

DÉLCIO CARAN BERTUCCI FILHO

**FREQUÊNCIA E FENÓTIPO DE VARIANTES DOS GENES *PARK2* E *LRRK2* EM
PACIENTES COM PARKINSONISMO DE INÍCIO PRECOCE.**

Tese apresentada como pré-requisito parcial à obtenção do grau de Doutor. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Hélio A. Ghizoni Teive

CURITIBA
2015



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER


Aos sete dias do mês de julho do ano de dois mil e quinze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Liya Regina Mikami, Dr. Renato Puppi Munhoz, Dr. Salmo Raskin, Dra. Viviane de Hiroki Flumignan Zétola, Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **Délcio Caran Bertucci Filho**, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**FREQUÊNCIA E FENÓTIPO DE VARIANTES NOS GENES PARK2 E LRRK2 EM PACIENTES COM PARKINSONISMO DE INICIO PRECOCE**”. A Banca examinadora considerou que **Délcio Caran Bertucci Filho**, apresentou trabalho adequado para Tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


Dra. **Liya Regina Mikami**


Dr. **Renato Puppi Munhoz**


Dr. **Salmo Raskin**


Dra. **Viviane de Hiroki Flumignan Zétola**


Dr. **Hélio Afonso Ghizoni Teive**

AGRADECIMENTOS

Ao **meu pai, Délcio**, que sempre acreditou, e me ensinou a acreditar, que, ao longo da vida, eu seria capaz de conseguir tudo aquilo que eu desejasse, com trabalho árduo, dedicação e honestidade.

Aos meus filhos **Marina e Samuel** que me auxiliaram na revisão do texto.

Aos **alunos do Curso de Medicina** da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), especialmente aos meus afilhados da Primeira Turma (T1) que concluirão o curso em julho de 2015, e que foram a motivação maior para que eu empreendesse esta longa jornada do doutorado.

À **Yumi Teive** que, novamente, me proporcionou apoio logístico durante o período da coleta de dados, nas minhas idas para Curitiba às segundas-feiras.

Ao **Prof. Dr. Renato P. Munhoz** pelo compartilhamento do seu conhecimento durante a coleta de dados, pela ajuda na redação do artigo na época da publicação e pelo recrutamento de pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce na Associação Paranaense dos Portadores de Parkinsonismo.

Ao **Prof. Dr. Salmo Raskin** do Laboratório Genetika que, gentilmente, fez a extração do DNA do sangue dos pacientes e enviou para a França, e que me orientou na parte genética da tese.

Ao **Dr. André Troiano** que nos ajudou na confecção das planilhas dos resultados dos estudos genéticos.

Ao **Dr. Alexis Brice e Dra. Suzane Lesage** que realizaram o estudo genético dos pacientes.

E quero agradecer especialmente ao **Prof. Dr. Hélio A. G. Teive**, grande amigo desde a época da Residência de Neurologia, pelo qual tenho profunda admiração e respeito, que me orientou e muito me incentivou nestes longos anos de doutorado. Eu nunca teria chegado ao final sem a sua preciosa ajuda.

**À minha esposa, Gesélia, e
meus filhos, Marina e Samuel,
com muito amor e admiração.**

ÍNDICE

Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	vii
Lista de gráficos.....	viii
Lista de anexos.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	01
2. Revisão da literatura.....	02
2.1 Doença de Parkinson.....	02
2.2 Genética dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.....	05
2.2.1 Genes da DP com herança autossômica dominante.....	06
2.2.1.1 <i>SNCA</i>	06
2.2.1.2 <i>LRRK2</i>	08
2.2.1.3 <i>VPS35</i>	09
2.2.1.4 <i>EIF4G1</i>	10
2.2.2. Genes da DP com herança autossômica recessiva.....	10
2.2.2.1 <i>PARK2</i>	10
2.2.2.1.1 Parkina e ubiquitinação.....	11
2.2.2.1.2 Parkina e DP.....	13
2.2.2.1.3 Parkina e controle mitocondrial.....	13
2.2.2.1.4 <i>PARK2</i> e manifestações clínicas.....	14
2.2.2.1.5 <i>PARK2</i> e patologia.....	14
2.2.2.2 <i>PINK1</i>	14
2.2.2.3. <i>DJ1</i>	15
3. Objetivos.....	17
4. Materiais e métodos.....	18
5. Resultados.....	21
5.1 Resultados gerais.....	21
5.2 Frequência das variantes e análise molecular.....	25
5.3 Achados clínicos.....	27
6. Discussão.....	31
7. Conclusão.....	34
8. Referências.....	35
9. Anexos.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da proteína <i>LRRK2</i>	08
Figura 2 - Estrutura da proteína parkina.....	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Epidemiologia da Doença de Parkinson.....	3
Tabela 2 – Principais sintomas motores e não-motores da Doença de Parkinson....	4
Tabela 3 – Visão geral dos genes relacionados à Doença de Parkinson ou parkinsonismo.....	7
Tabela 4 – Características epidemiológicas dos 69 pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.....	21
Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce no início da doença.....	23
Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce no momento da avaliação.....	23
Tabela 7 – Frequência de variantes patogênicas nos genes <i>PARK2</i> e <i>LRRK2</i> nos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a idade de início da doença.....	26
Tabela 8 – Variantes patogênicas no gene <i>PARK2</i> em pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.....	27
Tabela 9 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce e variantes patogênicas no gene <i>PARK2</i>	28
Tabela 10 – Características clínicas de pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce com e sem variantes patogênicas no gene <i>PARK2</i> , e com variantes patogênicas no gene <i>LRRK2</i>	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a idade de início dos sintomas.....	22
Gráfico 2 - Escores do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) nos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.....	24
Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a idade de início dos sintomas.....	24
Gráfico 4 - Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a duração da doença.....	25

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria.....	49
Anexo 2 - Critérios do DSM-IV para diagnóstico de depressão.....	51
Anexo 3 - Escala de depressão de Hamilton.....	53
Anexo 4 - Mini-Exame do Estado Mental (MEEM).....	58
Anexo 5 - Escala de estadiamento de Hohen-Yahr	60
Anexo 6 - Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) – Parte motora.....	62
Anexo 7- Escala de atividades da vida diária de Schwab-England.....	65
Anexo 8 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	67
Anexo 9 -Termo de Consentimento Informado e Esclarecido.....	69
Anexo 10- Publicação.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- DP - Doença de Parkinson
- DPIP - Doença de Parkinson de Início Precoce
- DPIT - Doença de Parkinson de Início Tardio
- DSM IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*
- *Fourth Edition*
- EIF4G1* - *Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1*
- LRRK2* - *Leucine-rich repeat kinase*
- MEEM - Mini-Exame do Estado Mental
- PINK1* - *Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1*
- PIP - Parkinsonismo de Início Precoce
- PJ - Parkinsonismo Juvenil
- SNCA - Alfa-sinucleína
- VPS35 - Vacuolar Protein Sorting 35
- UPDRS - Unified Parkinson's Disease Rating Scale

RESUMO

Os pacientes com Doença de Parkinson (DP) que apresentam o início dos sintomas até os 45 anos de idade são chamados de portadores de Parkinsonismo de Início Precoce (PIP) e possuem características clínicas que os diferem da doença de início tardio. Variantes genéticas têm sido descritas neste grupo de pacientes com PIP, sendo a sua prevalência inversamente proporcional à idade de início da doença, isto é, quanto mais precoce o início, maior a chance de encontrarmos uma variante. As variantes podem ter herança autossômica dominante (genes *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35* e *EIF4G1*) ou autossômica recessiva (genes *PARK2*, *PINK1* e *DJ1*). Algumas destas variantes são raras, mas variantes no gene *PARK2* são frequentes em pacientes com PIP, e variantes no gene *LRRK2* são comuns em pacientes com doença de início tardio e história familiar.

Em nossa amostra de 69 pacientes com PIP, encontramos cinco pacientes (7,25%) com variantes patogênicas no gene *PARK2*, aproximadamente metade do encontrado em outros estudos brasileiros. Apenas uma paciente tinha variante no gene *LRRK2* (1,52%). Oito pacientes (11,59%) com PIP tinham história familiar positiva, porém nenhum deles apresentou variantes genéticas nos genes *PARK2* e *LRRK2*.

Devido ao pequeno número de pacientes com variantes no gene *PARK2* não foi possível uma análise estatística comparativa entre o grupo com e sem variantes. Porém, alguns achados clínicos tais como a distonia como sintoma inicial, ocorrência de tremor de repouso, frequência maior de instabilidade postural e da forma rígido-acinética, escores semelhantes na escala de Hoehn-Yahr apesar de mais anos de duração da doença, sugerindo uma evolução mais lenta da doença, e, embora com incidência maior de complicações da terapia com levodopa, uma maior

latência para o surgimento destas complicações, tiveram tendência a serem mais comuns nos pacientes com variantes no gene *PARK2*.

Embora limitado pelo baixo número de pacientes com estudo genético, nosso estudo mostrou uma baixa frequência de variantes nos genes *PARK2* e *LRRK2* em pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.

Palavras-chave: doença de Parkinson; Parkinsonismo de Início Precoce; *PARK2*; Parkina; *LRRK2*.

ABSTRACT

Patients with Parkinson's disease in whom symptoms start before the age of 45 years (Early Onset Parkinsonism - EOP) present different clinical characteristics from those with the late-onset form of the disease. Genetic mutations have been described in patients with EOP, being more common as younger the age of onset. Mutations in seven genes are robustly associated with autosomal dominant (SNCA, LRRK2, EIF4G1, VPS35) or recessive (parkin/PARK2, PINK1, DJ1/PARK7) Parkinson's Disease (PD).

We found a low frequency (7,25%) of PARK2 mutations in our cohort of 69 patients with EOP. Our frequency of PARK2 mutations were lower than those reported in Europe and almost half than in other studies from Brazil. Only one patient (1,52%) had a heterozygous LRRK2 mutation. A positive family history of parkinsonism was found in 8 (11,59%) patients but no mutations in PARK2 and LRRK2 genes were detected in these patients.

The small number of patients with PARK2 mutations made comparative analysis unsuitable. But postural instability was the only clinical feature that tended to be more common in our patients with PARK2 mutations.

Although we acknowledge the caveat of examining a limited sample size, our study suggests that PARK2 and LRRK2 mutations are uncommon in Brazilian patients with EOP.

Key-words: Parkinson's disease, Early Onset Parkinsonism, *PARK2*, Parkin, *LRRK2*.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, acometendo 1 a 2% da população acima dos 65 anos [TARZY, 2012]. Os pacientes que desenvolvem as manifestações clínicas da DP em idade mais jovem são chamados de portadores de Parkinsonismo de Início Precoce (PIP), representando 5 a 10% do total de pacientes com a DP. Classicamente a idade determinada como ponto de corte pela maioria dos autores foi de 40 anos, que é aproximadamente dois desvios padrões abaixo da idade média de todos os pacientes [De ANDRADE, 1996; QUINN et al., 1987; SCAFF et al., 1980; GOMEZ-AREVALO et al., 1997]. Existe um subgrupo destes pacientes nos quais os sintomas se iniciam antes dos 21 anos, denominado Parkinsonismo Juvenil (PJ) [QUINN et al., 1987]. Os estudos têm demonstrado que variantes genéticas causadoras da doença ocorrem numa proporção grande de pacientes com PIP. Nesses estudos tem sido utilizada a idade de 45 ou 50 anos para definir os casos de PIP [LUCKING et al., 2000; PERIQUET et al., 2003; BONIFATI et al., 2005].

