigidez	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Tremor de repouso	Menos frequente que IPD e LRRK2-PD	Similar à IPD
Instabilidade postural	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Distúrbios do olfato	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Complicações motoras		
Congelamento da marcha	Similar à IPD	Menos frequente que IPD e GBA-PD
Discinesia	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Flutuações motoras	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Complicações não motoras		
Declínio cognitivo	Similar entre os grupos com valor de <i>p</i> na borda de significância	Similar entre os grupos com valor de <i>p</i> na borda de significância
Alucinações	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Sintomas depressivos	Mais frequente que IPD	Mais frequente que IPD
Alteração na voz (hipofonia)	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Alteração de sono	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos
Disautonomia	Similar à IPD	Menos frequente que IPD e GBA-PD
Resposta ao levodopa	Similar entre os grupos	Similar entre os grupos

Legenda: IPD: grupo de pacientes com doença de Parkinson idiopática; LRRK2-PD: portadores da mutação LRRK2 G2019S; GBA-PD: portadores de mutações no gene *GBA*.

3.1 Idade de Manifestação

Como podemos observar na Tabela 8, diferença estatística foi observada nas médias das idades de manifestação da DP entre os grupos analisados, GBA-PD, LRRK2-PD e IPD. A análise de variâncias (ANOVA) mostrou que a idade de início da doença diferiu significativamente entre os três grupos ($p = 0,004$). Para identificar, dentre os probandos com mutações no *GBA* e no *LRRK2* e os pacientes com DP idiopática, qual era o grupo cuja média da idade de manifestação era diferente das demais, realizou-se o pós-teste. Esta análise, então, revelou diferença entre ambos os grupos de portadores e o de não portadores de mutação ($47,82 \pm 11,30$ anos no grupo GBA-PD vs. $55,02 \pm 12,36$ anos no IPD, $p = 0,03$; e $46,76 \pm 9,14$ anos no grupo LRRK2-PD vs. $55,02 \pm 12,36$ anos no IPD, $p = 0,03$), como podemos observar na Tabela 10 e na Figura 9.

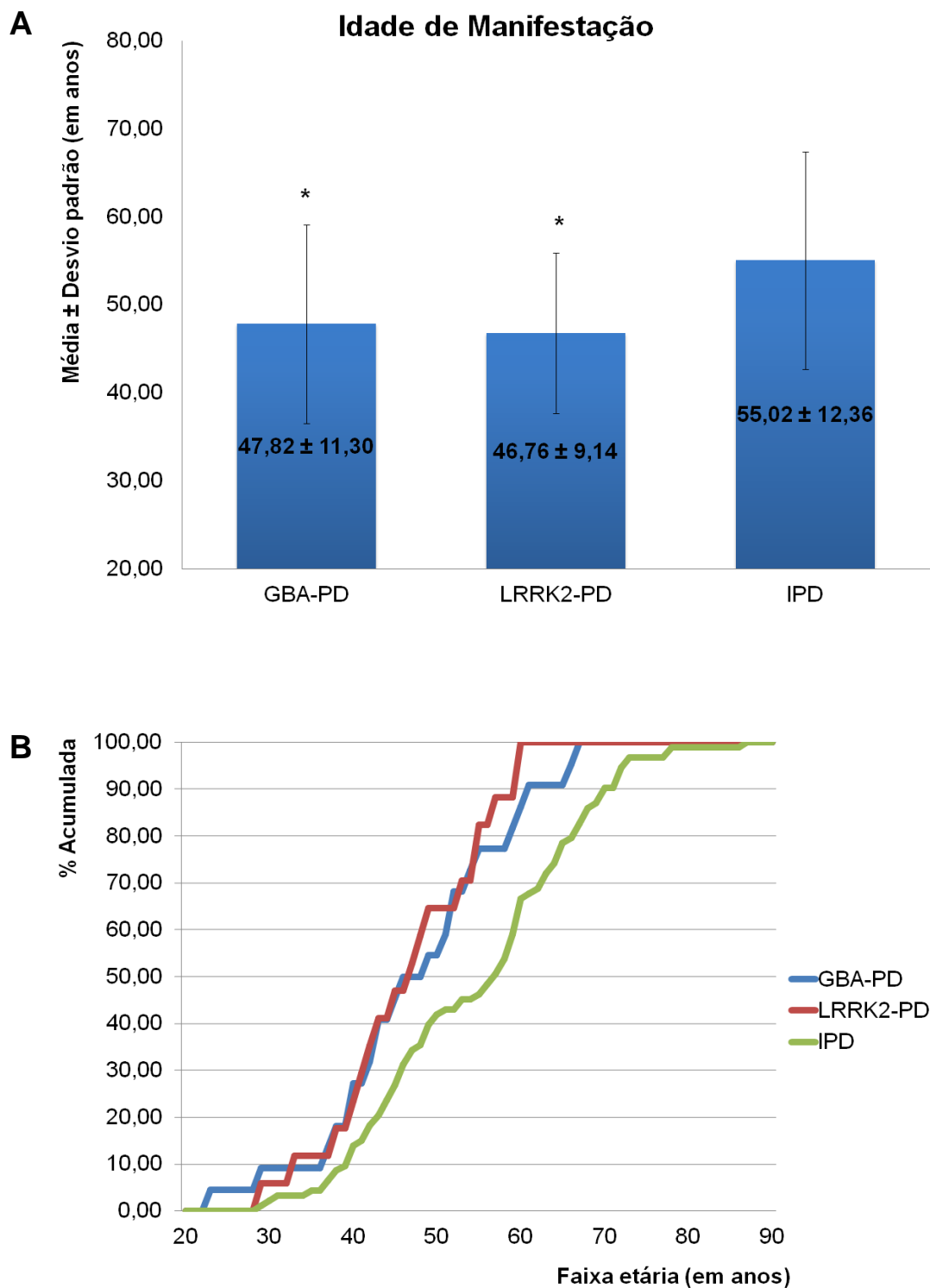
O grupo GBA-PD é constituído de portadores das mutações severas L444P e IVS2+1G>A e da variante branda N370S, como mostrado na Tabela 2. Com o intuito de inferir se a variação no efeito das mutações nesse gene influenciou na idade de manifestação da doença nos pacientes, o grupo foi dividido entre casos índice com alterações de efeito severo e de efeito brando. Apesar do pequeno tamanho amostral resultante dos dois novos grupos formados, a análise pós-teste mostrou que a fonte de significância estava entre o grupo de portadores de variantes de efeito severo e o grupo IPD ($46,36 \pm 9,03$ anos vs. $55,02 \pm 12,36$ anos, respectivamente, $p = 0,04$), mas não entre os grupos com a mutação branda e o IPD ($50,38 \pm 14,82$ anos vs. $55,02 \pm 12,36$ anos, respectivamente, $p = 0,56$; Tabela 10 e Figura 10).

Tabela 10 – Resultados da análise estatística referentes às médias da idade de manifestação da DP para todos os grupos analisados

One-way ANOVA	Média ± dp^a	F	p^b
GBA-PD (n = 22)	47,82 ± 11,30		
LRRK2-PD (n = 17)	46,76 ± 9,14	5,80	0,004
IPD (n = 93)	55,02 ± 12,36		
Teste de Tukey			p^b
GBA-PD vs. LRRK2-PD			0,96
GBA-PD vs. IPD			0,03
LRRK2-PD vs. IPD			0,03
One-way ANOVA – GBA	Média ± dp^a	F	p^b
Mutações Severas (n = 14)	46,36 ± 9,03		
Mutações Brandas (n = 8)	50,38 ± 14,82	3,38	0,04
IPD (n = 93)	55,02 ± 12,36		
Teste de Tukey – GBA			p^b
Mutações Severas vs. Mutações Brandas			0,74
Mutações Severas vs. IPD			0,04
Mutações Brandas vs. IPD			0,56

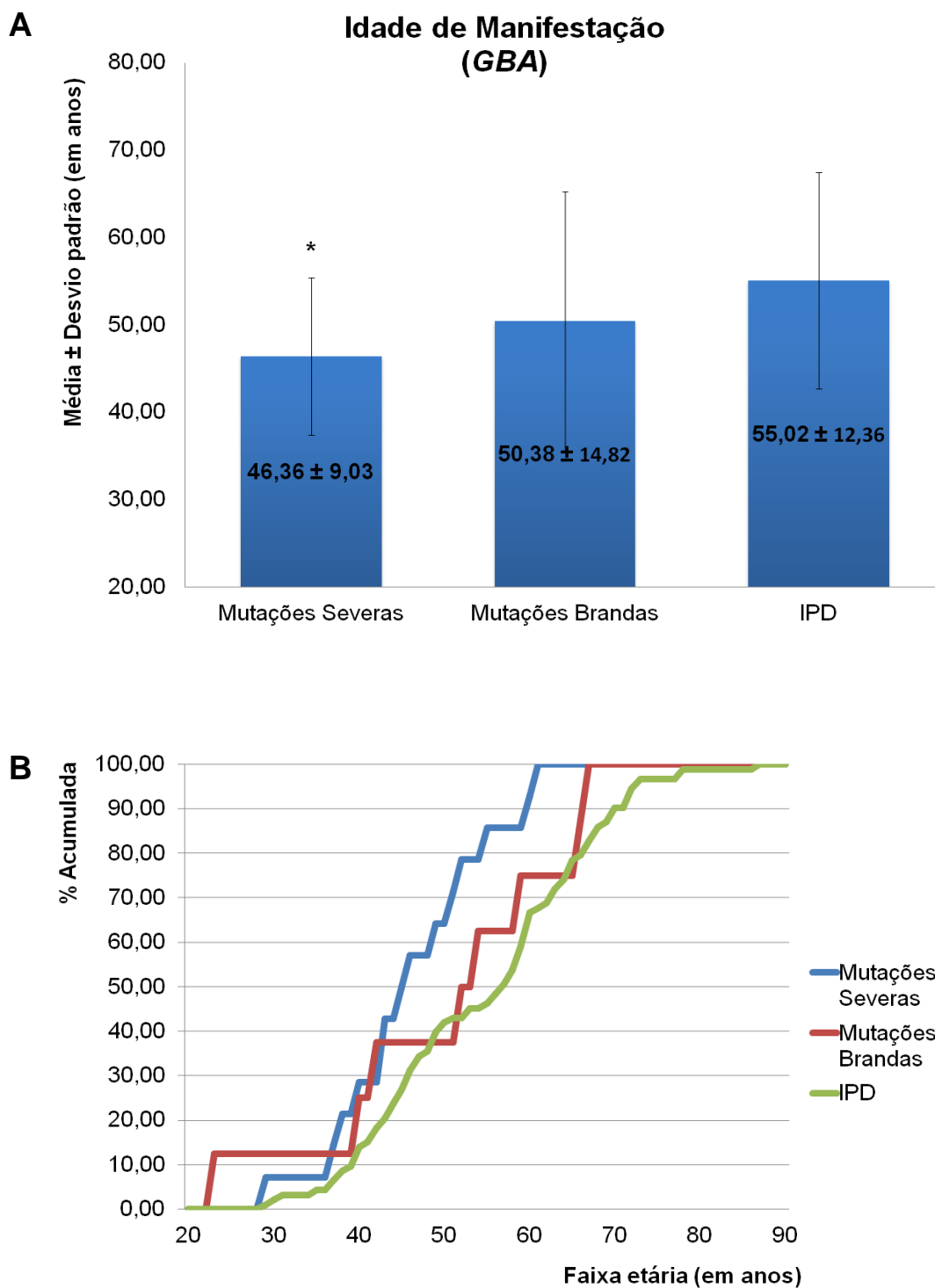
Legenda: IPD: grupo de pacientes com doença de Parkinson idiopática; LRRK2-PD: portadores da mutação LRRK2 G2019S GBA-PD: portadores de mutações no gene *GBA*. ^a: Valores estão apresentados como média ± desvio padrão. ^b: A diferença é considerada significativa quando $p < 0,05$.

Figura 9 – Gráfico das idades de manifestação da DP (em anos)



Legenda: (A) apresentada como média \pm desvio padrão e (B) de acordo com a porcentagem acumulada de pacientes, nos grupos GBA-PD, LRRK2-PD e IPD. * $p < 0,05$.

Figura 10 – Gráfico da idade de manifestação da DP (em anos) nos portadores de mutações severas e brandas no gene *GBA* e no grupo IPD



Legenda: (A) apresentada como média \pm desvio padrão e (B) de acordo com a porcentagem acumulada de pacientes. * $p < 0,05$

3.2 História Familiar e Distribuição de Gênero

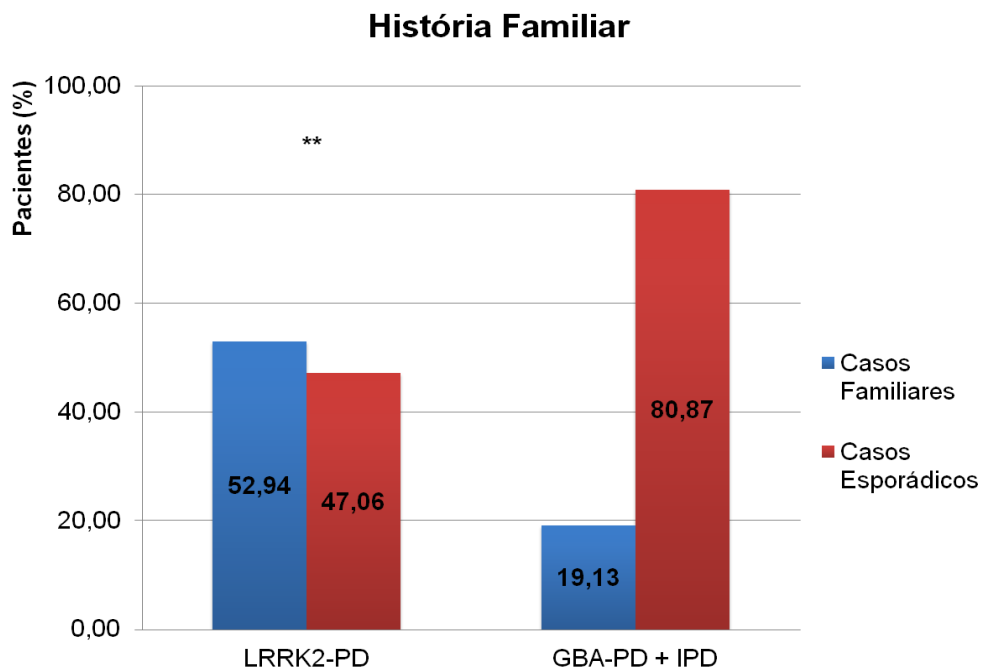
A história familiar da DP foi mais frequentemente observada no grupo LRRK2-PD do que no GBA-PD e IPD somados (OR = 4,76, IC 95% 1,65 – 13,72; $p = 0,002$), como podemos observar na Tabela 10 e na Figura 11. No entanto, apesar do grupo com DP idiopática ser predominantemente masculino e o grupo de portadores de mutações no *LRRK2* ser majoritariamente feminino, a distribuição de gêneros foi estatisticamente semelhante nos três grupos analisados ($p = 0,24$; Figura 12, Tabelas 8 e 11).