Existe alguma evidência de que os pacientes com DP e com variantes genéticas apresentam um fenótipo diferente dos pacientes sem variantes. Algumas características clínicas têm sido apontadas como mais frequentes nos pacientes com PIP, como a presença de distonia no início da doença, o predomínio da forma clínica rígido-acinética na apresentação dos sintomas, a menor latência para o surgimento das complicações da terapia com levodopa e evolução mais lenta da doença, sugerindo que existam dois subtipos da doença [DIAMOND et al., 1989; FRIEDMAN, 1994; HELY et al., 1995; JANKOVIC et al., 1990; ALVES et al., 2005; SCHRAG et al., 2003]. Uma possível explicação para essas diferenças seria a presença de variantes genéticas nessa população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) acomete aproximadamente 1% a 2% da população acima dos 65 anos [TARZY, 2012]. A idade é o fator de risco mais consistente e, com o aumento da expectativa de vida da população em geral, a prevalência da DP deverá se elevar consideravelmente nos próximos anos. Os primeiros sintomas da doença surgem entre 40 e 70 anos, tendo seu pico de início na 6ª década [De LONG et al., 2005]. A incidência é maior nos homens do que nas mulheres [WOOTEN et al., 2004; GOLDMAN et al., 2005]. A DP idiopática é observada em todos os grupos étnicos [MARRAS et al., 2004].

A tríade clássica dos sintomas da DP é composta de tremor, rigidez e bradicinesia. Anormalidades posturais são frequentemente incluídas na definição, mas geralmente ocorrem nas fases mais avançadas da doença e são inespecíficas, tendo menor importância clínica no início da doença [GELB et al., 1999].

As características epidemiológicas da DP estão resumidas na tabela 1 e os principais sintomas motores e não-motores na tabela 2 [CONOLLY e LANG, 2014].

A perda de neurônios dopaminérgicos na substância nigra e a presença de corpúsculos de Lewy, são os achados anatomo-patológicos mais importantes. No início da doença motora, a deficiência de dopamina é a anormalidade predominante. Porém, com a evolução da doença, o envolvimento de áreas cerebrais não dopaminérgicas resulta em sintomas motores e não motores que não respondem adequadamente ao uso da levodopa [CONOLLY e LANG, 2014]. Braak et al., 2003, definiram, do ponto de vista neuropatológico, a presença de seis estágios evolutivos da DP.

TABELA 1 – Epidemiologia da Doença de Parkinson.

Idade média de início, anos	65
Relação homem:mulher	1,5:1
Incidência 1000 indivíduos-ano	
Indivíduos 55-65 anos	0,3
Indivíduos >85 anos	4,4
Prevalência %	
População total	0,1
> 60 anos	1
Idiopático:Hereditário,	90:10
Fatores protetores da DP	tabagismo, alto consumo de cafeína
Fatores de risco	história familiar, agrotóxico, trauma de crânio
Subtipos clínicos	
Tremulante	8%
Rígido-acinético	26%
Misto	66%
CONOLLY e LANG, 2014	

No estágio inicial ocorre o acometimento do núcleo motor dorsal dos nervos vago e glossofaríngeo, zona reticular intermediária e do núcleo olfatório anterior; no estágio 2 existe o comprometimento dos núcleos da rafe, núcleo reticular gigantocelular e do complexo locus ceruleus; no estágio 3, a parte compacta da substância negra do mesencéfalo é acometida; no estágio 4, regiões prosencefálicas e mesocortex pré-frontal; no estágio 5 as áreas de associação de neocortex e neocortex pré-frontal; e, no estágio final, existe o comprometimento das áreas de associação do neocortex, áreas pré-motoras e área motora primária

[BRAAK et al., 2003].

TABELA 2 – Principais sintomas motores e não-motores da Doença de Parkinson.

Sintomas	Tempo de aparecimento	Frequência
Sintomas motores primários		
Tremor de repouso	No momento do Dx ¹ ou mais tarde	70%
Bradicinesia	No momento do Dx	100%
Rigidez	No momento do Dx ou mais tarde	90%
Sintomas não-motores precoces		
Hiposmia	Pode preceder o Dx	25-97%
Fadiga	Pode preceder o Dx	60%
Depressão	Pode preceder o Dx	25%
Distúrbio comportamental		
Sono REM	Pode preceder o Dx em 30 anos	30%
Sintomas tardios		
Sintomas axiais resistentes ao tratamento	5 a 10 anos após início dos sintomas	
Bloqueio de marcha e inst. postural		90% após 15 anos
Disfagia		50% após 15 anos
Distúrbios psiquiátricos	5 a 10 anos após início	
Ansiedade		55%
Distúrbios autonômicos	5 a 10 anos após início	
Lipotímia		15%
Sialorréia		30%
Urgência miccional		35%
Nictúria		35%
Disfunção sexual		20%
Distúrbio cognitivo		
Distúrbio cognitivo leve	35% no Dx ¹ , 50 % após 10 anos	
Demência	>80% após 20 anos	
CONOLLY e LANG, 2014		
1 Dx = diagnóstico		

Estes achados corroboram o conceito que, na DP, vários outros sistemas monoaminérgicos estão envolvidos, além do dopaminérgico.

Os pacientes que desenvolvem as manifestações clínicas da DP em idade mais jovem são chamados de portadores de Parkinsonismo de Início Precoce (PIP). Classicamente, a idade determinada como ponto de corte pela

maioria dos autores foi de 40 anos [De ANDRADE, 1996; QUINN et al., 1987; SCAFF et al., 1980; GOMEZ-AREVALO et al., 1997]. GERSHANIK e LEIST [1986] justificaram a escolha dessa idade como sendo equivalente a aproximadamente dois desvios padrão abaixo da idade média de todos os pacientes da sua série ($61,3 \pm 11,8$). Existe um subgrupo desses pacientes nos quais os sintomas se iniciam antes dos 21 anos e que são denominados de Parkinsonismo juvenil [QUINN et al., 1987], provavelmente reunindo um grupo heterogêneo de doenças. Vários estudos demonstraram variantes genéticas numa proporção grande dos pacientes com PIP, sendo nessas séries utilizada a idade de 45 anos [LUCKING et al., 2000; PERIQUET et al., 2003] OU 50 [BONIFATI et al., 2005] como limite. Embora o PIP tenha sido considerado como o limite inferior do espectro de idade da apresentação da DP, algumas características clínicas como a progressão mais lenta da doença, latência maior para o surgimento das complicações do tratamento com a levodopa e o prognóstico mais favorável, sugerem que existam dois subtipos da doença [DIAMOND et al., 1989; FRIEDMAN, 1994; HELY et al., 1995; JANKOVIC et al., 1990; ALVES et al., 2005; SCHRAG et al., 2003].

2.2 GENÉTICA DOS PACIENTES COM PIP

A primeira variante genética causando a DP foi descoberta no gene alfa-sinucleína (SNCA) em 1997 [POLYMERPOULOS, 1997]. Desde então, as pesquisas definiram um total de sete genes contendo variantes responsáveis por quadros de Parkinsonismo clinicamente semelhantes à DP, com modo de herança autossômica dominante ou recessiva. Variantes em outros 19 genes adicionais foram inicialmente postuladas como causadoras da doença (tabela 3), mas estudos subsequentes mostraram que estes genes ou não causavam parkinsonismo/DP, ou eram associados a fenótipos claramente diferentes da DP [PUSCHMANN, 2013]. Algumas formas de PIP são causadas por mutações em número cada vez maior de genes,

mas ainda é duvidoso se esses casos possuem a mesma via fisiopatológica do que os pacientes com início tardio [PUSCHMANN, 2013].

2.2.1 Genes da DP com herança autossômica dominante

Atualmente existe evidência que variantes em quatro genes com herança dominante da DP podem causar parkinsonismo. As variantes nos dois primeiros genes, alfa-sinucleína (*SNCA*) e leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*), têm sido estudadas extensivamente, enquanto variantes em *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1* (*EIF4G1*) e *vacuolar protein sorting 35* (*VPS35*) foram recentemente identificadas [PUSCHMANN, 2013].

2.2.1.1 *SNCA*

O fenótipo de pacientes com DP com variantes no gene *SNCA* tem certas características. Além dos sinais cardinais de parkinsonismo, a maioria dos pacientes desenvolve grave disfunção autonômica, problema de fala, mudança no comportamento e declínio cognitivo. Nas fases iniciais existe boa resposta dos sintomas à levodopa. Já nas fases avançadas ocorre intensa rigidez, que não mais responde à levodopa, e demência chegando ao ponto de mutismo. O achado neuropatológico é altamente característico com depósitos disseminados de alfa-sinucleína não somente no tronco encefálico, mas em todo o cérebro, nos neurônios, mas também encontrado nas células da glia [POULOPOULOS et al., 2012].

TABELA 3 – Visão geral dos genes relacionados à Doença de Parkinson ou parkinsonismo.

A - Genes com forte evidência de associação com DP/parkinsonismo

Herança autossômica dominante Herança autossômica recessiva

<i>SNCA (PARK1, PARK4)</i>	<i>PARKIN (PARK2)</i>
<i>LRRK2 (PARK8)</i>	<i>PINK1 (PARK6)</i>
<i>VPS35</i>	<i>DJ1 (PARK7)</i>
<i>EIF4G1</i>	

B - Genes com variantes associadas a transtornos que podem incluir parkinsonismo, mas diferentes da DP

Herança autossômica dominante Herança autossômica recessiva Ligado ao X

<i>ATXN2</i>	<i>ATP13A2 (PARK 9)</i>	<i>FMR1</i>
<i>ATXN3</i>	<i>DNAJC6</i>	
<i>GCH1</i>	<i>TH</i>	
<i>GRN</i>	<i>SPG11</i>	
<i>MAPT</i>		

C – Genes com variantes associadas a transtornos não semelhantes à DP e que podem cursar ou não com parkinsonismo, mas não apenas parkinsonismo

Herança autossômica dominante Herança autossômica recessiva Domin. ou recessivo

<i>C9ORF72</i>	<i>PLA2G6 (PARK 14)</i>	<i>POLG</i>
<i>CS1R</i>		

D – Genes com variantes não confirmadas como causadoras de DP

Herança autossômica dominante Herança autossômica recessiva

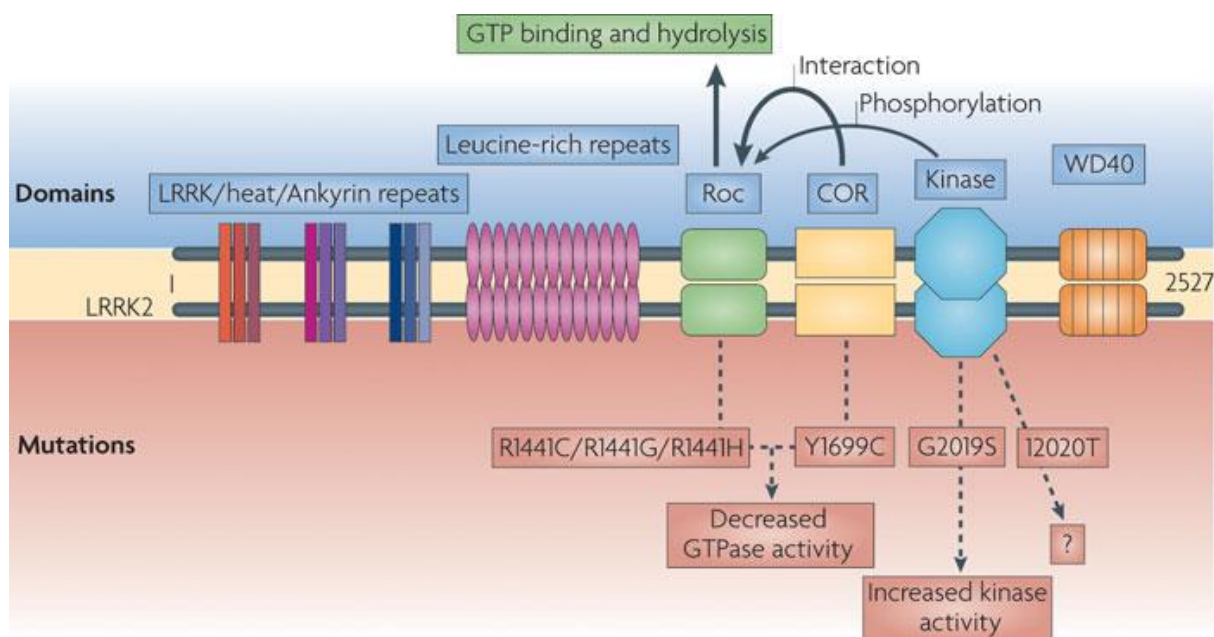
<i>GIGYF2 (PARK11)</i>	<i>FBX07 (PARK15)</i>
<i>UCHL1 (PARK5)</i>	<i>SPR (PARK3)</i>
<i>HTRA2 (PARK13)</i>	

PUSCHMANN, 2013.

2.2.1.2 *LRRK2*

Em 2004, dois grupos relataram simultaneamente a descoberta de variantes patogênicas no gene *LRRK2* em casos de DP [ZIMPRICH et al, 2004; PAISAN-RUIZ et al., 2004]. O gene *LRRK2*, localizado no cromossomo 12, codifica uma proteína (dardarina) com dois domínios enzimáticos (GTP-ase e quinase) e múltiplos domínios de interação proteína-proteína (figura 1). Sete variantes são consideradas causadoras de doença: p.Asn1437His, p.Arg1441Cys, p.Arg1441Gly, p.Arg1441His, p.Tyr1699Cys, p.Gly2019Ser e p.Ile2020Thr, permanecendo não provada a função patológica de outras variantes. A variante mais frequente é p.Gly2019Ser, contudo, apresenta penetrância incompleta, o que explica o fato de ser encontrada em casos familiares e também em casos esporádicos.

Figura 1- Domínios e variantes da proteína *LRRK2*.



COOKSON MR, 2010.

Variantes patogênicas no gene *LRRK2* são responsáveis por aproximadamente 10% dos pacientes com DP familiar com herança autossômica [BONIFATI, 2013]. A variante p.Gly2019Ser do gene *LRRK2* é a variante genética mais comumente associada à DP atualmente [DI FONZO et al., 2005]. Em dois estudos bastante

citados na literatura, a variante p.Gly2019Ser do gene *LRRK2* foi relatada em 41% dos casos esporádicos e 37% dos casos familiares de DP (e em 3% dos controles sadios) de uma população Árabe do Norte da África [LESAGE et al., 2006], em 18.3% de pacientes com DP de origem judaica Ashkenazi e em 1.3% dos controles [OZELIUS et al., 2006]. Em outros países essa variante é mais rara, sendo encontrada entre 0 a 2% dos pacientes com DP [CORREIA GUEDES et al., 2010]. Em estudo multicêntrico internacional recentemente publicado, a variante p.Gly2019Ser foi detectada em 0,58% de pacientes com DP cuja origem era europeia e asiática [ROSS et.al., 2011].

Do ponto de vista patológico, as características dos pacientes com variantes patogênicas no gene *LRRK2* são a perda neuronal dopaminérgica e gliose da substância nigra. Os corpúsculos de Lewy estão presentes na maioria dos pacientes.

De forma geral, as manifestações clínicas dos pacientes com variantes no gene *LRRK2* não diferem dos pacientes com a forma clássica da doença, embora a idade de início possa variar bastante [BONIFATI, 2013].

2.2.1.3 VPS35

Em 2011, foi descoberta a variante p.Asp620Asn na *vacuolar protein sorting 35 (VPS35)* em uma família Suíça com parkinsonismo [WIDER et al., 2008; VILARINO-GUELL et al., 2011]. O fenótipo associado com essa variante é o da DP típica: com início assimétrico, complicações motoras, boa resposta à levodopa, mas com início em idade um pouco mais precoce (na média na sexta década da vida). Os distúrbios cognitivos ou psiquiátricos graves são raros. Também nessa variante a penetrância é incompleta. A patologia cerebral nos portadores dessa variante é desconhecida. Apesar da sua raridade, essa nova forma de doença poderá possibilitar, futuramente, importantes pistas na patogenia da doença, pois esse gene codifica

uma subunidade proteica que está envolvida no transporte retrógrado entre os endossomos e o complexo de Golgi, e está relacionada ao trânsito e reciclagem de vesículas e proteínas sinápticas [BONIFATI, 2013].

2.2.1.4 EIF4G1

Variantes no gene *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1* (*EIF4G1*) têm sido associadas ao desenvolvimento de DP com herança autossômica dominante, a partir da identificação de uma variante sentido trocado p.Arg1502His em uma família francesa [CHARTIER-HARLIN et al., 2011]. Alguns outros estudos revelaram a mesma variante e outra, p.Ala502Val, em poucas famílias pequenas. Contudo, estudos subsequentes não conseguiram replicar os achados iniciais visto que não foram encontradas variantes em pacientes com DP, ao contrário, essas variantes do gene foram identificadas em indivíduos saudáveis. Bonifati cita que é possível que variantes no gene *EIF4G1* sejam uma rara causa de DP ou um fator de risco para DP, mas isto ainda está para ser demonstrado definitivamente [BONIFATI, 2013].

2.2.2 Genes da DP com herança autossômica recessiva

2.2.2.1 PARK2

Em 1998, variantes no gene *PARK2* foram descritas em vários irmãos de famílias consanguíneas no Japão e Turquia que apresentavam uma síndrome clínica peculiar, inicialmente designada de Parkinsonismo de Início Precoce com Flutuações Diurnas (PIPDF) [YAMAMURA et al., 1973; KITADA et al., 1998]. Logo estas variantes foram consideradas uma causa comum de PIP. Em um dos estudos com 100 pacientes com DP cujo início da doença foi abaixo dos 45 anos, 77% dos pacientes

cujo início foi abaixo dos 20 anos eram portadores de, pelo menos, uma variante no gene *PARK2* (homozigóticos ou heterozigóticos). Este percentual baixou para 26% quando o início da doença foi entre 20 e 30 anos de idade, e para 2 a 7% quando os sintomas iniciaram entre 30 e 45 anos de idade [LUCKING et al., 2000].

Outros estudos encontraram variantes do gene *PARK2* em indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos compostas em porcentagem menor de pacientes com PIP (início antes dos 40 ou 45 anos de idade): 8.2% na Itália, 2.7% na Coreia, 2.5% na Polônia, 1,4% na Austrália [LESAGE et al., 2006; SIRONI et al., 2008; MELLICK et al., 2009; KOZIOROWSKI et al., 2009]. Mais de 100 diferentes variantes no gene *PARK2* já foram descritas em pacientes com DP, incluindo variações no número de cópias (deleções, inserções, duplicações), variantes sentido trocado e sem sentido [LESAGE et al., 2009].

Bonifati cita que 50% dos casos de DP familiar autossômica recessiva e 15% dos casos de PIP esporádico apresentam variantes no gene *PARK2* [BONIFATI, 2013].

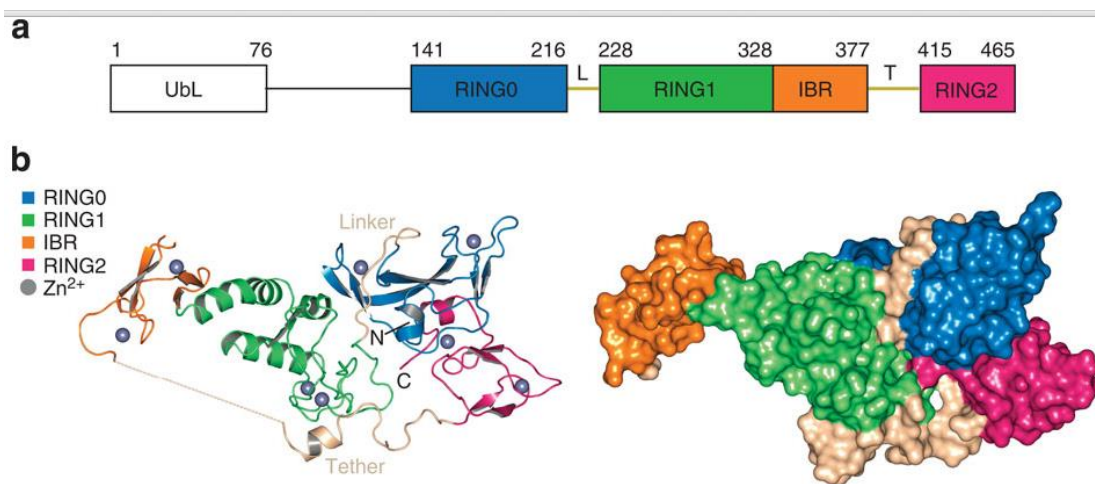
Em alguns pacientes com DP, apenas uma cópia da variante é encontrada no gene *PARK2*, sendo, nestes casos, difícil a sua interpretação. Provavelmente em alguns casos, uma segunda variante pode estar presente, mas que não foi detectada com os métodos atuais. Contudo, é possível que apenas uma cópia da variante seja suficiente para causar a DP, ou que possa atuar como um fator de risco aumentando a chance do indivíduo de desenvolver a doença [BONIFATI, 2013].

2.2.2.1.1 Parkina e ubiquitinização

O gene *PARK2*, localizado no cromossomo 6, tem 12 exons e codifica uma proteína (parkina) composta de 465 aminoácidos que tem a função de uma ubiquitina-E3-ligase (figura 2). Ela tem dois domínios *RING* separados por um

domínio *RING-IBR*. A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos produzida pela célula a partir de vários precursores.