Tabela 11 – Resultados da análise estatística para a história familiar, distribuição de gênero e sintomas da DP para todos os grupos analisados

Qui-quadrado (χ^2)	χ^2	p^a
História Familiar		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 93)	11,86	0,003
GBA-PD vs. IPD	2,83	0,09
LRRK2-PD vs. GBA-PD + IPD	9,42	0,002
Distribuição de Gênero		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 93)	2,87	0,24

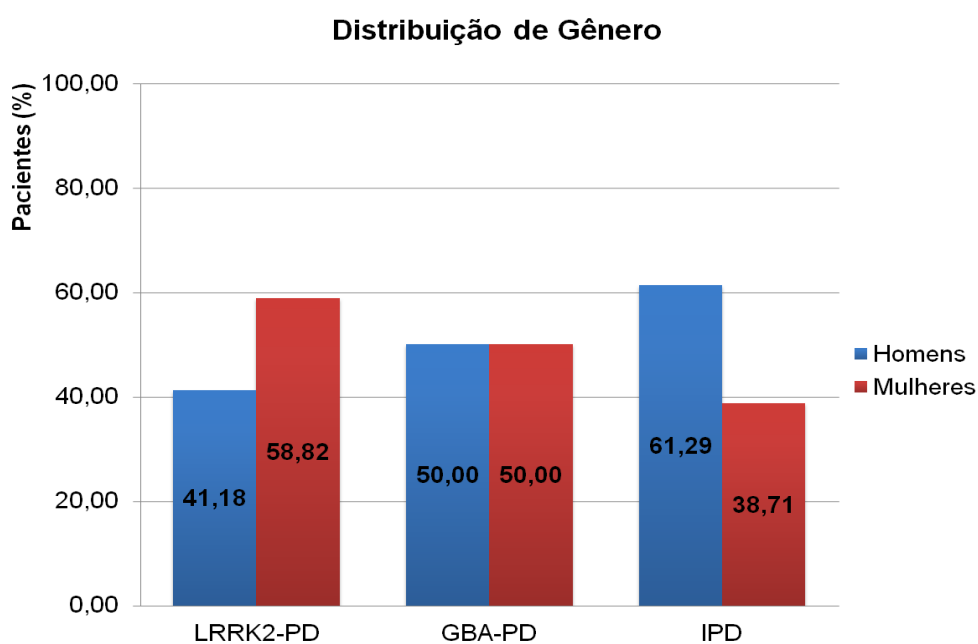
Legenda: IPD: grupo de pacientes com doença de Parkinson idiopática; LRRK2-PD: portadores da mutação LRRK2 G2019S GBA-PD: portadores de mutações no gene *GBA*. ^a: A diferença é considerada significativa quando $p < 0,05$.

Figura 11 – Gráfico da história familiar da DP, apresentado de acordo com a proporção de casos familiares e esporádicos da desordem nos grupos analisados (LRRK2-PD e GBA-PD + IPD)



Nota: ** $p < 0,01$.

Figura 12 – Gráfico da distribuição de gênero nos grupos LRRK2-PD, GBA-PD e IPD, apresentado de acordo com a proporção de homens e mulheres



3.3 Dados Clínicos

Diferença estatística foi observada entre os três grupos analisados quanto à presença de tremor de repouso, congelamento da marcha, sintomas depressivos e disautonomia. Em relação ao tremor de repouso, as frequências também foram significativamente maiores entre os portadores de mutações no *LRRK2* e não portadores somados, quando comparados ao grupo GBA-PD (OR = 3,71, IC 95% 1,19 – 11,63; $p = 0,02$; Figura 13A e Tabela 12). Quando comparamos a presença de congelamento da marcha e disautonomia, esses sintomas foram mais frequentes nos grupos GBA-PD e IPD somados do que nos portadores de mutações no *LRRK2* (respectivamente, OR = 3,61, IC 95% 1,22 – 10,66; $p = 0,02$; e OR = 18,67, IC 95% 4,58 – 76,13; $p < 0,0001$; Figura 13B e Tabela 12). No entanto, sintomas depressivos estiveram presentes em maior proporção nos portadores de mutações do que no grupo IPD (OR = 2,96, IC 95% 1,23 – 7,16; $p = 0,013$; Figura 13C e Tabela 12). Além disso, embora o declínio cognitivo pareça estar presente em maior frequência nos grupos de portadores de mutações do que nos pacientes com DP idiopática, podemos observar um valor de p na borda de significância ($p = 0,055$; Figura 13C e Tabelas 8 e 12).

A maioria dos portadores e não portadores de mutação apresentaram uma resposta favorável ao tratamento com levodopa, com frequências de 100% e 91%, respectivamente, e nenhuma diferença estatística foi identificada entre eles ($p = 0,17$; Tabelas 8 e 12). Do mesmo modo, embora o tremor tenha sido relatado como o sintoma inicial em mais da metade dos pacientes (59,09% no GBA-PD, 52,94% no *LRRK2*-PD e 73,33% no IPD), não foi detectada diferença significativa entre os três grupos analisados ($p = 0,15$; Tabelas 8 e 12).

Tabela 12 – Resultados da análise estatística para a história familiar, distribuição de gênero e sintomas da DP para todos os grupos analisados

Qui-quadrado (χ^2)	χ^2	p^a
Sintoma Inicial^b		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 90)	3,76	0,15
Sintoma Presentes		
Rigidez		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 93)	1,49	0,47
Tremor de Repouso		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 92)	6,94	0,031
LRRK2-PD vs. IPD	1,74	0,19
GBA-PD vs. LRRK2-PD + IPD	5,59	0,02
Instabilidade Postural		
GBA-PD (n = 21), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 92)	3,71	0,16
Distúrbios do Olfato		
GBA-PD (n = 14), LRRK2-PD (n = 13), IPD (n = 39)	3,96	0,14
Complicações Motoras		
Congelamento da Marcha		
GBA-PD (n = 18), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 62)	6,00	0,0498
GBA-PD vs. IPD	0,21	0,65
LRRK2-PD vs. GBA-PD + IPD	5,82	0,02
Discinesia		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 83)	1,05	0,59
Flutuações Motoras		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 59)	1,24	0,54
Complicações Não Motoras		
Declínio Cognitivo		
GBA-PD (n = 21), LRRK2-PD (n = 16), IPD (n = 82)	5,80	0,055
Alucinações		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 90)	4,77	0,09

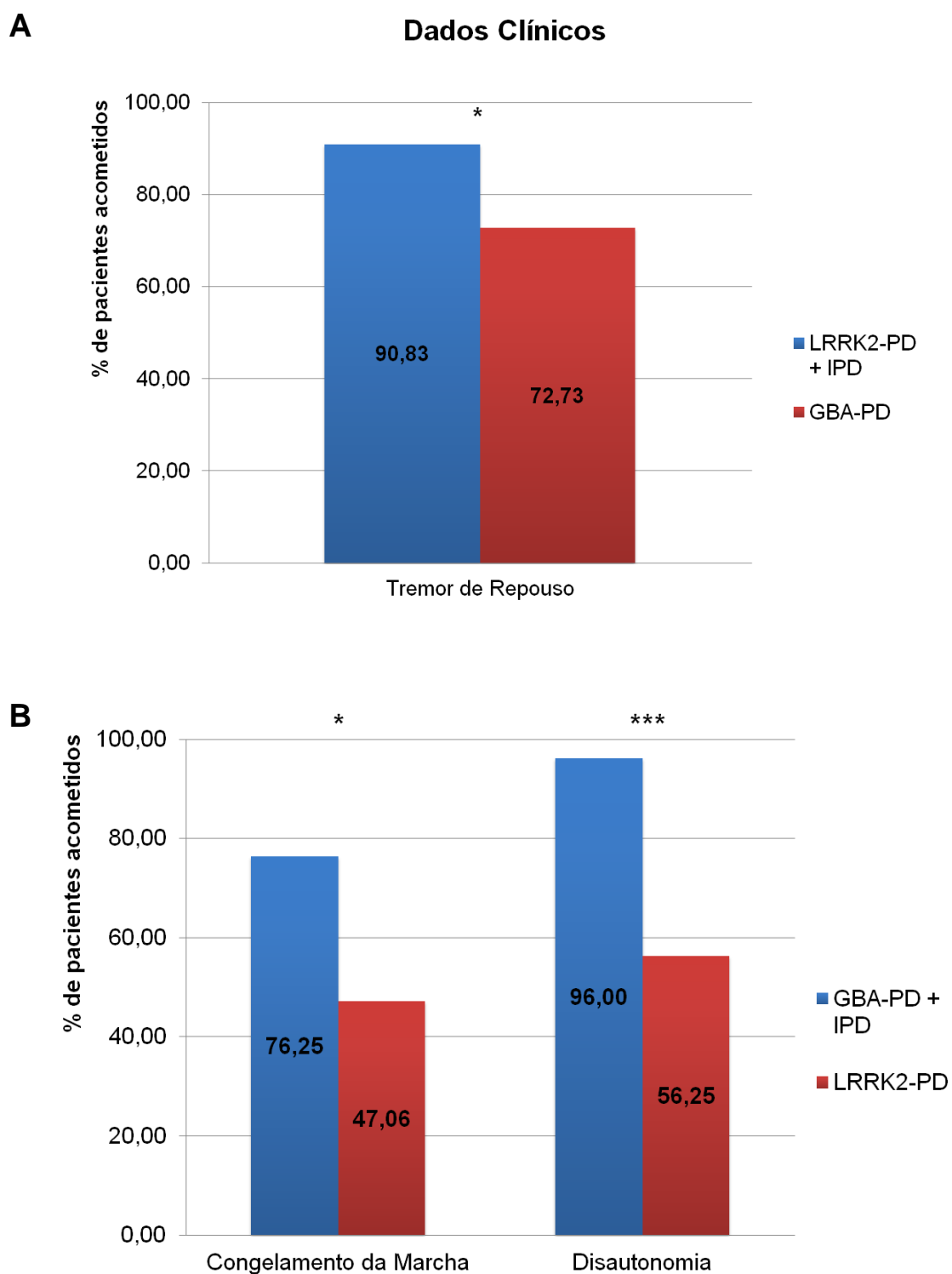
Continua

Tabela 12 – Resultados da análise estatística para a história familiar, distribuição de gênero e sintomas da DP para todos os grupos analisados (continuação)

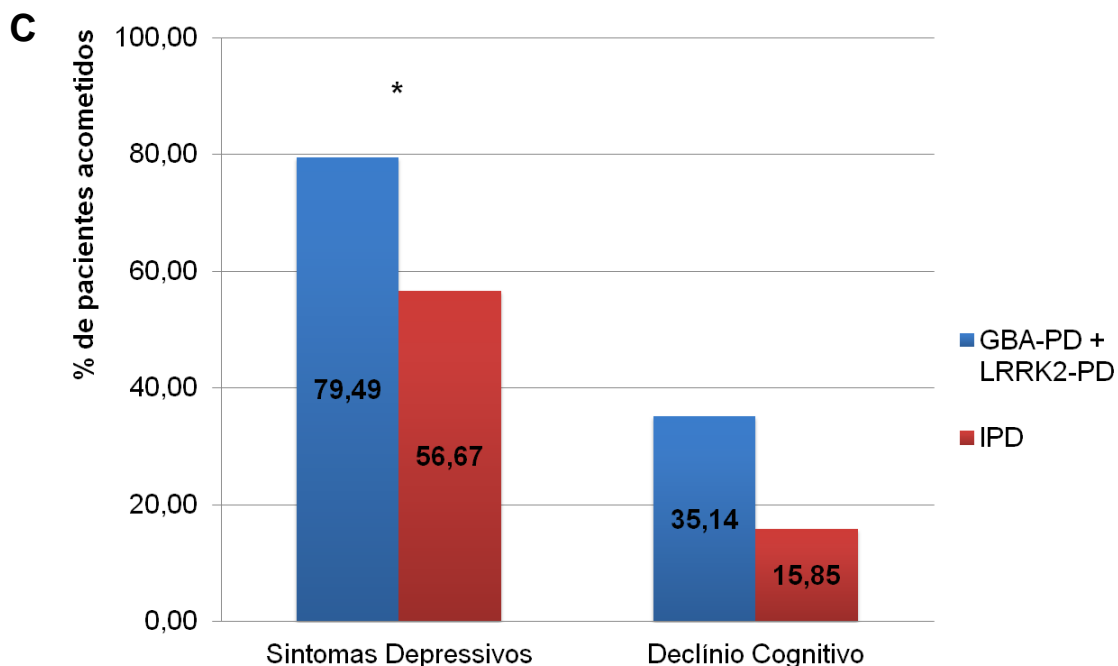
Qui-quadrado (χ^2)	χ^2	p^a
Sintomas Depressivos		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 90)	6,24	0,04
GBA-PD vs. LRRK2-PD	0,17	0,68
GBA-PD + LRRK2-PD vs. IPD	6,12	0,013
Alteração na Voz (hipofonia)		
GBA-PD (n = 21), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 63)	0,32	0,85
Alteração de Sono		
GBA-PD (n = 21), LRRK2-PD (n = 17), IPD (n = 82)	4,15	0,13
Disautonomia		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 16), IPD (n = 78)	26,24	< 0,0001
GBA-PD vs. IPD	1,90	0,17
LRRK2-PD vs. GBA-PD + IPD	25,39	< 0,0001
Resposta ao levodopa		
GBA-PD (n = 22), LRRK2-PD (n = 16), IPD (n = 91)	3,56	0,17

Legenda: IPD: grupo de pacientes com doença de Parkinson idiopática; LRRK2-PD: portadores da mutação LRRK2 G2019S GBA-PD: portadores de mutações no gene *GBA*. ^a: A diferença é considerada significativa quando $p < 0,05$. ^b: Para tremor vs. todos os outros sintomas iniciais.