Figura 2 – Estrutura da proteína parkina.



RILEY et al., 2013

O processo de ubiquitinação ocorre através da transferência de uma molécula de ubiquitina de uma enzima E1-ativada para uma enzima E2-conjugada, onde uma E3-ligase catalisa a transferência da molécula de ubiquitina, agora, da enzima E2 para o substrato alvo. A reação de ubiquitinação pode encerrar após o acréscimo apenas de uma molécula de ubiquitina (monoubiquitinação), ou pode promover o acréscimo de várias moléculas de ubiquitina em aminoácidos lisina da ubiquitina já incorporada no substrato (poliubiquitinação). A proteína parkina pode realizar mono ou poliubiquitinação com ligações com a lisina 48 ou 63.

O processo de ubiquitinação é um mecanismo pós-translacional que regula a estabilidade e a atividade das proteínas. A função da proteína varia conforme o local da ubiquitinação: quando ocorre ligação na lisina 48 existe sinalização para degradação proteica; na lisina 63, envolve inclusões de proteínas e reciclagem de receptores [DAWSON et al., 2010].

2.2.2.1.2 Parkina e DP

As variantes patogênicas no gene *PARK2* causam perda de função da proteína parkina que pode ser decorrente da redução da sua atividade catalítica, da ubiquitinação aberrante com diminuição da degradação do substrato ou da instabilidade da própria proteína parkina com sua insolubilização ou rápida degradação pelo sistema proteossômico. Na DP esporádica pode haver inativação da parkina por estresse oxidativo, nitrosilação ou fosforilação [DAWSON et al, 2010].

Duas substâncias são possíveis substratos da parkina: *aminoacyl-tRNA complex synthetase interacting multifunctional protein-2 (AIMP2)* e *Parkin interactive substrate (PARIS)*. Essas proteínas estão envolvidas no controle de qualidade mitocondrial das células, especialmente na biogênese das mitocôndrias.

2.2.2.1.3 Parkina e controle de qualidade mitocondrial

As mitocôndrias são organelas extremamente dinâmicas cuja morfologia é constantemente modificada por mecanismos de fissão e fusão, enquanto elas são transportadas dentro das células, fenômeno coletivamente chamado de dinâmica mitocondrial. Além destes eventos, a biogênese e a mitofagia são outros processos pelos quais a célula controla e mantém uma quantidade de mitocôndrias saudáveis, de acordo com a sua necessidade energética.

A proteína PINK1 ativa a parkina em resposta à injúria mitocondrial, A parkina, então, localiza a mitocôndria com disfunção e se inicia processo de degradação. Existem evidências que a parkina e PINK1 estejam envolvidas em todas as fases do controle de qualidade mitocondrial [SCARFFE et al.,2014].

2.2.2.1.4 *PARK2* e manifestações clínicas

As manifestações clínicas comuns aos pacientes com DP e variantes patogênicas no gene *PARK2* são o início precoce ou muito precoce da doença (<20 anos), resposta favorável e prolongada à levodopa, ocorrência de discinesias no curso da doença, e menor risco de sintomas não-motores como declínio cognitivo e disautonomia [AHLKOG, 2009]. Rigidez, distonia no membro inferior e hiperreflexia, assim como sintomas psiquiátricos tem sido descrito [AHLKOG, 2009; KILARSKI et al., 2012]. Os pacientes inicialmente descritos com PIPFD apresentavam melhora significativa dos sintomas após uma noite de sono, principalmente durante os primeiros anos de doença [YAMAMURA et al., 1973].

2.2.2.1.5 *PARK2* e patologia

Os corpúsculos de Lewy não foram detectados na maioria dos casos de pacientes portadores de variantes patogênicas no gene *PARK2*, sugerindo diferenças fisiopatológicas entre a forma típica da DP e a sua forma recessiva.

2.2.2.2 *PINK1*

Variantes homozigóticas do gene *phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase1* (*PINK1*, *PARK6*) estão associadas com PIP [VALENTE et al., 2004]. Mais de 40 mutações pontuais e, raramente, grandes deleções de nucleotídeos têm sido descritas no gene [LESAGE e BRICE, 2009]. O fenótipo clínico parece ser similar ao das variantes no gene *PARK2*, mas existe alguma indicação de que sintomas psiquiátricos ocorrem mais frequentemente entre os pacientes com mutações no gene *PINK1* [LESAGE e BRICE, 2009; SAMARANCH et al., 2010]. Variantes no gene *PINK1* são mais raras que as variantes no gene *PARK2*.

2.2.2.3 *DJ1*

Mutações no oncogene *DJ1* (*PARK7*) estão bem estabelecidas, mas causam DP muito raramente [BONIFATI et al., 2003]. Deficiências em enzimas na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias são comumente observadas em modelos *PINK1* e *DJ1-null* [JI-YOUNG HAN et al., 2014].

Somente alguns poucos pacientes com variantes homozigóticas do gene foram descritos. A maioria tinha PIP, mas uma das famílias apresentava casos de demência precoce e amiotrofia além do parkinsonismo [ABOU-SLEIMAN et al., 2003; HERING et al., 2004; DJARMATI et al., 2004; ANNESI et al., 2005].

Um efeito patogênico de certas variantes em heterozigose nos genes *PARK2* e *PINK1* tem sido postulado, embora tenha sido difícil a sua comprovação [ABBAS et al., 1999; CLARK et al., 2006; KLEIN et al., 2007; SIRONI et al., 2008; MELLICK et al., 2009]. Foi sugerido que certas variantes possam causar PIP quando presentes em ambos os alelos, mas que causariam Parkinsonismo de Início Tardio naqueles pacientes heterozigóticos [KLEIN et al., 2007].

A frequência de variantes nestes três genes é mais baixa do que inicialmente estimado; uma revisão sistemática de trabalhos, com mais de 5800 pacientes com PIP, mostrou 8,6% de pacientes com variantes no gene *PARK2*, 3,7% no gene *PINK1* e 0,4% no gene *DJ1* [KILARSKI et al., 2012].

Um dos aspectos mais importantes de estudos sobre doenças genéticas é a possibilidade de realizar o aconselhamento genético para os familiares dos pacientes que apresentam mutações genéticas.

Baseado no fato que variantes genéticas patogênicas do gene *PARK2* são frequentes nos pacientes com PIP, decidimos estudar a frequência de indivíduos com essas variantes patogênicas em nosso meio. E, embora a frequência de mutações do gene *LRRK2* seja maior nos pacientes com DP de

início tardio e nos pacientes com herança autossômica dominante de outras regiões, optamos por estudar, também, essas variantes em nossa população de PIP.

3 OBJETIVOS

3.1 Determinar a frequência de indivíduos com variantes patogênicas nos genes *PARK2* e *LRRK2* em uma amostra de pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.

3.2 Caracterizar o fenótipo dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce e que possuem variantes patogênicas nos genes *PARK2* ou *LRRK2*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Foram estudados pacientes que preenchiam os critérios clínicos de DP do *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* [HUGHES et al., 1992] (anexo 1) e que tinham o início da doença até os 45 anos de idade [PERIQUET et al., 2003].

Os pacientes foram selecionados no período de fevereiro a julho de 2011. Embora tenha sido um período curto, foi suficiente para incluir todos os pacientes com PIP acompanhados no ambulatório porque, aproximadamente, a cada seis meses todos os pacientes do ambulatório tem retorno agendado. Dezenove pacientes incluídos nesse estudo foram recrutados na Associação Paranaense dos Portadores de Parkinsonismo, em Curitiba. Todos os sessenta e nove pacientes incluídos no estudo foram examinados pelo pesquisador, assim como todas as escalas de avaliações às quais os pacientes foram submetidos também foram aplicadas pelo próprio pesquisador. Alguns pacientes foram examinados duas ou mais vezes, sendo utilizado para análise sempre o pior escore.

Para a definição da etnia dos pacientes foi utilizada a classificação do censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O fenótipo motor foi dividido em três formas: tremulante, quando o tremor de repouso era o componente principal sem bradicinesia ou rigidez debilitantes; rígido-acinética, quando o tremor estava ausente; e uma forma mista [RAJPUT et al., 2009].

Nos pacientes que utilizavam medicações dopaminérgicas foi calculada a dose diária equivalente de levodopa [TOMLISON et al., 2010], para fins de comparação de doses entre os pacientes.

O diagnóstico de depressão maior, que tem sido relatada como frequente nos pacientes com PIP [BERTUCCI FILHO et al., 2007], foi definido nos pacientes que tinham 5 ou mais dos 9 critérios do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth Edition* (DSM-IV) pelo período mínimo de 2 semanas, incluindo obrigatoriamente anedonia ou humor deprimido [AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013] (anexo 2). Para a quantificação da gravidade da depressão foi utilizada a escala de Hamilton com 17 itens [HAMILTON, 1960], sendo considerada depressão em remissão escores abaixo de 8, leve com escores entre 8 e 18, moderada entre 19 e 24 e acentuada quando acima de 24 (anexo 3).

Para o diagnóstico de demência foram utilizados os critérios do DSM-IV e o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) [FOLSTEIN et al., 1975] (anexo 4). Os níveis de corte do MEEM para o diagnóstico de demência foram 13 para os pacientes analfabetos, 18 para pacientes com 1 a 8 anos de escolaridade e 26 para os pacientes com mais de 8 anos, conforme estudo realizado no Brasil por BERTOLUCCI et al., 1994. Os pacientes foram testados de acordo com as escalas de avaliação de Hoehn-Yahr (anexo 5), do exame motor da escala unificada de avaliação para doença de Parkinson (UPDRS) (anexo 6), e de atividades da vida diária de Schwab-England [HORTA, 2003] (anexo 7).

A extração do DNA foi realizada a partir de leucócitos do sangue periférico dos pacientes no Laboratório Genetika, Curitiba, PR. O estudo genético foi realizado no Hôpital de la Salpêtrière, Paris, França, usando métodos descritos por Lücking et al., 2000, para o gene *PARK2*, e Lesage et al., 2005, para o gene *LRRK2*. Foi realizado sequenciamento de todos os exons e dosagem gênica do gene *PARK2*. Todos os 69 pacientes foram testados para o gene *PARK2* e 66 pacientes para o gene *LRRK2* porque houve problema técnico com os testes de 3 pacientes.

Recente diretriz recomenda o uso de terminologia específica para descrever as variantes identificadas nos genes que causam doenças: patogênica, provavelmente patogênica, de significado incerto, provavelmente benigna e benigna [RICHARDS et al., 2015].

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da UFPR (anexo 8). Todos os 69 pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 9).

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS GERAIS

Preenchendo os critérios acima, foi encontrado 69 pacientes cujas características epidemiológicas estão demonstradas na tabela 4. A maioria era do gênero masculino e branca. A média de escolaridade foi de $8,07 \pm 4,39$ anos. A média de idade no início dos sintomas foi de $35,77 \pm 6,85$ anos, sendo o grupo mais frequente (47,28%) entre 36 e 40 anos (gráfico 1).