Figura 13 – Gráfico dos dados clínicos nos grupos analisados



Continua



Legenda: (A) Porcentagem de pacientes que desenvolveram tremor de repouso nos grupos LRRK2-PD + IPD e GBA-PD. (B) Congelamento da marcha e disautonomia nos grupos GBA-PD + IPD e LRRK2-PD, em porcentagem de probandos acometidos. (C) Proporção de indivíduos que manifestaram sintomas depressivos e declínio cognitivo nos grupos de portadores e não portadores. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Esse trabalho deu origem ao manuscrito intitulado “*Clinical profiles associated with LRRK2 and GBA mutations in Brazilians with Parkinson’s disease*”, publicado no periódico *Journal of the Neurological Sciences* (Anexo C).

4 DISCUSSÃO

Apesar da abordagem retrospectiva utilizada na presente pesquisa, o desenho amostral aqui apresentado contou com grupos de tamanhos pequenos. No entanto, dados da literatura revelam uma escassez de trabalhos realizados em grandes coortes, como mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 – Tamanho amostral de estudos de comparação de dados clínicos entre portadores de mutações nos genes *LRRK2* (G2019S) ou *GBA* e não portadores

Estudo	População	Tamanho amostral		
		GBA-PD	LRRK2-PD	IPD
Aharon-Peretz <i>et al.</i> , 2005	Judeus Ashkenazi	40	-	108
Clark <i>et al.</i> , 2007	Judeus e não judeus do GEPD	38	-	155
Gan-Or <i>et al.</i> , 2008	Judeus Ashkenazi	71	56	280
Neumann <i>et al.</i> , 2009	Grã-Bretanha	31	-	790
Belarbi <i>et al.</i> , 2010	Argélia	-	23	48
Mao <i>et al.</i> , 2010	China	20	-	596
Brockmann <i>et al.</i> , 2011	Alemanha	20	-	20
Huang <i>et al.</i> , 2011	Taiwan	31	-	59
Lesage <i>et al.</i> , 2011a	Europa	100	-	1291
Marras <i>et al.</i> , 2011	Canadá, Brasil, Alemanha, EUA.	-	25	84
Alcalay <i>et al.</i> , 2013	Judeus Ashkenazi	-	97	391
Kumar <i>et al.</i> , 2013	Sérvia	21	-	339
Mirelman <i>et al.</i> , 2013	Judeus Ashkenazi	-	50	50
Li <i>et al.</i> , 2014	Japão	34	-	113
Pulkes <i>et al.</i> , 2014	Tailândia	17	-	191
Wang <i>et al.</i> , 2014	China	49	223 (não G2019S)	1366
Alcalay <i>et al.</i> , 2015	Judeus Ashkenazi	-	116	120
Gan-Or <i>et al.</i> , 2015	Judeus Ashkenazi	166 (mutações severas), 162 (mutações brandas)	-	-
Kresojevic <i>et al.</i> , 2015	Sérvia	39	-	539
Somme <i>et al.</i> , 2015	Espanha	-	27	27
Srivatsal <i>et al.</i> , 2015	PDCGC	-	29	1326
Swan <i>et al.</i> , 2016	Judeus Ashkenazi	31	-	55
Presente estudo	Brasil	22	17	93

Legenda: GBA-PD: portadores de mutações no *GBA*; LRRK2-PD: portadores de mutações no *LRRK2*; IPD: pacientes com DP idiopática; GEPD: Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease study; PDCGC: PD Cognitive Genetics Consortium.

Como demonstrado na Tabela 8, as diferenças entre os três grupos de pacientes com DP analisados não atingiram significância em relação à proporção de homens e mulheres, à resposta ao tratamento com levodopa e à presença de alguns sintomas, como rigidez, instabilidade postural, distúrbios do olfato; de algumas complicações motoras, como discinesia, flutuação motora; e de algumas complicações não motoras, como alucinações e alteração na voz e de sono. Esses achados estão de acordo com resultados encontrados em outros estudos conduzidos em amostras maiores de pacientes da Europa, China, América do Norte e do Sul (Lesage *et al.*, 2011a; Marras *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Lesage e colaboradores (2011a) identificou semelhança em uma ampla amostra de pacientes da Europa, constituída de 100 probandos com mutações no *GBA* e 1.291 não portadores, em relação a alguns dados como a distribuição de gênero, a melhora com o tratamento e a presença de rigidez. Além disso, diferenças significativas não foram identificadas na proporção de homens e mulheres, na resposta ao levodopa e na presença de instabilidade postural, discinesia e flutuação motora em uma pesquisa conduzida com indivíduos canadenses, americanos, brasileiros e alemães, sendo 25 portadores da variante LRRK2 G2019S e 84 probandos sem a mutação (Marras *et al.*, 2011). Ainda, a porcentagem de homens, a resposta ao levodopa e a presença de rigidez matinal, instabilidade postural, discinesia e flutuação motora foram observadas de forma semelhante em 49 portadores da mutação *GBA* L444P e em 1.366 pacientes com DP idiopática, provenientes da população chinesa (Wang *et al.*, 2014).

No presente estudo, observamos diferenças significativas entre os grupos *GBA*-PD, LRRK2-PD e IPD na idade de manifestação, na história familiar e na presença de tremor de repouso, sintomas depressivos, congelamento da marcha e disautonomia (Tabelas 8 e 9).

Verificamos que o sinal clínico inicial da DP em nossa amostra ocorreu, em média, mais precocemente em portadores de variantes no *GBA* do que em probandos IPD, particularmente para as mutações que mostram um efeito severo na atividade da glicocerebrosidase. Esses achados foram similares aos encontrados por Gan-Or e colaboradores (2008) em pacientes de ascendência judaica Ashkenazi com DP. Eles relataram que a idade de manifestação média foi significativamente mais precoce em 71 portadores de mutações no *GBA* do que em 283 não portadores. Além disso, Gan-Or e colaboradores (2008) observaram uma idade de

início dos sintomas motores cinco anos menor entre os 22 probandos portando mutações severas, quando comparados aos 279 não portadores.

Em uma meta-análise, agrupando dados de idade de manifestação de portadores de mutações severas e brandas no *GBA* de mais de 11.000 indivíduos com DP de diversas populações (América do Norte, Central e do Sul, Europa, Ásia, norte da África e judeus Ashkenazi), Gan-Or e colaboradores (2015) demonstraram que mutações heterozigotas severas e brandas no *GBA* afetam diferentemente a idade de manifestação da DP, sendo a média de idades mais precoce observada entre os pacientes com mutações severas. Ainda, a comparação de nossas observações no grupo *GBA*-PD com estudos em outras populações reforçam que mutações no *GBA* estão relacionadas com uma idade de manifestação média da doença mais precoce (Neumann *et al.*, 2009; Pulkes *et al.*, 2014; Sidransky *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2015).

Assim como no grupo *GBA*-PD, podemos observar que os portadores da variante LRRK2 G2019S também tenderam a desenvolver os primeiros sintomas em uma idade mais precoce do que os pacientes com IPD. Existe uma discordância na literatura em relação a esse dado. De acordo com Gan-Or e colaboradores (2008), a análise realizada em uma amostra de pacientes judeus Ashkenazi de Israel revelou uma idade de início da doença significativamente mais jovem no grupo de 56 portadores da mutação LRRK2 G2019S comparados a 283 não portadores. No entanto, esse traço não foi detectado em 97 judeus Ashkenazi com a variante LRRK2 G2019S em comparação a 391 pacientes com DP dos EUA e Israel (Alcalay *et al.*, 2013) e também em 25 portadores da mutação LRRK2 G2019S (incluindo 9 canadenses, 6 brasileiros, 3 alemães e 7 dos EUA), quando comparados a 84 probandos sem a mutação (Marras *et al.*, 2011).

Em relação aos dados clínicos, verificou-se que os portadores de mutações no *GBA* apresentaram um fenótipo caracterizado por uma menor frequência na presença de tremor em repouso em relação aos pacientes dos grupos LRRK2-PD e IPD. Embora essas observações corroborem os resultados de um estudo multicêntrico desenvolvido em indivíduos com DP da América do Norte e do Sul, Ásia, Israel e Europa (Sidransky *et al.*, 2009), elas contrastam com achados em outras populações, nas quais diferenças significativas nas frequências de tremor de repouso entre grupos de portadores de alterações no *GBA* e probandos sem mutações não foram identificadas em pacientes judeus Ashkenazi, europeus,

tailandeses e sérvios (Gan-Or *et al.*, 2008; Lesage *et al.*, 2011a; Pulkes *et al.*, 2014; Kresojevic *et al.*, 2015).

Além disso, os portadores da mutação LRRK2 G2019S exibiram um fenótipo caracterizado por uma frequência reduzida na presença de congelamento da marcha e disautonomia em relação a pacientes GBA-PD e IPD. Entretanto, distúrbio da marcha foi mais frequentemente encontrado em 25 pacientes com a variante G2019S do que entre 84 probandos com DP idiopática em uma pesquisa conduzida em indivíduos canadenses, americanos, brasileiros e alemães (Marras *et al.*, 2011). Ademais, dentre 100 pacientes com DP de origem judaica Ashkenazi, sendo 50 portadores e 50 não portadores, a mutação G2019S se mostrou aparentemente associada a um aumento na variabilidade da marcha (Mirelman *et al.*, 2013).

Em nossa amostra, portadores de mutações no *GBA* e no *LRRK2* apresentaram uma incidência significativamente mais alta de sintomas depressivos do que pacientes com IPD. Tal traço foi encontrado em 82% dos casos com a variante LRRK2 G2019S, em 76% de portadores de alterações no *GBA* e em 57% de não portadores (Tabela 8). A pesquisa conduzida em uma amostra de pacientes da Argélia (Belarbi *et al.*, 2010), sendo 23 indivíduos com a mutação LRRK2 G2019S e 48 não portadores, identificou mais alterações comportamentais, principalmente depressão e alucinações, nos portadores da variante G2019S do que em pacientes sem mutações. Também foi observada uma maior incidência de depressão em uma amostra composta por 31 judeus Ashkenazi com mutações no *GBA* (sendo 24 probandos com N370S, 2 com 84GG, 2 com R496H e 1 com L444P em heterozigose e 2 com N370S/84GG ou N370S/RecNc1l em heterozigose composta), quando comparada a 55 pacientes com DP idiopática (Swan *et al.*, 2016). Além disso, um estudo realizado em 20 pacientes com DP de origem alemã, heterozigotos para *GBA* L444P (14 probandos) ou N370S (6 probandos), e 20 não portadores encontrou uma maior proporção de distúrbios psiquiátricos no grupo com mutações no *GBA*, incluindo depressão, desordem de ansiedade e apatia (Brockmann *et al.*, 2011).

Embora dados da literatura suportem uma associação entre a presença de mutações no *GBA* e o desenvolvimento de distúrbios cognitivos em pacientes com DP (Sidransky *et al.*, 2009; Brockmann *et al.*, 2011), além de um risco reduzido para alterações cognitivas em portadores de mutações no *LRRK2* quando comparados a pacientes com DP idiopática (Alcalay *et al.*, 2015; Somme *et al.*, 2015; Srivatsal *et*

al., 2015), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de portadores e não portadores em relação a essa característica. No entanto, a diferença nas frequências de declínio cognitivo entre os grupos aqui analisados apresentou um valor de p na borda de significância. Isso pode ter ocorrido devido aos pequenos tamanhos amostrais de portadores de mutações nos genes *GBA* e *LRRK2*, que podem não ter sido suficientes para demonstrar essa correlação.

Sendo assim, os nossos resultados e de outros estudos sugerem que mutações nos genes *GBA* e *LRRK2* influenciam os sinais clínicos da doença de Parkinson, com significantes implicações para o cuidado de grupos específicos de pacientes. Similaridades nos fenótipos da DP entre grupos com genótipos semelhantes podem beneficiar a classificação de perfis clínicos de acordo com características genéticas. Apesar do pequeno tamanho amostral do presente estudo, espera-se que o estabelecimento de subtipos clínicos da DP diferentemente modificados por mutações no *GBA* e no *LRRK2* abra perspectivas em relação a condutas terapêuticas direcionadas.