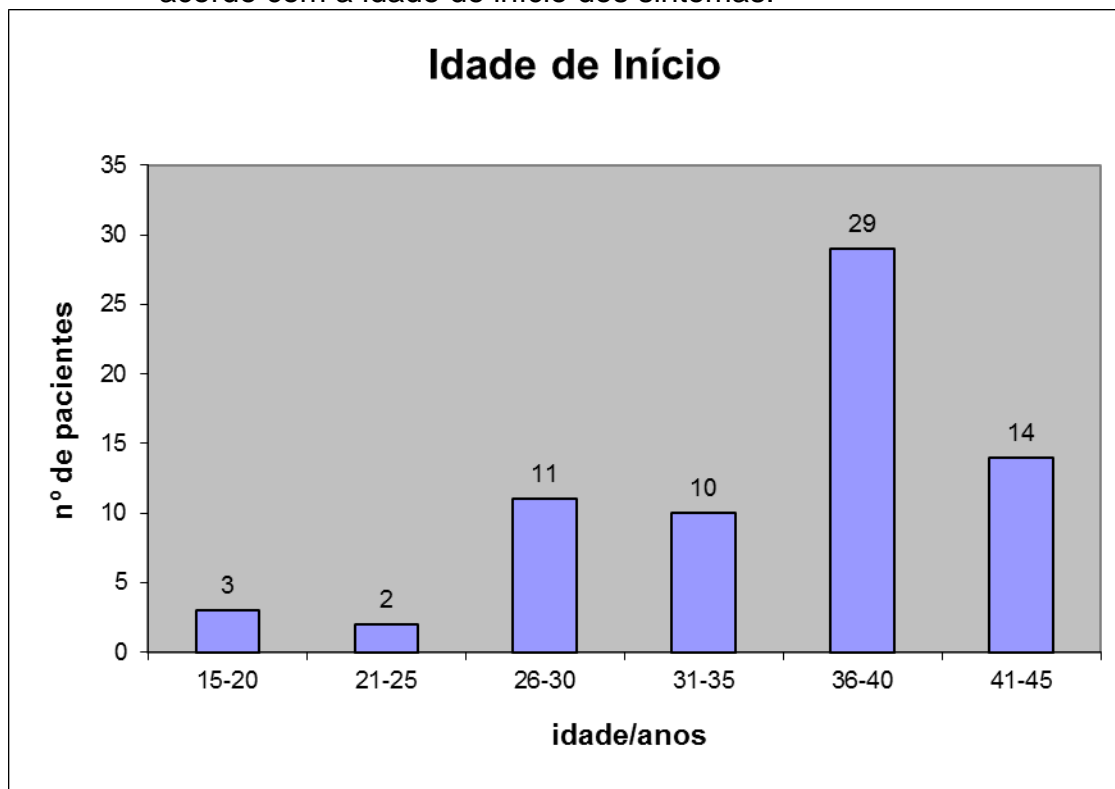
TABELA 4 – Características epidemiológicas dos 69 pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.

	Número de pacientes (n)	%
Gênero		
Masculino	43	62,32%
Feminino	26	37,68%
Etnia		
Branca	63	91,30%
Parda	4	5,80%
Amarela	2	2,90%
Escolaridade		
> 8 anos	29	42,03%
4-8 anos	18	26,09%
< 4 anos	19	27,54%
Analfabeto	3	4,34%

Do total, oito pacientes (11.59%) tinham história familiar positiva para parkinsonismo: três pacientes, o pai; um paciente, o irmão; um paciente, o avô

paterno; uma paciente, a prima materna; um paciente, o tio-avô materno e um paciente, uma tia-avó materna. Não havia nenhum caso de consanguinidade. Um paciente tinha duas filhas com distonia no membro inferior, porém não foi possível examinar nenhuma delas.

Gráfico 1– Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a idade de início dos sintomas.



A forma clínica que predominou no início da doença foi a rígido-acinética; a maioria dos pacientes teve o início dos sintomas no dimídio direito; a distonia ocorreu antes do uso da levodopa em 19,44% dos pacientes, sempre nos membros inferiores (membro inferior direito 13,89% X 5,55% membro inferior esquerdo); a distonia foi o sintoma inicial da doença em 7,25% dos pacientes. As características clínicas dos pacientes no início da doença estão demonstradas na tabela 5.

TABELA 5 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce no início da doença.

	Número de pacientes (n)	%
Forma Clínica		
Rígido-acinética	35	50,72%
Mista	29	42,03%
Distonia	5	7,25%
Dimídio		
Direito	38	55,07%
Esquerdo	31	44,93%

A bradicinesia estava presente em todos os pacientes e a rigidez muscular na maior parte (95,65%). A maioria dos pacientes apresentava dois ou três tipos de tremor; nesse grupo, o tremor postural predominou. Nos pacientes que tinham apenas um tipo de tremor, o de repouso foi o mais frequente. Na tabela 6 estão as características clínicas dos pacientes no momento da avaliação.

TABELA 6 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce no momento da avaliação.

	Número de pacientes (n)	%
Bradicinesia	69	100,0%
Rigidez	66	95,65%
Tremor	50	72,46%
Repouso	27	39,13%
Postural	34	49,28%
Cinético	31	44,93%
Um tipo de tremor	15	21,74%
Repouso	11	15,94%
Cinético	1	1,45%
Postura	3	4,35%
Dois ou três tipos	35	50,72%
Instabilidade postural	12	17,39%

A média do MEEM foi de $29,17 \pm 1,93$ (gráfico 2); nenhum paciente teve o diagnóstico de demência. A depressão foi diagnosticada em 13 (18,34%) pacientes; a distribuição quanto à gravidade dos sintomas está demonstrada no gráfico 3. A duração média da doença em todo o grupo foi de $10,96 \pm 6,50$ anos (gráfico 4) e o tempo de acompanhamento dos pacientes no ambulatório foi de $4,18 \pm 4,28$ anos.

Gráfico 2 – Escores do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) nos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.

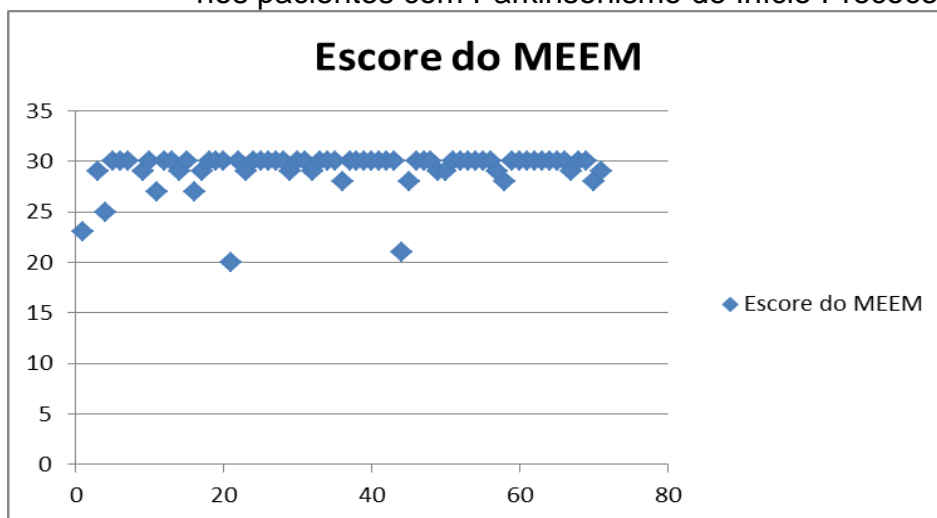


Gráfico 3 – Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a gravidade da depressão no momento da avaliação.

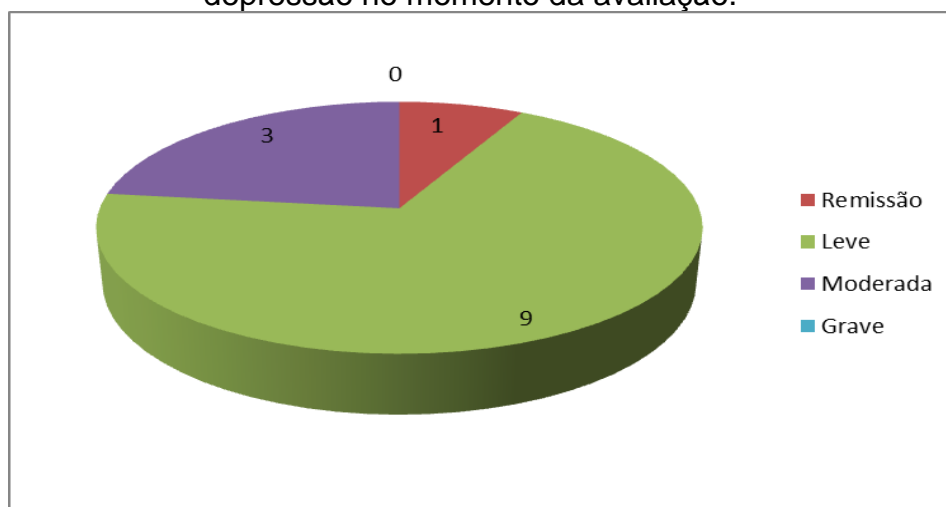
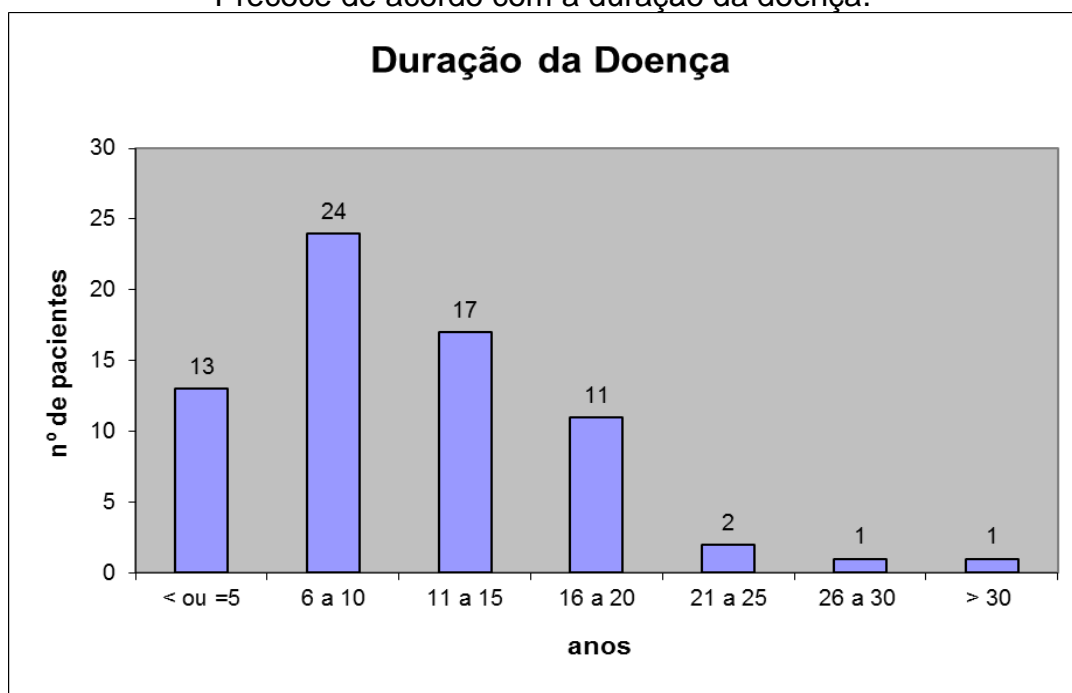


Gráfico 4 – Distribuição dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a duração da doença.



Foram realizados 18 tratamentos cirúrgicos em 15 (21,74%) pacientes: 11 (15,94%) palidotomias, 7 (10,14%) talamotomias e 3 (4,35%) submeteram-se a 2 cirurgias: talamotomia e palidotomia.

5.2 FREQUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS PATOGÊNICAS E ANÁLISE MOLECULAR

Dos 69 pacientes que preenchem os critérios, foram encontrados 5 (7,25%) com variantes patogênicas no gene *PARK2*, 1 (1,52%) com variação patogênica no gene *LRRK2* entre os 66 pacientes testados para esse gene e 63 (91,30%) pacientes sem variantes patogênicas nesses genes (tabela 7). Todas as variantes encontradas em nossos pacientes já tinham sido descritas previamente.

TABELA 7 – Frequência de variantes patogênicas nos genes *PARK2* e *LRRK2* em pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce de acordo com a idade de início da doença.

Idade de início (anos)	Pacientes com variantes <i>PARK2</i> n (%)	Pacientes com variantes <i>LRRK2</i> n (%)	Pacientes sem variantes n (%)	Todos os pacientes n (%)
≤ 20	0	0	3 (4,35%)	3 (4,35%)
21-25	0	0	4 (5,80%)	4 (5,80%)
26-30	1 (1,45%)	0	11 (15,94%)	12 (17,39%)
31-35	0	0	10 (14,49%)	10 (14,49%)
36-40	3 (4,35%)	1 (1,45%)	25 (36,23%)	29 (42,03%)
> 40	1 (1,45%)	0	13 (18,84%)	14 (20,29%)
Total	5	1	63	69

Entre os cinco casos com variações patogênicas no gene *PARK2*, dois (2,9%) eram homozigóticos e três (4,35%) heterozigóticos compostos (tabela 8). A variante p.Asn52fs foi detectada em dois pacientes, um na forma homozigótica e o outro heterozigótica; não havia parentesco entre eles. Também foram encontradas variantes do gene *PARK2* sem significado patológico em quatro (5,8%) pacientes: duas variantes do tipo p.Met192Leu, uma p.Ala82Glu e um paciente com a variante p.Cys387Arg.

A única paciente (1,52%) com variante presente no gene *LRRK2* era heterozigótica para a variante p.Gly2019Ser.

TABELA 8 – Variantes patogênicas do gene *PARK2* em pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce.

Paciente #	Gênero	Exon com variante	Sequência exon 1-12	Dosagem Promotor-exon 1-12	Idade de início	
1	M	2	p.Asn52fs	----	40	homozigose
2	F	1 + prom	----	del prom, ex1	28	homozigose
3	M	2 e 3	----	ex 2,3 dupl/ desconhecida	40	heterozigose composta
4	F	2	p.Asn52fs/ desconhecida	----	40	heterozigose composta
5	M	7	p.Arg256Cys/ desconhecida	----	43	heterozigose composta

5.3 ACHADOS CLÍNICOS

As características clínicas e o perfil de tratamento dos pacientes com variantes patogênicas no gene *PARK2* são mostradas na tabela 9. Ambos os pacientes com mutações do tipo p.Asn52fs tiveram o início da doença na mesma idade, embora um deles tivesse genótipo homozigótico, e o outro, genótipo heterozigótico. Os dois pacientes que tinham o polimorfismo p.Met192Leu apresentaram achados clínicos atípicos: exoftalmia e atrofia facial em um deles, e alucinações, não relacionadas com a terapia medicamentosa, no outro; o segundo destes pacientes tinha história familiar positiva de DP (uma prima materna). Os dados dos grupos de pacientes com e sem variantes patogênicas no gene *PARK2* estão demonstrados na tabela 10.

TABELA 9 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce e variantes patogênicas no gene *PARK2*.

Paciente	1	2	3	4	5
Variante	p.Asn52fs	del prom, ex1	ex 2,3 dupl/ desconhecida	p.Asn52fs/ desconhecida	p.Arg256Cys/ desconhecida
	homozigose	homozigose	heterozigose composta	heterozigose composta	heterozigose composta
Gênero	m	f	m	f	m
Idade de início (anos)	40	28	40	40	43
Idade atual (anos)	75	58	48	44	51
Duração (anos)	35	30	8	4	8
História familiar	não	não	não	não	não
Sintoma inicial	tremor perna	distonia pé	bradicinesia braço	bradicinesia braço	tremor mão
Fenótipo motor	rígido-acinético	rígido-acinético	misto	rígido-acinético	rígido-acinético
UPDRS III (on)	19	39	10	28	13
Hoehn-Yahr	3	4	2	3	1
Depressão	não	não	não	sim	não
MEEM	29	25	30	30	30
Schwab-England	80	60	90	70	90
Tratamento levodopa					
DELD* (mg)	625	1200	850	1300	1100
Duração (anos)	29	s/ informações	7,5	7,5	0,5
Tempo até início	6	s/ informações	0,5	1,5	7,5
Uso da l-dopa até complicações (anos)	21	s/ informações	4	7	----
Discinesias	não	a,b	a,b	a	não
Flutuações	C	c,d,e	c	c,e	não
Cirurgia estereotáxica	não	talamotomia esq palidotomia dir	palidotomia direita	não	não
Imagem	TC normal	assimetria dos ventrículos D>E	TC normal	TC normal	TC normal

*Dose Equivalente de Levodopa Diária

a. pico de dose

b. distonia matutina

c. deterioração de final de dose

d. "on-off"

e. dose sem efeito

TABELA 10 – Características clínicas dos pacientes com Parkinsonismo de Início Precoce, com e sem variantes patogênicas no gene *PARK2*, e com variante patogênica no gene *LRRK2*.

	Variantes <i>PARK2</i> positivas (n=5)	Variantes <i>PARK2</i> negativas (n=63)	Variantes <i>LRRK2</i> positiva (n=1)
Masculino/feminino	3/2	40/23	0/1
Idade atual (anos)	55,2 ± 12,2 (44-75)	46 ± 7,9 (21-65)	59
Idade no início (anos)	38,2 ± 5,8 (28-43)	35.5 ± 7 (19-45)	37
Duração doença (anos)	17 ± 14,3 (4-35)	10.3 ± 5,3 (2-21)	22
História familiar	0	8 (12,7%)	0
Sinais clínicos no início			
Rígido-acinética	2 (40%)	32 (50,8%)	0
Tremor	2 (40%)	27 (42,86%)	1
Distonia	1 (20%)	4 (6,06%)	1
Assimetria	5 (100%)	66 (100%)	1
Sinais clínicos ao exame			
Bradicinesia	5 (100%)	63 (100%)	1
Rigidez	5 (100%)	63 (95,45%)	1
Tremor de repouso	1 (20%)	26 (41,3%)	1
Instabilidade postural	4 (80%)	20 (31,7%)	1
UPDRS	20 ± 8,9 (10-30)	22.5 ± 8,2 (7-47)	44
H&Y	2.6 ± 1,1 (1-4)	2.5 ± 0.6 (1-4)	5
Depressão	1 (20%)	12 (18.18%)	0
Tratamento levodopa			
DDEL ^a (mg)	1015 ± 275 (625-1300)	744 ± 491 (0 - 2115)	800
Duração (anos)	11,1 ± 7,2 (0.5-29)	6.5 ± 4.8 (1.5 - 17)	20
Tempo até início levodopa (anos)	3,9 ± 3,4 (0.5-7.5)	4 ± 3,4 (0.5-8)	7
Anos levodopa até complicações	10,7	4,6	5
Discinesias/flutuações	4 (80%)	32 (50,8%)	1

a. Dose Diária Equivalente de Levodopa

O fato de termos encontrado apenas uma paciente com variante patogênica no gene *LRRK2*, evidentemente, nos impossibilita de apresentar correlações clínicas. As suas características clínicas são mostradas na tabela 10. O sintoma inicial desta paciente foi tremor no membro superior direito, desenvolvendo mais tarde o quadro clínico completo da DP; ela relatava a presença de distonia já na fase inicial da doença, antes mesmo do uso de levodopa. Apesar de ter a DP há 22 anos, ela não tinha demência (MEEM de 23 para um corte de 18), ainda respondia bem ao uso da levodopa, mas apresentava complicações motoras (discinesias de pico de dose, deterioração de final de dose e doses sem efeito).

6 DISCUSSÃO

Uma baixa frequência de variações patogênicas no gene *PARK2* foi encontrada em nossa amostra de pacientes com PIP. A nossa frequência de variações patogênicas no gene *PARK2* (7,25%) foi menor que a relatada na Europa [LESAGE et al., 2006] e quase metade daquela encontrada em outros estudos realizados em nosso país [AGUIAR et al., 2008; CAMARGOS et al., 2009]. Periquet et al, em 2003, estudando 146 pacientes com PIP de diversas origens geográficas e sem história familiar, incluindo casos brasileiros, concluíram que 15% dos pacientes tinham variantes no gene *PARK2* [LESAGE et al., 2006].

No Brasil, Camargos et al., estudando 45 pacientes com PIP, encontraram cinco pacientes (11,1%) com variações patogênicas no gene *PARK2*; 4,4% eram variantes heterozigóticas e 6,6% variantes heterozigóticas compostas [CAMARGOS et al., 2009]. Aguiar et al., 2008, relataram 72 pacientes com PIP e nove (12,5%) tinham uma variante patogênica no gene *PARK2*, sendo duas homozigóticas e sete heterozigóticas. Apenas um estudo brasileiro recente também encontrou uma baixa frequência (2,9%) de variantes patogênicas no gene *PARK2* em 136 pacientes com PIP [MOURA et al., 2013]. Outros estudos publicados que incluíram pacientes de diversas nacionalidades, inclusive brasileiros, confirmaram o frequente envolvimento do gene *PARK2* nos casos de PIP [BERTOLI-AVELLA et al., 2005; CHIEN et al., 2006; BARSOTTINI et al., 2009].

A frequência de variantes no gene *PARK2* em pacientes com PIP é maior quando a história familiar é positiva, sendo estimada em torno de 49% dos casos [DI FONZO et al., 2005; LESAGE et al., 2006; CLARK et al., 2006]. Em nossa amostra de 69 pacientes com PIP, oito pacientes (11,59%) tinham história familiar positiva, mas nenhum deles tinha variante patogênica dos genes *PARK2* ou *LRRK2*.