CONCLUSÃO

a) Em casuística brasileira, a comparação dos dados clínicos e demográficos de 22 probandos com alterações no gene *GBA*, 17 pacientes com a mutação *LRRK2 G2019S* e 93 não portadores de mutações mostrou diferenças significativas entre os grupos em relação à idade de manifestação, história familiar da doença e presença de tremor de repouso, sintomas depressivos, congelamento da marcha e disautonomia;

b) As idades de manifestação dos grupos *GBA-DP* e *LRRK2-DP* resultaram em uma média menor que a média das idades no grupo *IPD*, sugerindo que a presença de mutações nos genes *GBA* e *LRRK2* pode antecipar o início dos sinais clínicos da *DP*. No gene *GBA*, os pacientes com mutações severas apresentaram uma idade de manifestação média distinta dos probandos com *DP* idiopática, indicando que o tipo de mutação nesse gene pode influenciar diferentemente a idade de início da doença;

c) No grupo *GBA-PD*, tremor de repouso esteve presente em frequência menor do que nos demais grupos. Já no *LRRK2-PD*, os pacientes desenvolveram um fenótipo caracterizado por uma menor incidência de complicações, como congelamento da marcha e disautonomia, quando comparados aos outros grupos. Além disso, verificou-se uma maior proporção de sintomas depressivos em ambos os grupos com mutações em comparação aos probandos com *DP* idiopática. Essas observações corroboram a hipótese de que a apresentação clínica da doença pode ser modificada por mutações nesses genes;

d) Os dados clínicos dos indivíduos com mutações nos genes *LRRK2* e *GBA* comparados com não portadores revelam diferenças na evolução da doença e dão suporte à existência de diferentes subtipos genéticos. Similaridades nos fenótipos da *DP* entre grupos com genótipos semelhantes podem beneficiar a classificação de perfis clínicos de acordo com as características genéticas, com importantes implicações no acompanhamento de grupos específicos de

pacientes, na predição do diagnóstico e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas.

REFERÊNCIAS

- AASLY JO, TOFT M, FERNANDEZ-MATA I, *et al.* Clinical features of LRRK2-associated Parkinson's disease in Central Norway. *Ann Neurol* 2005; 57 (5): 762–765.
- ABBOTT RD, PETROVITCH H, WHITE LR, *et al.* Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001; 57 (3): 456–462.
- ABBOTT RD, ROSS GW, WHITE LR, *et al.* Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology* 2005; 65 (9): 1442–1446.
- ABDALLA-CARVALHO CB, SANTOS-REBOUÇAS CB, GUIMARÃES BC, *et al.* Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2010; 17: 1479–1481.
- ABREU GM. *Investigação de variantes exônicas nos genes VPS35, EIF4G1 e LRRK2 como causa da doença de Parkinson em casuística brasileira.* 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- ABREU GM, VALENÇA DCT, CAMPOS JÚNIOR M, *et al.* Autosomal dominant Parkinson's disease: Incidence of mutations in *LRRK2*, *SNCA*, *VPS35* and *GBA* genes in Brazil. *Neurosci Lett* 2016; 635: 67–70.
- AHARON-PERETZ J, ROSENBAUM H, GERSHONI-BARUCH R. Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004; 351 (19): 1972–1977.
- AHARON-PERETZ J, BADARNY S, ROSENBAUM H, *et al.* Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene and Parkinson disease: Phenotype-genotype correlation. *Neurology* 2005; 65 (9): 1460–1461.
- ALCALAY RN, CACCAPPOLO E, MEJIA-SANTANA H, *et al.* Cognitive performance of *GBA* mutation carriers with early-onset PD - The CORE-PD study. *Neurology* 2012; 78 (18): 1434–1440.
- ALCALAY RN, MIRELMAN A, SAUNDERS-PULLMAN R, *et al.* Parkinson disease phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord* 2013; 28 (14): 1–12.
- ALCALAY RN, MEJIA-SANTANA H, MIRELMAN A, *et al.* Neuropsychological performance in LRRK2 G2019S carriers with Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 2015; 21 (2): 106–110.
- ANGELI A, MENCACCI NE, DURAN R, *et al.* Genotype and phenotype in Parkinson's disease: Lessons in heterogeneity from deep brain stimulation. *Mov Disord* 2013; 28 (10): 1370–1375.

AQUINO CC, FOX SH. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *Mov Disord* 2015; 30 (1): 80–89.

ASSELTA R, RIMOLDI V, SIRI C, *et al.* *Glucocerebrosidase* mutations in primary parkinsonism. *Park Relat Disord* 2014; 20 (11): 1215–1220.

BALDERESCHI M, DI CARLO A, ROCCA WA, *et al.* Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. *Neurology* 2000; 55 (9): 1358–63.

BANDRÉS-CIGA S, MENCACCI NE, DURÁN R, *et al.* Analysis of the genetic variability in Parkinson's disease from Southern Spain. *Neurobiol. Aging* 2015; 37: 210.e1–210.e5.

BARDIEN S, MARSBERG A, KEYSER R, *et al.* LRRK2 G2019S mutation: Frequency and haplotype data in South African Parkinson's disease patients. *J Neural Transm* 2010; 117 (7): 847–853.

BEKRIS LM, MATA IF, ZABETIAN CP. The genetics of Parkinson's Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23 (4): 228–242.

BELARBI S, HECHAM N, LESAGE S, *et al.* LRRK2 G2019S mutation in Parkinson's disease: A neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Algerian cohort. *Park Relat Disord* 2010; 16 (10): 676–679.

BELLUZZI E, GONNELLI A, CIRNARU M-D, *et al.* LRRK2 phosphorylates pre-synaptic N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) protein enhancing its ATPase activity and SNARE complex disassembling rate. *Mol Neurodegener* 2016; 11: 1.

BERWICK DC, HARVEY K. LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (22): 4966–4979.

BEUTLER E. Gaucher disease : New molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* 1992; 256 (5058): 794–799.

BEUTLER E, GELBART T, SCOTT CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35 (3): 355–364.

BONIFATI V, RIZZU P, SQUITIERI F, *et al.* *DJ-1* (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 2003; 24 (3): 159–160.

BONIFATI V. Genetics of Parkinson's disease - state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20S1: S23–S28.

BOZI M, PAPADIMITRIOU D, ANTONELLOU R, *et al.* Genetic assessment of familial and early-onset Parkinson's disease in a Greek population. *Eur J Neurol* 2014; 21 (7): 963–968.

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

BRAAK H, RÜB U, GAI WP, *et al.* Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 2003; 110 (5): 517–536.

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RÜB U, *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318 (1): 121–134.

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* 2006; 21 (12): 2042–2051.

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

BRAS J, PAISAN-RUIZ C, GUERREIRO R, *et al.* Complete screening for *Glucocerebrosidase* mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiol Aging* 2009; 30 (9): 1515–1517.

BROCKMANN K, SRULIJES K, HAUSER AK, *et al.* *GBA*-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology* 2011; 77 (3): 276–280.

CHARTIER-HARLIN M-C, DACHSEL JC, VILARIÑO-GÜELL C, *et al.* Translation initiator *EIF4G1* mutations in familial parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89 (3): 398–406.

CHAUDHURI KR, SCHAPIRA AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 2009; 8 (5): 464–474.

CHIEN HF, FIGUEIREDO TR, HOLLAENDER MA, *et al.* Frequency of the *LRRK2* G2019S mutation in late-onset sporadic patients with Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2014; 72 (5): 356–359.

CHOI JM, KIM WC, LYOO CH, *et al.* Association of mutations in the *Glucocerebrosidase* gene with Parkinson disease in a Korean population. *Neurosci Lett* 2012; 514 (1): 12–15.

CILIA R, SIRONI F, AKPALU A, *et al.* Screening *LRRK2* gene mutations in patients with Parkinson's disease in Ghana. *J Neurol* 2012; 259 (3): 569–570.

CILIA R, SIRI C, RUSCONI D, *et al.* *LRRK2* mutations in Parkinson's disease: Confirmation of a gender effect in the Italian population. *Park Relat Disord* 2014; 20 (8): 911–914.

CLARK LN, ROSS BM, WANG Y, *et al.* Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69 (12): 1270–1277.

CONNOLLY BS, LANG AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 2014; 311 (16): 1670–1683.

COOKSON MR. Cellular effects of *LRRK2* mutations. *Biochem Soc Trans* 2012; 40 (5): 1070–1073.

CORTI O, LESAGE S, BRICE A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; 91 (4): 1161–218.

COSTA J, LUNET N, SANTOS C, *et al.* Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Alzheimer's Dis* 2010; 20 (Suppl 1): S221–S238.

DE LAU LML, BRETELER MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5 (6): 525–535.

DE MARCO EV, ANNESI G, TARANTINO P, *et al.* *Glucocerebrosidase* gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. *Mov Disord* 2008; 23 (3): 460–463.

DE RIJK MC, LAUNER LJ, BERGER K, *et al.* Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54 (11 Suppl 5): S21–S23.

DELAMARRE A, MEISSNER WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Press Med* 2017; 46 (2 Pt 1): 175–181.

DENG H, LE W, GUO Y, *et al.* Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with *LRRK2* G2019S mutation. *Ann Neurol* 2005; 57 (6): 933–934.

DOS SANTOS AV, PESTANA CP, DINIZ KRS, *et al.* Mutational analysis of *GIGYF2*, *ATP13A2* and *GBA* genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010; 485 (2): 121–124.

DUQUE AF, LOPEZ JC, BENITEZ B, *et al.* Analysis of the *LRRK2* p.G2019S mutation in Colombian Parkinson's disease Patients. *Colomb Med* 2015; 46 (3): 117–121.

DVIR H, HAREL M, MCCARTHY AA, *et al.* X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 2003; 4 (7): 704–709.

EBLAN MJ, NGUYEN J, ZIEGLER SG, *et al.* *Glucocerebrosidase* mutations are also found in subjects with early-onset parkinsonism from Venezuela. *Mov Disord* 2006; 21 (2): 282–283.

EMEL'YANOV A, BOUKINA T, YAKIMOVSKII A, *et al.* *Glucocerebrosidase* gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia. *Mov Disord* 2012; 27 (1): 158–159.

FEARNLEY JM, LEES AJ. Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114 (Pt 5): 2283–2301.

FERREIRA JJ, GUEDES LC, ROSA MM, *et al.* High prevalence of *LRRK2* mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal. *Mov Disord* 2007; 22 (8): 1194–1201.

FOLTYNIE T, BRAYNE C, BARKER RA. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 2002; 249 (2): 138–145.

FUNAYAMA M, OHE K, AMO T, *et al.* *CHCHD2* mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: A genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 2015; 14 (3): 274–282.

FUNG H-C, CHEN C-M, HARDY J, *et al.* Lack of G2019S *LRRK2* mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21 (6): 880–883.

GAIG C, EZQUERRA M, MARTI MJ, *et al.* *LRRK2* mutations in Spanish patients with Parkinson disease: Frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol* 2006; 63 (3): 377–382.

GAN-OR Z, GILADI N, ROZOVSKI U, *et al.* Genotype-phenotype correlations between *GBA* mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology* 2008; 70 (24): 2277–2283.

GAN-OR Z, BAR-SHIRA A, MIRELMAN A, *et al.* *LRRK2* and *GBA* mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease. *Neurogenetics* 2010; 11 (1): 121–125.

GAN-OR Z, AMSHALOM I, KILARSKI LL, *et al.* Differential effects of severe vs mild *GBA* mutations on Parkinson disease. *Neurology* 2015; 84 (9): 880–887.

GARDET A, BENITA Y, LI C, *et al.* *LRRK2* is involved in the IFN- γ response and host response to pathogens. *J Immunol* 2010; 185 (9): 5577–5585.

GATTO EM, PARISI V, CONVERSO DP, *et al.* The *LRRK2* G2019S mutation in a series of Argentinean patients with Parkinson's disease: Clinical and demographic characteristics. *Neurosci Lett* 2013; 537: 1–5.

GEHRKE S, IMAI Y, SOKOL N, *et al.* Pathogenic *LRRK2* negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 2010; 466 (7306): 637–641.

GILADI N, MIRELMAN A, THALER A, *et al.* A personalized approach to Parkinson's disease patients based on founder mutation analysis. *Front Neurol* 2016; 7: 71.

GILKS WP, ABOU-SLEIMAN PM, GANDHI S, *et al.* A common *LRRK2* mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365 (9457): 415–416.

GIOLO SR, SOLER JMP, GREENWAY SC, *et al.* Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2012; 20 (1): 111–116.

GOEDERT M, SPILLANTINI MG, DEL TREDICI K, *et al.* 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013; 9 (1): 13–24.

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. *Park Relat Disord* 2006; 12 (7): 410–419.

GUIMARÃES BC, PEREIRA ACV, RODRIGUES FC, *et al.* Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients. *Park Relat Disord* 2012; 18 (5): 688–689.

HALLIDAY G, LEES A, STERN M. Milestones in Parkinson's disease-clinical and pathologic features. *Mov Disord* 2011; 26 (6): 1015–1021.

HAN F, GRIMES DA, LI F, *et al.* Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada. *Int J Neurosci* 2016; 126 (5): 415–421.

HASHAD DI, ABOU-ZEID AA, ACHMAWY GA, *et al.* G2019S Mutation of the *Leucine-Rich repeat Kinase 2* gene in a cohort of Egyptian patients with Parkinson's disease. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15 (12): 861–866.

HEALY DG, FALCHI M, O'SULLIVAN SS, *et al.* Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; 7 (7): 583–590.

HENCHCLIFFE C, SEVERT WL. Disease modification in Parkinson's disease. *Drugs Aging* 2011; 28 (8): 605–615.

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* 2002; 52 (3): 276–284.

HIGASHI S, BISKUP S, WEST AB, *et al.* Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Res* 2007; 1155: 208–219.

HOROWITZ M, WILDER S, HOROWITZ Z, *et al.* The human *Glucocerebrosidase* gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics* 1989; 4 (1): 87–96.

HRUSKA KS, LAMARCA ME, SCOTT CR, *et al.* Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the *glucocerebrosidase* gene (*GBA*). *Hum Mutat* 2008; 29 (5): 567–583.