A ausência de variantes patogênicas nos nossos casos familiares pode ser explicada pelo número pequeno de pacientes na amostra e, também, pelas diferentes origens étnicas dos pacientes relatados em outros estudos brasileiros. Outra possibilidade, mais provável, é que estes pacientes sejam portadores de variantes em genes que não foram analisados ou em genes ainda desconhecidos, pois a ocorrência de casos de DP na família sugere fortemente a presença de mutações genéticas como causa da doença.

Em nossa amostra quatro pacientes apresentaram variantes heterozigóticas no gene *PARK2* consideradas não patogênicas. Algumas variantes heterozigóticas do gene *PARK2* foram descritas em indivíduos assintomáticos, tornando-se complexa a valorização destes achados na patogenia da doença. Foi sugerido que essas variantes heterozigóticas recessivas sejam fatores de risco para a doença [NUYTEMANS et al., 2010]. Achados atípicos foram encontrados em dois desses quatro pacientes, e ambos tinham variantes do tipo p.Met192Leu. Um dos pacientes apresentava alucinações que antecederam o início da DP e o outro paciente tinha exoftalmia e atrofia dos músculos da face. Não encontramos nenhum relato, em outros estudos, da associação desta variante p.Met192Leu com esses achados clínicos atípicos, sugerindo que essa associação tenha sido encontrada ao acaso.

O pequeno número de pacientes com variantes patogênicas no gene *PARK2* impossibilitou uma análise estatística comparativa. Porém, as características clínicas que se destacaram no grupo de pacientes com as variantes patogênicas no gene *PARK2* foram a distonia como sintoma inicial, a ocorrência de tremor de repouso, frequência maior de instabilidade postural e da forma rígido-acinética, escores semelhantes na escala de Hoehn-Yahr, apesar de mais anos de duração da doença, sugerindo uma evolução mais

lenta da doença, e maior latência para o surgimento das complicações da terapia com levodopa, embora com incidência maior de complicações.

Somente um dos nossos pacientes com PIP (1,51%) tinha variante patogênica no gene *LRRK2*, o que pode ser explicado pelo fato de que essas variantes são mais prevalentes em pacientes com idade de início da doença mais tardio [PAISAN-RUIZ et al., 2008]. Assim mesmo, foi mais baixa do que em estudo realizado no Brasil que demonstrou 3,5% de pacientes com PIP que tiveram variantes no gene *LRRK2* [ABDALLA-CARVALHO et al., 2010]. A nossa paciente apresentou tremor na mão direita como sintoma inicial da doença, o que está de acordo com Marras et al. que encontraram o tremor como sendo o sintoma inicial mais comum [MARRAS et al., 2011]. A variante patogênica p.Gly2019Ser no gene *LRRK2* encontrada em nossa paciente é relatada como sendo a mais frequente no Brasil [MUNHOZ et al., 2008; PIMENTEL et al., 2008] e no mundo [ABDALLA-CARVALHO et al., 2010; CHARTIER-HALIN et al., 2011]. A variante p.Gly2019Ser no gene *LRRK2* é responsável por 4-5% dos casos familiares de DP e 1-2% dos casos esporádicos em populações de descendência europeia; 30-40% dos casos familiares e esporádicos de pacientes árabes no norte da África, e 10-30% em judeus Ashkenaziws [BARDIEN et al., 2011]. Na América do Sul, a variante p.Gly2019Ser é estimada estar presente em 3% dos casos familiares e em 2% dos casos esporádicos de DP [MUNHOZ et al., 2008; LESAGE e BRICE, 2012]. Assim sendo, as variantes no gene *LRRK2* são raras nos pacientes com PIP esporádicos.

Embora limitado pela amostra reduzida de pacientes, nosso estudo sugere que as variantes patogênicas nos genes *PARK2* e *LRRK2* são incomuns em nosso meio em pacientes com PIP predominantemente esporádico.

7 CONCLUSÕES

7.1 A frequência de indivíduos com variantes patogênicas no gene PARK2 foi de 7,25% em nossa amostra de 69 pacientes com PIP; no gene LRRK2 a frequência foi de 1,52% em 66 pacientes com PIP.

7.2 Não houve possibilidade de comparação do fenótipo entre os grupos com e sem variantes patogênicas devido ao baixo número de pacientes com essas variantes.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS N, LUCKING CB, RICARD S et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 1999;8:567-574.

ABDALLA-CARVALHO CB, SANTOS-REBOUÇAS CB, GUIMARAES BC et al. Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 2010;17:1479–1481.

ABOU-SLEIMAN PM, HEALY DG, QUINN N et al. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:283-286.

AGUIAR P de C, LESSA PS, GODEIRO C et al. Genetic and Environmental Findings in Early-onset Parkinson's Disease Brazilian Patients. *Mov Disord* 2008;23:1228–1233.

AHLSKOG JE. parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:721-727.

ALVES G, WENTZEL-LARSEN T, AARLAND D, et al. Progression of motor impairment and disability in Parkinson disease. A population-based study. *Neurology* 2005;65:1436-1441.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, quinta edição, Washington, DC, American Psychiatric Association, 2013.

ANNESI G, SAVETTIERI G, PUGLIESE P et al. DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol* 2005;58:803-807.

BARDIEN S, LESAGE S, BRICE A, CARR J. Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease. *Parkin Relat Disord* 2011;17:501-508.

BARSOTTINI OG, FELICIO AC, AGUIAR P de C et al. Clinical and molecular neuroimaging characteristics of Brazilian patients with Parkinson's disease and mutations in PARK2 or PARK8 genes. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2009;67:7-11.

BERTOLI-AVELA AM, GIROUD-BENITEZ JL, AKYOLM A et al. Italian Parkinson Genetics Network: Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:424-431.

BERTOLUCCI PHF, BRUCKI SMD, CAMPACCI SR, JULIANO Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral-impacto da escolaridade. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 1994;52:1-7.

BERTUCCI FILHO D, MUNHOZ RP, LESAGE S et al. Prevalence and Phenotype of Patients with PARK2 or PARK8 Gene Mutations in an Early-Onset Parkinsonism Brazilian Cohort. *J J Neur Neurosci.* 2014, 1(1): 003-5.

BERTUCCI FILHO D, TEIVE HAG, WERNECK LC. Early-onset Parkinson's Disease and Depression. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2007 Mar;65(1):5-10.

BONIFATI V. Genetics of parkinsonism. *Parkinsonism and Related Disorders* 2007;13:S233–S241.

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

BONIFATI V, RIZZU P, VAN BAREN MJ et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256-9.

BONIFATI V, ROCHÉ CF, BREEDVELD GJ, et al. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: Frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005;65:87-95.

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

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

CHARTIER-HARLIN MC, DASCHSEL JC, VILARINO-GUELL C et al. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89:398–406.

CHIEN HF, ROHÉ CF, COSTA MD et al. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics* 2006;7:13-19.

CHOI JM, WOO MS, MA HI, et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008;9:263-269.

CLARK LN, AFRIDI S, KARLINS E et al. Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson's disease. *Arch Neurol* 2006;63:548-552.

CONNOLLY BS, LANG AE. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 2014;311(16):1670-1683.

COOKSON MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2010;11:791-797.

CORREIA GUEDES L, FERREIRA JJ, ROSA MM et al. Worldwide frequency of G2019S *LRRK2* mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16:237-242.

DAWSON TM, DAWSON VL. The Role of Parkin in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2010;25(1):S32-S39.

De ANDRADE LA. Early onset Parkinson's disease. Critical review of the literature. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 1996;54:691-704.

DELONG MR, JUNCOS JL. Parkinson's disease and Other Movement Disorders. In Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw Hill, 2005:2406-2418.

DIAMOND SG, MARKHAM CH, HOEHN M, et al. Effect of age on progression and mortality in Parkinson's disease. *Neurology* 1989;39:1187-1190.

DI FONZIO A, ROHE CF, FERREIRA J et al. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005;365:412-415.

DJARMAT A, HEDRICH K, SVETEL M et al. Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 2004;23:525.

FOLSTEIN MF, FOLSTEIN SE, MCHUGH PR. "Mini-mental state": a practical method for grading the mental state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-198.

FRIEDMAN A. Old-onset Parkinson's disease compared with young-onset disease: clinical differences and similarities. *Acta Neurol Scand* 1994;89:258-261.

GELB DJ, OLIVER G, GILMAN S. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1999;56:33-39.

GERSHANIK OS, LEIST A. Juvenile onset Parkinson's disease. In *Adv. Neurol.*, Vol 45 Ed. By Yahr, M D & Bergmann, K J, New York: Raven Press, 1986:213-216.

GOLDMAN SM, TANNER CM, OLANOW CW, et al. Occupation and parkinsonism in three movement disorders clinics. *Neurology* 2005;65:1430-1435.

GOMEZ-AREVALO G, JORGE R, GARCIA S, et al. Clinical and pharmacological differences in early-versus late-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1997;12:277-284.

HAMILTON M. A Rating Scale for Depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1960;23:56-62.

HAN J-Y, KIM J-S, SON JH. Mitochondrial Homeostasis Molecules: Regulation by a Trio of Recessive Parkinson's Disease Genes. *Exp Neurobiol*. 2014;23(4):345–351.

HELY MA, MORRIS JG, REID WG, et al. Age at onset: the major determinant of outcome in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1995;92:455-463.

HERING R, STRAUSS KM, TAO X et al. Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* 2004;24:321-329.

HORTA W. Escalas Clínicas para Avaliação de Pacientes com Doença de Parkinson. In Meneses MS, Teive HAG (eds). *Doença de Parkinson*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003:153-162.

HUGHES AJ, DANIEL SE, KILFORT L, LEES AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *JNNP* 1992;55:181-184

JANKOVIC J, McDERMOTT M, CARTER J, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 1990;40:1529-1534.

KHAN NL, GRAHAM E, CRITHLEY P et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003;126:1279–1292.

KILARSKI LL, PEARSON JP, NEWSWAY V, et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27: 1522-1529.

KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI Net al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-608.

KLEIN C, LOHMANN-HEDRICH K, ROGAEVA E, SCHLOSSMACHER MG, LANG AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007;6:652-662.

KOZIOROWSKI D, HOFFMAN-ZACHARSKA D, SLAWEK J et al. Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;16:136-138.

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

LESAGE S, BRICE A. Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. *Park Relat Disord* 2012;18:S66-S70.

LESAGE S, DURR A, TAZIR M et al. G2019S as a cause of Parkinson’s disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006;354:422-423.

LESAGE S, IBANEZ P, AGID Y et al. The G2019S LRRK2 mutation in autosomal dominant European and North African Parkinson’s disease is frequent and its penetrance is age-dependent. *Neurology* 2005;64:1826-1831.

LUCKING CB, DURR A, BONIFATI V, et al. Association between early-onset Parkinson’s disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000;342:1560-1567.

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

MARRAS C, TANNER CM. Epidemiology of Parkinson’s disease. In: Watts RL, Koller WC, eds. *Movement disorders: neurologic principles & practice*. 2nd ed. New York:McGraw-Hill, 2004:177-195.

MELLIK GD, SIEBERT GA, FUNAYAMA M, et al. Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson’s disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:105-109.