- HUANG CL, WU-CHOU YH, LAI SC, *et al.* Contribution of *Glucocerebrosidase* mutation in a large cohort of sporadic Parkinson's disease in Taiwan. *Eur J Neurol* 2011; 18 (10): 1227–1232.
- HUANG Y, HALLIDAY GM, VANDEBONA H, *et al.* Prevalence and clinical features of common *LRRK2* mutations in Australians with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22 (7): 982–989.
- HUGHES AJ, DANIEL SE, KILFORD L, *et al.* Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55 (3): 181–184.
- INFANTE J, RODRÍGUEZ E, COMBARROS O, *et al.* *LRRK2* G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006; 395 (3): 224–226.
- ISLAM MS, MOORE DJ. Mechanisms of *LRRK2*-dependent neurodegeneration: role of enzymatic activity and protein aggregation. *Biochem Soc Trans* 2017; 45 (1): 163–172.
- JANKOVIC J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79 (4): 368–376.
- JENNINGS D, SIDEROWF A, STERN M, *et al.* Imaging prodromal Parkinson disease: The Parkinson associated risk syndrome study. *Neurology* 2014; 83 (19): 1739–1746.
- JOHNSON J, PAISÁN-RUIZ C, LOPEZ G, *et al.* Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for *LRRK2* mutation. *Neurodegener Dis* 2007; 4 (5): 386–391.
- KALINDERI K, BOSTANTJOPOULOU S, PAISAN-RUIZ C, *et al.* Complete screening for *Glucocerebrosidase* mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett* 2009; 452 (2): 87–89.
- KAWAKAMI F, YABATA T, OHTA E, *et al.* *LRRK2* phosphorylates tubulin-associated tau but not the free molecule: *LRRK2*-mediated regulation of the tau-tubulin association and neurite outgrowth. *PLoS One* 2012; 7 (1): 1–9.
- KAY DM, ZABETIAN CP, FACTOR SA, *et al.* Parkinson's disease and *LRRK2*: Frequency of a common mutation in U.S. movement disorder clinics. *Mov Disord* 2006; 21 (4): 519–523.
- KILARSKI LL, PEARSON JP, NEWSWAY V, *et al.* Systematic Review and UK-Based Study of *PARK2* (*parkin*), *PINK1*, *PARK7* (*DJ-1*) and *LRRK2* in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (12): 1522–1529.
- KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, *et al.* Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676): 605–608.

KOPRIVICA V, STONE DL, PARK JK, *et al.* Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (6): 1777–1786.

KRESOJEVIĆ N, JANKOVIĆ M, PETROVIĆ I, *et al.* Presenting symptoms of GBA-related Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 2015; 21 (7): 804–807.

KRUMOVA P, REYNIERS L, MEYER M, *et al.* Chemical genetic approach identifies microtubule affinity-regulating kinase 1 as a *Leucine-Rich repeat Kinase 2* substrate. *FASEB J* 2015; 29 (7): 2980–2992.

KUMAR KR, LOHMANN K, KLEIN C. Genetics of Parkinson disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol* 2012; 25 (4): 466–474.

KUMAR KR, RAMIREZ A, GÖBEL A, *et al.* *Glucocerebrosidase* mutations in a Serbian Parkinson's disease population. *Eur J Neurol* 2013; 20 (2): 402–405.

LANG AE, LOZANO AM. Parkinson's disease: Second of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339 (16): 1130–1143.

LAWTON M, BAIG F, ROLINSKI M, *et al.* Parkinson's disease subtypes in the Oxford Parkinson disease centre (OPDC) discovery cohort. *J Parkinsons Dis* 2015; 5 (2): 269–279.

LESAGE S, IBANEZ P, LOHMANN E, *et al.* G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 58 (5): 784–787.

LESAGE S, DÜRR A, TAZIR M, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006; 354 (4): 422–423.

LESAGE S, ANHEIM M, CONDROYER C, *et al.* Large-scale screening of the Gaucher's disease-related *Glucocerebrosidase* gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2011; 20 (1): 202–210.

LESAGE S, CONDROYER C, HECHAM N, *et al.* Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene confer a risk for Parkinson disease in North Africa. *Neurology* 2011; 76 (3): 301–303.

LI Y, SEKINE T, FUNAYAMA M, *et al.* Clinicogenetic study of *GBA* mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35 (4): 935.e3-935.e8.

LITVAN I, BHATIA KP, BURN DJ, *et al.* SIC task force appraisal of clinical diagnostic criteria for parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003; 18 (5): 467–486.

LU C-S, SIMONS EJ, WU-CHOU Y-H, *et al.* The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 2005; 11 (8): 521–522.

LWIN A, ORVISKY E, GOKER-ALPAN O, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab* 2004; 81 (1): 70–73.

MA L-Y, CHAN P, GU Z-Q, *et al.* Heterogeneity among patients with Parkinson's disease: Cluster analysis and genetic association. *J Neurol Sci* 2015; 351 (1-2): 41–45.

MAO X-Y, BURGUNDER J-M, ZHANG Z-J, *et al.* Association between GBA L444P mutation and sporadic Parkinson's disease from Mainland China. *Neurosci Lett* 2010; 469 (2): 256–259.

MAREK KL, SEIBYL JP, ZOGHBI SS, *et al.* [sup 123 I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 46 (1): 231–237.

MARRAS C, SCHUELE B, MUNHOZ RP, *et al.* Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology* 2011; 77: 325–333.

MARTIN I, KIM JW, LEE BD, *et al.* Ribosomal protein s15 phosphorylation mediates LRRK2 neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 2014; 157 (2): 472–485.

MATA IF, KACHERGUS JM, TAYLOR JP, *et al.* LRRK2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2005; 6 (4): 171–177.

MATA IF, WEDEMEYER WJ, FARRER MJ, *et al.* LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006; 29 (5): 286–293.

MATA IF, ROSS OA, KACHERGUS J, *et al.* LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol* 2006; 13 (4): 391–394.

MATA IF, SAMII A, SCHNEER SH, *et al.* Glucocerebrosidase gene mutations: A risk factor for Lewy body disorders. *Arch Neurol* 2008; 65 (3): 379–382.

MATA IF, COSENTINO C, MARCA V, *et al.* LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease from Peru and Uruguay. *Park Relat Disord* 2009; 15 (5): 370–373.

MATTA S, VAN KOLEN K, DA CUNHA R, *et al.* LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron* 2012; 75 (6): 1008–1021.

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

MIRELMAN A, HEMAN T, YASINOVSKY K, *et al.* Fall risk and gait in Parkinson's disease: The role of the LRRK2 G2019S mutation. *Mov Disord* 2013; 28 (12): 1683–1690.

MITSUI J, MIZUTA I, TOYODA A, *et al.* Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009; 66 (5): 571–576.

- MORAITOU M, HADJIGEORGIOU G, MONOPOLIS I, *et al.* β -Glucocerebrosidase gene mutations in two cohorts of Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Mol Genet Metab* 2011; 104 (1-2): 149–152.
- MÜLLER T. Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs* 2015; 75 (2): 157–174.
- NEUDORFER O, GILADI N, ELSTEIN D, *et al.* Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 1996; 89 (9): 691–694.
- NEUMANN J, BRAS J, DEAS E, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132 (7): 1783–1794.
- NICHOLS W, PANKRATZ N, HERNANDEZ D, *et al.* Genetic screening for a single common mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365 (9457): 410–412.
- NICHOLS WC, PANKRATZ N, MAREK DK, *et al.* Mutations in *GBA* are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 2009; 72 (4): 310–316.
- NOREAU A, RIVIÈRE J-B, DIAB S, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in a French-canadian Parkinson's disease cohort. *Can J Neurol Sci* 2011; 38 (5): 772–773.
- NOYCE AJ, LEES AJ, SCHRAG A-E. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87 (8): 871–878.
- O'MALLEY KL. The role of axonopathy in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2010; 19 (3): 115–119.
- OHTA E, KAWAKAMI F, KUBO M, *et al.* LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: Impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. *FEBS Lett* 2011; 585 (14): 2165–2170.
- OKUBADEJO N, BRITTON A, CREWS C, *et al.* Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in *LRRK2*, *PRKN* and *ATXN3*. *PLoS One* 2008; 3 (10): e3421.
- OLANOW CW, WATTS RL, KOLLER WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): Treatment guidelines. *Neurology* 2001; 56 (11 Suppl 5): S1-S88.
- OLANOW CW, AGID Y, MIZUNO Y, *et al.* Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: Current controversies. *Mov Disord* 2004; 19 (9): 997–1005.
- OZELIUS LJ, SENTHIL G, SAUNDERS-PULLMAN R, *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006; 354 (4): 424–425.

PAISÁN-RUIZ C, JAIN S, EVANS EW, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44 (4): 595–600.

PAISÁN-RUIZ C, LANG AE, KAWARAI T, *et al.* LRRK2 gene in Parkinson disease: Mutation analysis and case control association study. *Neurology* 2005; 65 (5): 696–700.

PEREZ-PASTENE C, COBB SA, DÍAZ-GREZ F, *et al.* LRRK2 mutations in South America: A study of Chilean Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2007; 422 (3): 193–197.

PETERSEN MS, GUELLA I, BECH S, *et al.* Parkinson's disease, genetic variability and the Faroe Islands. *Parkinsonism Relat Disord* 2015; 21 (1): 75–78.

PIMENTEL MMG, MOURA KCV, ABDALLA CB, *et al.* A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett* 2008; 433 (1): 17–21.

POEWE W, SEPPI K, TANNER CM, *et al.* Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim* 2017; 3: 17013.

POLYMEROPOULOS MH. Mutation in the *alpha-Synuclein* gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276 (5321): 2045–2047.

PULKES T, CHOUBTUM L, CHITPHUK S, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20 (9): 986–991.

ROSS GW, PETROVITCH H, ABBOTT RD, *et al.* Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 63 (2): 167–173.

SATO C, MORGAN A, LANG AE, *et al.* Analysis of the *Glucocerebrosidase* gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20 (3): 367–370.

SAUNDERS-PULLMAN R, MIRELMAN A, WANG C, *et al.* Olfactory identification in LRRK2 G2019S mutation carriers: a relevant marker? *Ann Clin Transl Neurol* 2014; 1 (9): 670–678.

SCHAPIRA AH. Treatment options in the modern management of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007; 64 (8): 1083–1088.

SCHAPIRA AHV. *Glucocerebrosidase* and Parkinson disease: Recent advances. *Mol Cell Neurosci* 2015; 66: 37–42.

SCHAPIRA A. Monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: a review of symptomatic and potential disease-modifying effects. *CNS Drugs* 2011; 25 (12): 1061–1071.

SCHULTE C, GASSER T. Genetic basis of Parkinson's disease: Inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet* 2011; 4: 67–80.

SELIKHOVA M, WILLIAMS DR, KEMPSTER PA, *et al.* A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132 (11): 2947–2957.

SHENG D, QU D, KEN HON HUNG KWOK, *et al.* Deletion of the WD40 domain of *LRRK2* in Zebrafish causes Parkinsonism-like loss of neurons and locomotive defect. *PLoS Genet* 2010; 6 (4): e1000914.

SHIBA M, BOWER JH, MARAGANORE DM, *et al.* Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 2000; 15 (4): 669–677.

SIDEROWF A, STERN MB. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease: Are we there yet? *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; 6 (4): 295–301.

SIDEROWF A, LANG AE. Premotor Parkinson's disease: Concepts and definitions. *Mov Disord* 2012; 27 (5): 608–616.

SIDRANSKY E. Gaucher disease: Complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab* 2004; 83 (1-2): 6–15.

SIDRANSKY E, NALLS MA, AASLY JO, *et al.* Multi-center analysis of *Glucocerebrosidase* mutations in Parkinson disease. *N Engl J Med* 2009; 361 (17): 1651–1661.

SIMÓN-SÁNCHEZ J, HERRANZ-PÉREZ V, OLUCHA-BORDONAU F, *et al.* *LRRK2* is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 2006; 23 (3): 659–666.

SINGH N, PILLAY V, CHOONARA YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2007; 81 (1): 29–44.

SOCAL MP, BOCK H, MICHELIN-TIRELLI K, *et al.* Parkinson's disease and the heterozygous state for *Glucocerebrosidase* mutations among Brazilians. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (1): 76–78.

SOMME JH, SALAZAR AM, GONZALEZ A, *et al.* Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the *LRRK2* gene. *Park Relat Disord* 2015; 21 (5): 494–499.

SPILLANTINI MG, SCHMIDT ML, LEE VM-Y, *et al.* Alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388 (6645): 839–840.

SPILLANTINI MG, CROWTHER RA, JAKES R, *et al.* Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (11): 6469–6473.

SPITZ M, PEREIRA JS, NICARETA DH, *et al.* Association of *LRRK2* and *GBA* mutations in a Brazilian family with Parkinson's disease. *Park Relat. Disord* 2015; 21 (7): 825–826.

- SPITZ M, ROZENBERG R, PEREIRA LV, *et al.* Association between Parkinson's disease and *Glucocerebrosidase* mutations in Brazil. *Park Relat Disord* 2008; 14 (1): 58–62.
- SRIVATSAL S, CHOLERTON B, LEVERENZ JB, *et al.* Cognitive Profile of LRRK2-related Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2015; 30 (5): 728–733.
- STEGER M, TONELLI F, ITO G, *et al.* Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife* 2016; 5: e12813.
- STERN MB. The Preclinical Detection of Parkinson's Disease: Ready for Prime Time? *Ann Neurol* 2004; 56 (2): 169–171.
- STERN MB, SIDEROWF A. Parkinson's at risk syndrome: Can Parkinson's disease be predicted? *Mov Disord* 2010; 25 (Suppl 1): S89–S93.
- STRAUSS KM, MARTINS LM, PLUN-FAVREAU H, *et al.* Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (15): 2099–2111.
- SUDHAMAN S, MUTHANE UB, BEHARI M, *et al.* Evidence of mutations in *RIC3* acetylcholine receptor chaperone as a novel cause of autosomal-dominant Parkinson's disease with non-motor phenotypes. *J Med Genet* 2016; 53 (8): 559–66.
- SUN Q-Y, GUO J-F, WANG L, *et al.* *Glucocerebrosidase* gene L444P mutation is a risk factor for Parkinson's disease in Chinese population. *Mov Disord* 2010; 25 (8): 1005–1011.
- SWAN M, SAUNDERS-PULLMAN R. The association between β -*Glucocerebrosidase* mutations and Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013; 13 (8): 368.
- SWAN M, DOAN N, ORTEGA RA, *et al.* Neuropsychiatric characteristics of GBA-associated Parkinson disease. *J Neurol Sci* 2016; 370: 63–69.
- TAN EK, SHEN H, TAN LCS, *et al.* The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2005; 384 (3): 327–329.
- TAN E-K, TONG J, FOOK-CHONG S, *et al.* *Glucocerebrosidase* mutations and risk of Parkinson disease in Chinese patients. *Arch Neurol* 2007; 64 (7): 1056–1058.
- TANNER CM, ROSS GW, JEWELL SA, *et al.* Occupation and risk of Parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol* 2009; 66 (9): 1106–1113.
- TARRANTS ML, DENARIÉ MF, CASTELLI-HALEY J, *et al.* Drug therapies for Parkinson's disease: A database analysis of patient compliance and persistence. *Am J Geriatr Pharmacother* 2010; 8 (4): 374–383.

TAYLOR KM, SAINT-HILAIRE M-H, SUDARSKY L, *et al.* Head injury at early ages is associated with risk of Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 2016; 23: 57–61.

THACKER EL, CHEN H, PATEL AV, *et al.* Recreational Physical Activity and Risk of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2008; 23 (1): 69–74.

TOFT M, PIELSTICKER L, ROSS OA, *et al.* *Glucocerebrosidase* gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology* 2006; 66 (3): 415–417.

TÖRÖK R, ZÁDORI D, TÖRÖK N, *et al.* An assessment of the frequency of mutations in the *GBA* and *VPS35* genes in Hungarian patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2016; 610: 135–138.

TSIKA E, MOORE DJ. Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; 12 (3): 251–260.

TSUI A, ISACSON O. Functions of the nigrostriatal dopaminergic synapse and the use of neurotransplantation in Parkinson's disease. *J Neurol* 2011; 258 (8): 1393–1405.

VALENTE EM, ABOU-SLEIMAN PM, CAPUTO V, *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* 2004; 304 (5674): 1158–1160.

VAN DEN EEDEN SK, TANNER CM, BERNSTEIN AL, *et al.* Incidence of Parkinson's disease: Variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157 (11): 1015–1022.

VAN ROODEN SM, HEISER WJ, KOK JN, *et al.* The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: A systematic review. *Mov Disord* 2010; 25 (8): 969–978.

VELAYATI A, YU WH, SIDRANSKY E. The role of *Glucocerebrosidase* mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010; 10 (3): 190–198.

VILARIÑO-GÜELL C, WIDER C, ROSS OA, *et al.* *VPS35* mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89 (1): 162–167.

WAN N, LIN G. Parkinson's disease and pesticides exposure: New findings from a comprehensive study in Nebraska, USA. *J Rural Heal* 2016; 32 (3): 303–313.

WANG Y, LIU L, XIONG J, *et al.* *Glucocerebrosidase* L444P mutation confers genetic risk for Parkinson's disease in central China. *Behav Brain Funct* 2012; 8: 57.

WANG C, CAI Y, GU Z, *et al.* Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common *Leucine-Rich repeat Kinase 2* and *Glucocerebrosidase* genetic variants in Chinese individuals. *Neurobiol Aging* 2014; 35 (3): 725.e1-725.e6.

WEST AB, MOORE DJ, BISKUP S, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in *Leucine-Rich repeat Kinase 2* augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (46): 16842–16847.

WEST AB, MOORE DJ, CHOI C, *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in *LRRK2* link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (2): 223–232.

WESTBROEK W, GUSTAFSON AM, SIDRANSKY E. Exploring the link between *Glucocerebrosidase* mutations and parkinsonism. *Trends Mol Med* 2011; 17 (9): 485–493.

WINFIELD SL, TAYEBI N, MARTIN BM, *et al.* Identification of three additional genes contiguous to the *Glucocerebrosidase* locus on chromosome 1q21 : Implications for Gaucher disease. *Genome Res* 1997; 7 (10): 1020–1026.

WU Y-R, CHEN C-M, CHAO C-Y, *et al.* *Glucocerebrosidase* gene mutation is a risk factor for early onset of Parkinson disease among Taiwanese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78 (9): 977–979.

WU-CHOU Y-H, CHEN Y-T, YE H T-H, *et al.* Genetic variants of *SNCA* and *LRRK2* genes are associated with sporadic PD susceptibility: A replication study in a Taiwanese cohort. *Park Relat Disord* 2013; 19 (2): 251–255.

YANG F, LAGERROS YT, BELLOCCO R, *et al.* Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain* 2015; 138 (Pt 2): 269–275.

YONOVA-DOING E, ATADZHANOV M, QUADRI M, *et al.* Analysis of *LRRK2*, *SNCA*, *Parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* in Zambian patients with Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 2012; 18 (5): 567–571.

YU Z, WANG T, XU J, *et al.* Mutations in the *Glucocerebrosidase* gene are responsible for Chinese patients with Parkinson's disease. *J Hum Genet* 2015; 60 (2): 85–90.

ZABETIAN CP, SAMII A, MOSLEY AD, *et al.* A clinic-based study of the *LRRK2* gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* 2005; 65 (5): 741–744.

ZABETIAN CP, MORINO H, UJIKE H, *et al.* Identification and haplotype analysis of *LRRK2* G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. *Neurology* 2006; 67 (4): 697–699.

ZHANG X, BAO Q-Q, ZHUANG X-S, *et al.* Association of common variants in the *Glucocerebrosidase* gene with high susceptibility to Parkinson's disease among Chinese. *Chin J Physiol* 2012; 55 (6): 398–404.

ZHANG L, QUADRI M, GUEDES LC, *et al.* Comprehensive *LRRK2* and *GBA* screening in Portuguese patients with Parkinson's disease: Identification of a new

family with the LRRK2 p.Arg1441His mutation and novel missense variants. *Park Relat Disord* 2013; 19 (10): 897–900.

ZIEGLER SG, EBLAN MJ, GUTTI U, *et al.* Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol Genet Metab* 2007; 91 (2): 195–200.

ZIMPRICH A, BISKUP S, LEITNER P, *et al.* Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44 (4): 601–607.

ZIMPRICH A, BENET-PAGÈS 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* 2011; 89 (1): 168–175.

ZORZON M, CAPUS L, PELLEGRINO A, *et al.* Familial and environmental risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in north-east Italy. *Acta Neurol Scand* 2002; 105: 77–82.

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
(Continuação)

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 – 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: coep@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
Maç 34509-0

ANEXO C – Manuscrito publicado no periódico Journal of the Neurological Sciences

Journal of the Neurological Sciences 381 (2017) 160–164



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

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

Clinical profiles associated with *LRRK2* and *GBA* mutations in Brazilians with Parkinson's disease



Camilla P. da Silva^{a,1}, Gabriella de M. Abreu^{b,1}, Pedro H. Cabello Acero^{b,c}, Mário Campos Júnior^b, João S. Pereira^d, Sarah R. de A. Ramos^a, Caroline M. Nascimento^a, Danielle D. Voigt^e, Ana Lucia Rosso^c, Marco A. Araujo Leite^f, Luiz Felipe R. Vasconcellos^{g,h}, Denise H. Nicarettaⁱ, Marcus V. Della Coletta^j, Delson José da Silva^{k,1}, Andressa P. Gonçalves^a, Jussara M. dos Santos^a, Veluma Calassara^l, Débora Cristina T. Valença^m, Cyro J. de M. Martins^m, Cíntia B. Santos-Rebouças^a, Márcia M.G. Pimentel^{1,*,*}

^a Department of Genetics, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Human Genetics Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratory of Genetics, School of Health Science, University of Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil

^d Movement Disorders Section, Neurology Service, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^e University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^f Movement Disorders Unit, Division of Neurology, Hospital Antônio Pedro, Fluminense Federal University, Brazil

^g Institute of Neurology Deolindo Couto, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^h Federal Hospital of Servidores do Estado, Rio de Janeiro, Brazil

ⁱ Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^j University Hospital Getúlio Vargas, Federal University of Amazonas, Amazonas, Brazil

^k Neuroscience Core, Hospital Clínicas, Federal University of Goiás, Brazil

^l Integrated Neurosciences Institute, Goiás, Brazil

^m Laboratory of Clinical and Experimental Pathophysiology (CLINEX), Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Parkinson's disease
Heterogeneity
Genotype
Phenotype
LRRK2
GBA

ABSTRACT

Background: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by remarkable phenotypic variability. Accumulated evidence points that the manifestation of PD clinical signs might be differentially modified by genetic factors, as mutations in *LRRK2* and *GBA* genes. In this sense, the clarification of the genotype-phenotype correlations in PD has important implications in predicting prognosis and can contribute to the development of specific therapeutic approaches.

Methods: Here, we conducted the first comparative analysis of motor and non-motor features in 17 *LRRK2* and 22 *GBA* mutation carriers and 93 non-carriers unrelated PD patients from Brazil, a highly admixed population.

Results: Significant differences were found between the three groups. *LRRK2* PD patients presented more occurrence of familiar history. Resting tremor was observed in a lower frequency in *GBA* mutation carriers. In contrast, gait freezing and dysautonomia was present in lower frequencies in *LRRK2* carriers. Besides that, *LRRK2* and *GBA* mutation carriers showed a higher incidence of depressive symptoms and a younger age at onset, when compared to non-carriers.

Conclusion: Our results suggest that specific mutations in *GBA* and *LRRK2* influence the clinical signs of the disease, with significant implications for handling of specific patient groups.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative condition whose clinical presentation shows a remarkable heterogeneity of age at

onset, rate of progression, severity of motor and non-motor symptoms, including development of neuropsychiatric symptoms and cognitive impairment [1,2]. Although it is believed that the basis underlying the phenotypic variability observed in PD arises from complex interactions

* Corresponding author at: Department of Genetics, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524, PHLC Sala 501F, 20550-013 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: pimentel@uerj.br (M.M.G. Pimentel).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3249>

Received 4 April 2017; Received in revised form 11 July 2017; Accepted 23 August 2017

Available online 24 August 2017

0022-510X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

between genetic and environmental risk factors, this subject is still poorly understood [3–5].

Among the several genes related to PD, causative mutations in *leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) and *glucocerebrosidase* (*GBA*) stand out as important PD causes worldwide [6,7], with frequencies differing according to different genetic backgrounds. Seven pathogenic mutations in the *LRRK2* are recognized causes of autosomal dominant PD [8] and *LRRK2* G2019S, the most known mutation, is found in both familial and sporadic PD cases across many ethnic groups. Heterozygous mutations in the *GBA* gene are also significant risk factors for PD [9,10], and the two most common mutations, L444P and N370S, account for 70% of all *GBA* mutant alleles in PD patients [11]. When inherited in homozygous or complex heterozygous state, *GBA* mutations are known to cause Gaucher disease (GD), a lysosomal storage disorder [12]. *GBA* mutations are categorized as mild and severe, accordingly with their different effects in GD [12,13]. Severe and null mutations are those usually associated with neuropathic (Type II or III) disease and mild mutations are those only associated with non-neuropathic (Type I) disease [12,13]. Besides that, mild mutations, such as N370S, produce a slightly diminished glucocerebrosidase activity; severe mutations, like L444P, result in a severely dysfunctional enzyme; and null mutations, such as IVS2 + 1G > A, cause no enzyme production by affecting a splice site [13,14].

Although straight comparisons of the clinical presentation of PD between groups of patients with specific genotypes are scarce [6,15,16], clinical features observed in patients with *LRRK2* or *GBA* mutations in comparison to non-carriers reveal diverse clinical course and phenotypes [17,18] (for review see [19]). This indicates that the manifestation of PD clinical signs might be differentially modified by *LRRK2* or *GBA* mutations [16], giving support to the existence of different genetic subtypes of the disease [6,20]. In this sense, the clarification of the genotype-phenotype correlations in PD has important implications in predicting prognosis and can contribute to the development of specific therapeutic approaches [19].

Although our experience from previous screenings conducted in Brazil points that *LRRK2* G2019S and *GBA* L444P and N370S mutations are the most common genetic causes associated to PD [21–25], no clinical correlation regarding *LRRK2* and *GBA* mutations and idiopathic PD (IPD) has been reported in populations with a high degree of miscegenation such as ours. In this study, we conducted a comparative analysis of the clinical phenotypes of PD associated to specific *LRRK2* (*LRRK2*-PD) and *GBA* (*GBA*-PD) mutations, and also in idiopathic PD probands (IPD) in a cohort of Brazilian patients.

2. Subjects and methods

We have evaluated motor and non-motor features in 131 unrelated Brazilian PD patients, consisting of: 16 individuals with the *LRRK2* G2019S mutation, 21 carrying mutation in *GBA* gene (12 L444P, 1 IVS2 + 1G > A and 8 N370S carriers), one with both *LRRK2* and *GBA* mutations (G2019S + L444P) and 93 mutation non-carriers (Table 1). In all 131 probands, exons 9 and 10 of *GBA* gene were screened for N370S and L444P variants, whereas exon 41 of *LRRK2* gene was accessed for G2019S mutation by using bidirectional Sanger sequencing. Some of these cases (10 *LRRK2* G2019S, 1 *LRRK2* G2019S and *GBA* L444P, 9 *GBA* L444P, 5 *GBA* N370S and 1 *GBA* IVS2 + 1G > A carriers) had already been reported by us and molecular analyses of *LRRK2* and *GBA* genes were conducted as previously described [21–26]. The screening of mutations in SNCA (A30P, E46K, H50Q, G51D and A53T) and VPS35 (D620N and R524W), conducted by TaqMan® allelic discrimination assays, excluded the presence of these variants in all PD patients.

All patients were examined by neurologists specialized on movement disorders and fulfilled the inclusion criteria established for the clinical diagnosis of PD, according to the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank [27]. The presence of motor and nonmotor symptoms were

observed during the anamneses and registered through a structured questionnaire. No clinical tools to evaluate and monitored the disease evolution, such as UPDRS, were used. Only non-Jewish ancestry PD patients with early and late onset ages were included. The research protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Rio de Janeiro. Written informed consent was obtained from all participants.

For the compilation of clinical and demographic data from the PD patients, we elaborated a survey form, contemplating the presence or absence of motor and non-motor symptoms and response to levodopa treatment, as well as, first symptom, age at onset and family history. Information of *GBA* and *LRRK2* mutation carriers and non-carriers were compared and the *p*-value is shown in Table 1. Differences among *GBA*-PD, *LRRK2*-PD and IPD groups concerning continuous variables (age at onset) were tested using one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's HSD post hoc test (Supplementary Table S1). Chi-square test was conducted for categorical variables (Supplementary Table S2). Odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (95% CI) were also calculated. Statistical significant difference was considered at $p < 0.05$. In order to decrease the chance of false negative results, we decided for not applying the adjustments for multiple testing since our sample size is limited by the number of patients with of *GBA* and *LRRK2* mutations. SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for data analysis.

3. Results

Analysis of variance demonstrated that the age at onset (AAO) differed among the three groups ($p = 0.004$; Table 1 and Supplementary Table S1). The Tukey's post hoc analysis between the mean of the AAO in both mutation carrier groups and non-carriers (47.82 ± 11.30 years in *GBA*-PD vs. 55.02 ± 12.36 years in IPD, $p = 0.03$; and 46.76 ± 9.14 in *LRRK2*-PD vs. 55.02 ± 12.36 years in IPD, $p = 0.03$; Supplementary Table S1). Besides, statistically difference was also identified for age at onset among *GBA* severe or null and mild effect mutations and IPD ($p = 0.04$; Supplementary Table S1). The post test analysis showed that the source of significance was between *GBA* severe effect mutation and IPD (46.36 ± 9.03 vs. 55.02 ± 12.36 years, $p = 0.04$; Supplementary Table S1), and not between *GBA* mild mutations and IPD (50.38 ± 14.82 vs. 55.02 ± 12.36 years, $p = 0.56$; Supplementary Table S1).

According to clinical assessments, the first motor symptom most frequently reported was resting tremor in all three groups (59.09% in *GBA*-PD, 52.94% in *LRRK2*-PD and 73.33% in IPD; Table 1), but no statistically significant difference was identified among them ($p = 0.15$; Table 1 and Supplementary Table S2). Regarding gender distribution, we did not observed any significant difference in mutation carriers when compared with IPD group ($p = 0.24$; Table 1 and Supplementary Table S2). In addition, *LRRK2* mutation carriers were more likely to report a family history of PD than *GBA* mutation carriers and non-carriers taken together (OR = 4.76, 95% CI 1.65–13.72; $p = 0.002$; Supplementary Table S2).

Comparison of clinical features revealed significant differences among the three groups concerning resting tremor, depressive symptoms, gait freezing and dysautonomia. On the other hand, no statistically significant differences were identified regarding rigidity, postural instability, hallucinations, voice alteration, dyskinesia, motor fluctuation, sleep and olfactory disturbances. Besides, the majority of the mutation carriers and non-carriers reported a favorable response to levodopa treatment with frequencies of 100% and 91%, respectively, and no significant differences were detected among them ($p = 0.17$; Table 1 and Supplementary Table S2).

In both *LRRK2*-PD and IPD groups taken together, higher frequencies occurred concerning resting tremor, differing significantly from *GBA* mutation carriers group (OR = 3.71, 95% CI 1.19–11.63; $p = 0.02$; Supplementary Table S2). Conversely, when comparing the

Table 1
Clinical features of PD patients according to the presence or absence of mutations in *GBA* or *LRRK2* genes.

Characteristics	GBA-PD	LRRK2-PD	IPD	p-Value ^a
Sample size	22 (12 L444P, 1 IVS2 + 1G > A, 8 N370S)	17	93	–
AAO (range)	47.82 ± 11.30 (23–67)	46.76 ± 9.14 (29–60)	55.02 ± 12.36 (29–87)	0.004^d
Disease duration (range)	12.09 ± 6.02 (2–25)	12.71 ± 6.59 (4–17)	11.1 ± 6.7 (0–28)	–
Male/female	11/11	7/10	57/36	0.24
Familiar/sporadic case	7/15	9/8	15/78	0.003^d
First symptom				
Tremor (%)	13/22 (59.09)	9/17 (52.94)	66/90 (73.33)	0.15 ^b
Bradykinesia (%)	4/22 (18.18)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	
Rigidity (%)	2/22 (9.09)	1/17 (5.88)	4/90 (4.44)	
Rigidity + tremor (%)	0/22 (0.0)	0/17 (0.0)	4/90 (4.44)	
Rigidity + bradykinesia (%)	2/22 (9.09)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	
Tremor + bradykinesia (%)	0/22 (0.0)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	
Rigidity + tremor + bradykinesia (%)	0/22 (0.0)	0/17 (0.0)	1/90 (1.11)	
Other(s) (%)	1/22 (4.55)	1/17 (5.88)	12/90 (13.33)	
Presenting symptoms				
Bradykinesia (%)	22/22 (100.0)	17/17 (100.0)	93/93 (100.0)	
Rigidity (%)	20/22 (90.91)	16/17 (94.12)	90/93 (96.77)	0.47
Resting tremor (%)	16/22 (72.73)	14/17 (82.35)	85/92 (92.39)	0.03^c
Postural instability (%)	17/21 (80.95)	10/17 (58.82)	54/92 (58.70)	0.16
Cognitive decline (%) ^e	8/21 (38.1)	5/16 (31.25)	13/82 (15.85)	0.05^f
Hallucinations (%)	11/22 (50.0)	3/17 (17.65)	39/90 (43.33)	0.09
Depressive symptoms (%)	18/22 (81.82)	13/17 (76.47)	51/90 (56.67)	0.04^c
Voice alteration (hypophonia) (%)	17/21 (80.95)	13/17 (76.47)	52/63 (82.54)	0.85
Gait freezing (%)	13/18 (72.22)	8/17 (47.06)	48/62 (77.42)	0.0498^c
Dyskinesia (%)	12/22 (54.55)	12/17 (70.59)	50/83 (60.24)	0.59
Motor fluctuation (%) ^g	17/22 (77.27)	15/17 (88.24)	51/59 (82.98)	0.54
Sleep disturbances (%) ^h	18/21 (85.71)	13/17 (76.47)	76/82 (92.68)	0.13
Dysautonomia (%) ⁱ	20/22 (90.91)	9/16 (56.25)	76/78 (97.44)	0.00002^c
Olfactory disturbances (%) ^k	8/14 (57.14)	11/13 (84.62)	21/39 (53.85)	0.14
Dopamine treatment response (%)	22/22 (100.0)	16/16 (100.0)	83/91 (91.21)	0.17

AAO: Age at onset in years as mean ± standard deviation.

^a Chi-square and ANOVA tests. The difference is significant at the 0.05 level. p-value is referred to the test with all groups.

^b For tremor vs. all other initial symptoms.

^c $p < 0.05$.

^d $p < 0.01$.

^e $p < 0.001$.

^f Borderline significance value.

^g Cognitive decline was referred as forgetfulness complaints.

^h Motor fluctuation consisted of wearing off, delayed on and off phenomenon.

ⁱ Sleep disturbances were evaluated as insomnia, fragmented sleep, REM sleep disorder, vivid dreams, nightmares, sleep apnea-hypopnea syndrome, excessive daytime sleepiness, and restless legs syndrome.

^j Dysautonomia included sialorrhea, seborrhea, sweating, dysphagia, constipation, urinary incontinence, sexual dysfunction, lipothymy, and syncope.

^k Olfactory disturbances were referred as presence of hyposmia or anosmia.

presence of gait freezing and dysautonomia, these indexes tended to be more frequent in both GBA-PD and IPD groups taken together than in *LRRK2* mutation carriers (respectively, OR = 3.61, 95% CI 1.22–10.66; $p = 0.02$; and OR = 18.67, 95% CI 4.58–76.13; $p < 0.0001$; Supplementary Table S2). Depressive symptoms was present in higher proportion in *GBA* and *LRRK2* mutation carriers than in IPD group (OR = 2.96, 95% CI 1.23–7.16; $p = 0.013$; Supplementary Table S2). Although cognitive decline seems to be more frequent in both *LRRK2* and *GBA* mutation carrier groups than IPD patients, we observed a borderline p-value ($p = 0.055$; Table 1 and Supplementary Table S2).

4. Discussion

As shown (Table 1), differences among the three groups of PD patients did not reach significance when referring to gender, levodopa treatment response and the presence of rigidity, postural instability, hallucinations, voice alteration, dyskinesia, motor fluctuation, sleep and olfactory disturbances. Our findings are consistent with those from other studies conducted in large PD cohorts from Europe, China, North and South America [6,11,28]. However, we found significant differences between GBA-PD, *LRRK2*-PD and IPD groups in age at onset, familiar history, and the presence of resting tremor, depressive symptoms, gait freezing and dysautonomia.

We observed that the first clinical signs of PD were more likely to

occur at an earlier age in *GBA* mutation carriers than in IPD patients, particularly if the mutation shows a severe effect on glucocerebrosidase activity. Our findings were similar to those observed by Gan-Or et al. [29] in 1000 patients of Ashkenazi-Jewish descent with PD. Also, in a meta-analysis, pooling AAO data of mild and severe *GBA* mutation carriers from > 11,000 patients with PD from worldwide populations, including from North, Central, and South America, Western and Eastern Europe, Asia, North Africa, and Ashkenazi Jews, Gan-Or et al. [12] demonstrated that mild and severe heterozygous *GBA* mutations differentially affect the AAO of PD. Besides, comparison of our observation in *GBA*-PD group to studies in other populations reinforces that *GBA* mutations are related to an earlier age of disease manifestation [2,10,17,18,30].

Likewise to *GBA*-PD, we observed that *LRRK2* G2019S carriers also tended to develop the first PD symptoms in an earlier age than IPD patients. There is discordance in literature when referring to this feature. According to Gan-Or et al. [29], post hoc analysis, performed after one-way ANOVA of an Israeli Ashkenazi PD cohort, revealed a significant younger age at disease onset in the group of 56 *LRRK2* G2019S carriers compared to 283 non-carriers. However, this trend was not detected in 97 Ashkenazi Jews carrying *LRRK2* G2019S in comparison to 391 idiopathic PD patients from USA and Israel [31] and also in 25 *LRRK2* G2019S carriers (including 9 Canadians, 6 Brazilians, 3 Germans and 7 from USA), compared to 84 non-carriers [28].

We verified that *GBA* mutation carriers presented a phenotype characterized by a lower frequency of tremor at rest in relation to *LRRK2*-PD and IPD patients. Although our observations corroborate the results of a multi-center study developed with subjects with PD from North and South America, Asia, Israel and Europe [18], they contrast with findings from other studies [11,17,29,32], in which significant differences in resting tremor frequencies between *GBA* mutation and IPD groups were not identified in Ashkenazi Jewish, European, Thai and Serbian PD patient cohorts.

In addition, *LRRK2* G2019S carriers exhibited a phenotype characterized by reduced frequency of gait freezing and dysautonomia than *GBA*-PD and IPD patients. Conversely, gait dysfunction was more frequently found in 25 *LRRK2* G2019S carriers than among 84 IPD patients in a survey conducted in individuals from Canadian, American, Brazilian and German origin [28]. Among 100 PD patients of Ashkenazi Jewish origin (50 *LRRK2* G2019S carriers and 50 non-carriers) G2019S mutation is apparently associated with increased gait variability [33].

In our cohort, *GBA* and *LRRK2* mutation carriers showed a significantly higher incidence of depressive symptoms than IPD patients. Such trait was found in 82% of PD cases with *LRRK2* G2019S mutation, in 76% of *GBA* mutation carriers and in 57% of non-carriers (Table 1). The survey conducted in a cohort of PD individuals from Algeria [34], including 23 patients with *LRRK2* G2019S mutation and 48 non-carriers, identified significantly more behavioral abnormalities, mainly depression and hallucinations, in G2019S carriers than in non-carriers. Depression was also detected with a greater prevalence in a cohort of 31 Ashkenazi Jews carrying *GBA* mutations when compared to 55 patients with idiopathic PD [35]. Besides, a study conducted in 20 PD patients, heterozygous for *GBA* L444P (14) or N370S (6), and in 20 non-carriers from Germany identified a higher score for neuropsychiatric disturbances in *GBA* group, including depression, anxiety disorder, apathy and indifference [36].

Although literature data support an association between the presence of *GBA* mutations and the development of severe cognitive changes in PD patients, and a lower risk for cognitive impairment in *LRRK2* mutation carriers than IPD, we found no statistical differences between carriers and non-carriers concerning this feature [18,36–38]. However, differences in cognitive decline frequencies among the groups presented borderline statistical significance. This might have occurred due to the small number of *GBA* and *LRRK2* mutation carriers. Sample size for this analysis might not have been enough to demonstrate this correlation.

Although this genotype-phenotype comparative analysis revealed significant differences, results obtained should be interpreted with caution due to some limitations of our study that merit consideration. One such limitation was the small number of *LRRK2* and *GBA* mutation carriers in our sample, with a direct impact on *p*-values, which led us not to apply adjustments for multiple comparisons. Furthermore, no clinical tools to assess and monitor the disease evolution were used. Even though the aim of this research was to compare the presence and absence of clinical features, this precluded the assessment of variations caused by the mutations in the course of the disease. Finally, concerning the two case groups (*LRRK2*-PD and *GBA*-PD), it is important to highlight that there is a difference between the strength of the two genetic factors. *LRRK2* G2019S is a pathogenic dominant mutation responsible for disease development in most carriers [8], whereas *GBA* mutations are not considered disease-causing by themselves. Although *GBA* mutations represent important risk factors for PD (mean odds ratio: 5.6) [39], there are additional modulating factors in carriers of *GBA* mutations not examined in our study. Despite this, the frequency observed of mutations in *GBA* gene among Brazilian PD patients points the important role of this gene in the Parkinson's disease etiology in our population [22–24].

To our knowledge, this is the first comparative analysis of motor and non-motor features in *LRRK2* and *GBA* mutation carriers and non-carriers conducted in a cohort from Brazil, a country with a highly

miscegenated population. Similarly to other studies, our results suggest that mutations in *GBA* and *LRRK2* influence the clinical signs of the Parkinson's disease, with significant implications for handling of specific patient groups. PD phenotypes similarities among patients with comparable genotypes can benefit the classification of clinical profiles according to genetic features. Despite the small sample reported in this study, we hope that the establishment of clinical PD subtypes differently modified by *GBA* and *LRRK2* mutations aids the development of specific therapeutic approaches.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

The authors thank the patients and their families for their cooperation. This work was supported by grants from the Brazilian Ministry of Health/CNPq - National Council for Scientific and Technological Development (303256/2009-5 and 304879/2013-4) and from FAPERJ - Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (E-26/103.065/2011 and E-26/201.171/2017) in Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3249>.

References

- [1] S.M. Van Rooden, W.J. Heiser, J.N. Kok, D. Verbaan, J.J. Van Hilten, J. Marinus, The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: a systematic review, *Mov. Disord.* 25 (2010) 969–978, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.23116>.
- [2] L.-Y. Ma, P. Chan, Z.-Q. Gu, F.-F. Li, T. Feng, Heterogeneity among patients with Parkinson's disease: cluster analysis and genetic association, *J. Neurol. Sci.* 351 (2015) 41–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2015.02.029>.
- [3] P.M.A. Antony, N.J. Diederich, R. Krüger, R. Balling, The hallmarks of Parkinson's disease, *FEBS J.* 280 (2013) 5981–5993, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12335>.
- [4] W. Poewe, K. Seppi, C.M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman, A.-E. Schrag, A.E. Lang, Parkinson disease, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3 (2017) 17013, <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- [5] S. Przedborski, The two-century journey of Parkinson disease research, *Nat. Rev. Neurosci.* 18 (2017) 251–259, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.25>.
- [6] C. Wang, Y. Cai, Z. Gu, J. Ma, Z. Zheng, B.S. Tang, Y. Xu, Y. Zhou, T. Feng, T. Wang, S. Di Chen, P. Chan, Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common leucine-rich repeat kinase 2 and glucocerebrosidase genetic variants in Chinese individuals, *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 725.e1–725.e6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.012>.
- [7] V. Bonifati, Genetics of Parkinson's disease - state of the art, 2013, *Parkinsonism Relat. Disord.* 20S1 (2014) S23–S28, [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70009-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70009-9).
- [8] O. Corti, S. Lesage, A. Brice, What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1161–1218, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00022.2010>.
- [9] J. Aharon-Peretz, H. Rosenbaum, R. Gershoni-Baruch, Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1972–1977, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa033277>.
- [10] J. Neumann, J. Bras, E. Deas, S.S. O'Sullivan, L. Parkkinen, R.H. Lachmann, A. Li, J. Holton, R. Guerreiro, R. Paudel, B. Segarane, A. Singleton, A. Lees, J. Hardy, H. Houlden, T. Revez, N.W. Wood, Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease, *Brain* 132 (2009) 1783–1794, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp044>.
- [11] S. Lesage, M. Anheim, C. Condroyer, P. Pollak, F. Durif, C. Dupuis, F. Viallet, E. Lohmann, J.C. Corvol, A. Honoré, S. Rivaud, M. Vidailhet, A. Dürr, A. Brice, Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 202–210, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq454>.
- [12] Z. Gan-Or, I. Amshalom, L.L. Kilarski, A. Bar-Shira, M. Gana-Weisz, A. Mirelman, K. Marder, S. Bressman, N. Giladi, A. Orr-Urtreger, Differential effects of severe vs mild *GBA* mutations on Parkinson disease, *Neurology* 84 (2015) 880–887, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000001315>.
- [13] E. Beutler, T. Gelbart, C.R. Scott, Hematologically important mutations: Gaucher disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 35 (2005) 355–364, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.07.005>.
- [14] M. Swan, R. Saundres-Pullman, The association between β -glucocerebrosidase

- mutations and parkinsonism, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13 (2013) 368, <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-013-0368-x>.
- [15] A. Angeli, N.E. Mencacci, R. Duman, I. Aviles-Olmos, Z. Kefalopoulou, J. Candelario, S. Rusbridge, J. Foley, P. Pradhan, M. Jahanshahi, L. Zrinzo, M. Hariz, N.W. Wood, J. Hardy, P. Limousin, T. Foltynie, Genotype and phenotype in Parkinson's disease: lessons in heterogeneity from deep brain stimulation, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1370–1375, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25535>.
- [16] Z. Gan-Or, A. Bar-Shira, A. Mirelman, T. Gurevich, M. Kedmi, N. Giladi, A. Orr-Urtreger, LRRK2 and GBA mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease, *Neurogenetics* 11 (2010) 121–125, <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-009-0198-9>.
- [17] T. Pulkas, L. Choutum, S. Chitphuk, A. Thakkinstian, S. Pongpakdee, K. Kulkantarakorn, S. Hanchaipibookul, S. Tiampao, P. Boonkongchuen, Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 (2014) 986–991, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2014.06.007>.
- [18] E. Sidransky, M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.-M. Chen, L.N. Clark, C. Condroyer, E.V. de Marco, A. Dürr, M.J. Eblan, S. Fahn, M. Farrer, H.-C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Knopp, A.E. Lang, G.-J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I.F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, I.V. Perem, A. Quattrone, E. Rogeava, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samsad, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T.G. Wolfsberg, Y.-R. Wu, C.P. Zabetian, Y. Zhao, S.G. Ziegler, Multi-center analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 1651–1661, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0901261>.
- [19] N. Giladi, A. Mirelman, A. Thaler, A. Orr-Urtreger, A personalized approach to Parkinson's disease patients based on founder mutation analysis, *Front. Neurol.* 7 (2016) 71, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2016.00071>.
- [20] A.J. Espay, P. Brundin, A.E. Lang, Precision medicine for disease modification in Parkinson disease, *Nat. Rev. Neurol.* 13 (2017) 119–126, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.196>.
- [21] C.B. Abdalla-Carvalho, C.B. Santos-Rebouças, B.C. Guimarães, M. Campos Júnior, J.S. Pereira, A.L. de Rosso, D.H. Nicaretta, M. Marinho e Silva, J.M. dos Santos, M.M.G. Pimentel, Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease, *Eur. J. Neurol.* 17 (2010) 1479–1481, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03039.x>.
- [22] A.V. dos Santos, C.P. Pestana, K.R. da S. Diniz, M. Campos Júnior, C.B. Abdalla-Carvalho, A.L.Z. de Rosso, J.S. Pereira, D.H. Nicaretta, W.L. de Carvalho, J.M. dos Santos, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Mutational analysis of GIGYF2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 485 (2010) 121–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.083>.
- [23] B. de C. Guimarães, A.C.V. Pereira, F. da C. Rodrigues, A.V. dos Santos, M. Campos Júnior, J.M. dos Santos, F.L. dos Santos, A.L.Z. de Rosso, D.H. Nicaretta, J.S. Pereira, D.J. da Silva, M.V. Della Coletta, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients, *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 (2012) 688–689, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2011.11.028>.
- [24] G. de M. Abreu, D.C.T. Valença, M. Campos Júnior, C.P. da Silva, J.S. Pereira, M.A. Araujo Leite, A.L. Rosso, D.H. Nicaretta, L.F.R. Vasconcellos, D.J. da Silva, M.V. Della Coletta, J.M. dos Santos, A.P. Gonçalves, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Autosomal dominant Parkinson's disease: incidence of mutations in LRRK2, SNCA, VPS35 and GBA genes in Brazil, *Neurosci. Lett.* 635 (2016) 67–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.040>.
- [25] M.M.G. Pimentel, K.C.V. Moura, C.B. Abdalla, J.S. Pereira, A.L.Z. de Rosso, D.H. Nicaretta, M.C. Junior, R.M. de Almeida, J.M. dos Santos, L.C.C. Bastos, M.F.X. Mendes, H. Mautasch, F.H. de R. Costa, A.L. dos S. Werneck, C.B. Santos-Rebouças, A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil, *Neurosci. Lett.* 433 (2008) 17–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.033>.
- [26] M. Spitz, J.S. Pereira, D.H. Nicaretta, G. de M. Abreu, E.F. Bastos, T.L. Seixas, M.M.G. Pimentel, Association of LRRK2 and GBA mutations in a Brazilian family with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 825–826, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2015.03.029>.
- [27] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55 (1992) 181–184, <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181>.
- [28] C. Marras, B. Schuele, R.P. Munhoz, E. Rogeava, J.W. Langston, M. Kasten, C. Meaney, C. Klein, P.M. Wadia, S.-Y. Lim, R.S.-I. Chuang, C. Zadikof, T. Steeves, K.M. Prakash, R.M.A. de Bie, G. Adeli, T. Thomsen, K.K. Johansen, H.A. Teive, A. Asante, W. Reginold, A.E. Lang, Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers, *Neurology* 77 (2011) 325–333, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318227042d>.
- [29] Z. Gan-Or, N. Giladi, U. Rozovski, C. Shifrin, S. Rosner, T. Gurevich, A. Bar-Shira, A. Orr-Urtreger, Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset, *Neurology* 70 (2008) 2277–2283, <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000304039.11891.29>.
- [30] L.N. Clark, B.M. Ross, Y. Wang, H. Mejia-Santana, J. Harris, E.D. Louis, L.J. Cote, H. Andrews, S. Fahn, C. Waters, B. Ford, S. Frucht, R. Ottman, K. Marder, Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease, *Neurology* 69 (2007) 1270–1277, <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02>.
- [31] R.N. Alcalay, A. Mirelman, R. Saunders-pullman, M. Tang, H.M. Santana, D. Raymond, E. Roos, M. Orbe-reilly, T. Gurevich, A.B. Shira, M.G. Weisz, K. Yasinovsky, M. Zalis, A. Thaler, A. Deik, M.J. Barrett, J. Cabassa, M. Groves, A.L. Hunt, N. Lubarr, M.S. Luciano, J. Miravite, C. Palmese, R. Sachdev, H. Sarva, L. Severt, V. Shanker, M.C. Swan, J. Soto-Valencia, B. Johannes, R. Ortega, S. Fahn, L. Cote, C. Waters, P. Mazzoni, B. Ford, E. Louis, O. Levy, L. Rosado, D. Ruiz, T. Dorowski, M. Paucitolo, W. Nichols, A. Orr-Urtreger, L. Ozelius, L. Clark, N. Giladi, S. Bressman, K.S. Marder, Parkinson Disease Phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25647>.
- [32] N. Kresojević, M. Janković, I. Petrović, K.R. Kumar, N. Dragašević, V. Dobričić, I. Novaković, M. Svetel, C. Klein, T. Pekmezović, V.S. Kostić, Presenting symptoms of GBA-related Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 804–807, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2015.04.028>.
- [33] A. Mirelman, T. Heman, K. Yasinovsky, A. Thaler, T. Gurevich, K. Marder, S. Bressman, A. Bar-Shira, A. Orr-Urtreger, N. Giladi, J.M. Hausdorff, Fall risk and gait in Parkinson's disease: the role of the LRRK2 G2019S mutation, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1683–1690, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25587>.
- [34] S. Belarbi, N. Hecham, S. Lesage, M.I. Kedha, N. Small, T. Benhassine, F. Ymail-Dahlouk, E. Lohman, B. Benhabyles, T. Hamadouche, S. Assami, A. Brice, M. Tazir, LRRK2 G2019S mutation in Parkinson's disease: a neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Algerian cohort, *Parkinsonism Relat. Disord.* 16 (2010) 676–679, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2010.09.003>.
- [35] M. Swan, N. Doan, R.A. Ortega, M. Barrett, W. Nichols, L. Ozelius, J. Soto-Valencia, S. Boschung, A. Deik, H. Sarva, J. Cabassa, B. Johannes, D. Raymond, K. Marder, N. Giladi, J. Miravite, W. Severt, R. Sachdev, V. Shanker, S. Bressman, R. Saunders-Pullman, Neuropsychiatric characteristics of GBA-associated Parkinson disease, *J. Neurol. Sci.* 370 (2016) 63–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.08.059>.
- [36] K. Brockmann, K. Srijles, A.K. Hauser, C. Schulte, I. Csofi, T. Gasser, D. Berg, GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics, *Neurology* 77 (2011) 276–280, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318225ab77>.
- [37] R.N. Alcalay, H. Mejia-Santana, A. Mirelman, R. Saunders-Pullman, D. Raymond, C. Palmese, E. Caccoppolo, L. Ozelius, A. Orr-Urtreger, L. Clark, N. Giladi, S. Bressman, K. Marder, Neuropsychological performance in LRRK2 G2019S carriers with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 106–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2014.09.033>.
- [38] J.H. Somme, A.M. Salazar, A. Gonzalez, B. Tijero, K. Berganzon, E. Lezcano, M.F. Martinez, J.J. Zarranz, J.C. Gómez-Esteban, Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 494–499, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2015.02.019>.
- [39] C. Koros, A. Simiti, L. Stefanis, Genetics of Parkinson's disease genotype-phenotype correlations, *Int. Rev. Neurobiol.* 132 (2017) 197–231, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2017.01.009>.