MOURA KCV, CAMPOS JUNIOR M, DE ROSSO ALZ et al. Genetic Analysis of *PARK2* and *PINK1* Genes in Brazilian Patients with Early-Onset Parkinson's Disease. *Dis Markers* 2013; 35:181-185.

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

NUYTEMANS K, THEUNS J, CRUTS M et al. Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes. A Mutation Update. *Hum Mutat.* 2010;31:763-780.

OZELIUS LJ, SENTHIL G, SAUNDERS-PULMAN R et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006;354:424-5.

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

PAISAN-RUIZ C, NATH P, WASHECKA N, GIBBS JR, SINGLETON AB. Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Hum Mutat* 2008;29:485–490.

PERIQUET M, LATOUCHE M, LOHMANN E, et al. Parkin mutations are frequent with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003;126:1271-1278.

PIMENTEL MM, ABDALLA CB, PEREIRA JC et al. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett* 2008;433:17-21.

POLYMEROPOULOS MH, LAVEDAN C, LEROY E et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.

POULOPOULOS M, LEVY OA, ALCALAY RN. The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:831-42.

PUSCHMANN A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism and Related Disorders* 2013;19:407-415.

QUINN N, CRITCHLEY P, MARSDEN CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1987;2:73-91.

RAJPUT AH, VOLL A, RAJPUT ML, ROBINSON CA, RAJPUT A. Course in Parkinson disease subtypes: a 39-year clinicopathologic study. *Neurology*. 2009;73(3):206-212.

RICHARDS S, AZIZ N, BALE S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-424.

RILEY BE, LOUGHEED JC, CALLAWAY K et al. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat. Commun.* 2013; DOI: 10.1038/ncomms2982.

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

SAMARANCH L, LORENZO-BETANCOR O, ARBELO JM et al. PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* 2010;133:1128-1142.

SCAFF M, BARBOSA ER, ASSIS JL, et al. Parkinsonismo juvenil; considerações a respeito de 10 casos. *Arq.-Neuropsiquiatr* 1980;38:385-390.

SCARFFE LA, STEVENS DA, DAWSON VL et al. Parkin e PINK1: Much more than mitophagy. *Trends in Neurosc* 2014;37(6):315-324.

SCHRAG A, BEN-SHLOMO Y, BROWN R, et al. Young-Onset Parkinson's Disease Revisited-Clinical Features, Natural History, and Mortality. *Mov Disord* 1988;13:885-894.

SCHRAG A, HOVRIS A, MORLEY D, et al. Young versus older-onset Parkinson's disease: impact of disease and psychosocial consequences. *Mov Disord* 2003;18:1250-1256.

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

SUZUKI M, HATTOEI H, ORIMO S et al. Preserved myocardial [123I]metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: first case report. *Mov Disord* 2005;20:634-636.

TARSY D. Treatment of Parkinson disease: a 64-year-old man with motor complications of advanced Parkinson disease. *JAMA*. 2012;307(21):2305-2314

TOMLISON CL, STOWE R, PATEL S et al. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25(15):2649-2653.

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

VILARINO-GUELL C, WIDER C, ROSS OA et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89:162-167.

WARD CD, GIBB WR. Research criteria for Parkinson's disease. In *Adv. Neurol.*, Vol 53. Ed by Streifler MB, Korczyn AD, Melamed E, Youdim MBH. New York: Raven Press, 1990:245-249.

WIDER C, SKIPPER L, SOLIDA A et al. Autosomal dominant dopa-responsive parkinsonism in a multigenerational Swiss family. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:465-470

WOOTEN GF, CURRIE LJ, BOYBJERG VE, LEE JK, PATRIE J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2004;75:637-639.

YAMAMURA Y, SOBUE I, ANDO K, IIDA M, YANAGI T. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology* 1973;23:239-244.

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

9 ANEXOS

**ANEXO 1 – UNITED KINGDOM PARKINSON'S DISEASE SOCIETY BRAIN
BANK CLINICAL DIAGNOSTIC CRITERIA**

1ª Etapa – Diagnóstico da Síndrome Parkinsoniana

- Bradicinesia
- No mínimo um dos seguintes:
 - o Rigidez muscular
 - o Tremor de repouso 4-6 Hz
 - o Instabilidade postural não causada por déficit primariamente visual, vestibular, cerebelar ou de propriocepção

2ª Etapa – Critérios de exclusão para Doença de Parkinson

- História de AVE's com progressão do quadro parkinsoniano *stepwise*
- História de traumas de crânio repetidos
- História de encefalite
- Crises oculógiras
- Tratamento com neuroléptico no início dos sintomas
- Remissão sustentada
- Doença estritamente unilateral após 3 anos
- Paralisia supranuclear
- Sinais cerebelares
- Disfunção autonômica precoce
- Demência precoce
- Sinal de Babinski
- Estudo de imagem com tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante
- Ausência de resposta a doses altas de levodopa
- Exposição ao MPTP

3ª Etapa – Critérios prospectivos suportivos para Doença de Parkinson

Três ou mais são exigidos para o diagnóstico definitivo de DP em combinação com a 1ª etapa:

- Início unilateral
- Presença de tremor de repouso
- Doença progressiva
- Assimetria persistente acometendo mais o lado onde iniciou a doença
- Excelente resposta à levodopa (70-100%)
- Coreia grave induzida pela levodopa
- Resposta à levodopa por 5 anos ou mais
- Duração da doença de 10 anos ou mais

ANEXO 2 – CRITÉRIOS DO DSM-IV PARA DIAGNÓSTICO DE DEPRESSÃO

Humor deprimido	Humor deprimido na maior parte do dia, na maioria dos dias
Anedonia	Interesse diminuído ou falta de prazer nas atividades
Alteração de peso	Perda ou ganho de peso substancial involuntários
Distúrbio do sono	Insônia ou hipersônia
Alteração psicomotora	Agitação ou lentificação psicomotora
Perda de energia	Fadiga ou perda de energia
Culpa	Sentimento de culpa excessiva ou baixa auto-estima
Falta de concentração	Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se
Ideação suicida	Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

ANEXO 3 - ESCALA DE DEPRESSÃO DE HAMILTON

1. DEPRIMIDO (Tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)

- 0. Ausente.
- 1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
- 2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
- 3. Comunica os sentimentos não com palavras, mas com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.
- 4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não verbal do paciente.

1. SENTIMENTOS DE CULPA

- 0. Ausente
- 1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.
- 2. Ideias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más ações.
- 3. A doença atual é um castigo.
- 4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

2. SUICÍDIO

- 0. Ausente.
- 1. Sente que a vida não vale a pena.
- 2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.
- 3. Ideias ou gestos suicidas.
- 4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria marcar 4).

4. INSÔNIA INICIAL

- 0. Sem dificuldade para conciliar o sono.
- 1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.
- 2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

5.INSÔNIA INTERMEDIÁRIA

- 0. Sem dificuldade.
- 1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.
- 2. Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2 (exceto para urinar).

6. INSÔNIA TARDIA

- 0. Sem dificuldades.
- 1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir.
- 2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

7. TRABALHO E ATIVIDADES

0. Sem dificuldades.
1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionadas a atividades, trabalho ou passatempos.
2. Perda de interesse por atividades (passatempo ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).
3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).
4. Parou de trabalhar devido a doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas; marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

8. RETARDO (Lentidão de ideias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)

0. Pensamento e fala normais.
1. Leve retardo à entrevista.
2. Retardo óbvio à entrevista.
3. Entrevista difícil.
4. Estupor completo.

9. AGITAÇÃO

0. Nenhuma.
1. Inquietude.
2. Brinca com as mãos, com cabelos, morde os lábios.

10. ANSIEDADE PSÍQUICA

0. Ausente.
1. Tensão e irritabilidade subjetivas.
2. Preocupação com trivialidades.
3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.
4. Medos expressos sem serem inquiridos.

11. ANSIEDADE SOMÁTICA

Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:

Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação;

Cardiovasculares: palpitações, cefaleia;

Respiratórios: hiperventilação, suspiros,

Autonômicos: frequência urinária, sudorese.

0. Ausente.
1. Leve.
2. Moderada.
3. Grave.
4. Incapacitante

12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTROINTESTINAIS

0. Nenhum.
1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdome
2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.

13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL

0. Nenhum
1. Peso nos membros, nas costelas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaleia, mialgias.
2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2

14. SINTOMAS GENITAIS

Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais.

0. Ausentes.
1. Leves.
2. Intensos.

15. HIPOCONDRIA

0. Ausente.
1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo).
2. Preocupação com a saúde.
3. Queixas frequentes, pedidos de ajuda, etc.
4. Ideias delirantes hipocondríacas.

16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)

A- Quando avaliada pela história clínica.

0. Sem perda de peso.
1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.
2. Perda de peso definida.
3. Não avaliada.

B- Avaliada semanalmente pelo médico responsável, quando são medidas alterações reais de peso.

0. Menos de 0,5 kg de perda por semana.
1. Mais de 0,5 KG de perda por semana.
2. Mais de 1 kg de perda por semana.
3. Não avaliada.

17. CONSCIÊNCIA

0. Reconhece que está deprimido e doente.
1. Reconhece a doença, mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
2. Nega estar doente.

ANEXO 4 - MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM)

(1-5) ORIENTAÇÃO TEMPORAL				
Dia do mês			C	E
Dia da semana			C	E
Mês			C	E
Ano			C	E
Hora (sem olhar no relógio)			C	E
(6-10) ORIENTAÇÃO ESPACIAL				
Local específico			C	E
Local genérico			C	E
Bairro ou rua próxima			C	E
Cidade			C	E
Estado			C	E
(11-13) MEMÓRIA IMEDIATA				
Vaso			C	E
Carro			C	E
Tijolo			C	E
(14-18) ATENÇÃO E CÁLCULO				
100 - 7 ou MUNDO ao contrário				
93	86	79	72	65
CE	CE	CE	CE	CE
(19-21) MEMÓRIA DE EVOCAÇÃO				
Vaso			C	E
Carro			C	E
Tijolo			C	E
(22-25) LINGUAGEM				
Nomeação	Relógio	C E	Caneta	C E
Repetição da frase			C	E
"nem aqui, nem ali, nem lá"			C	E
Comando escrito	"FECHE OS OLHOS"		C	E
(26-28) PRAXIA				
Comando em três estágios	Mão direita		C	E
	Dobrar		C	E
	Colocar no chão		C	E
(29) ESCRITA				
Frase com começo, meio e fim			C	E
(30) HABILIDADE CONSTRUTIVA				
Cópia dos 2 pentágonos interseccionados			C	E

C: Certo E: Errado

ANEXO 5 - ESCALA DE ESTADIAMENTO DE HOEHN E YAHR

Estágio 0	Nenhum sinal da doença
Estágio 1	Doença unilateral
Estágio 1,5	Envolvimento unilateral e axial
Estágio 2	Doença bilateral, sem comprometer o equilíbrio.
Estágio 2,5	Doença bilateral leve, recuperando no teste de puxar o paciente pelas costas.
Estágio 3	Doença bilateral de leve a moderada; alguma instabilidade postural; fisicamente independente.
Estágio 4	Incapacidade grave; ainda capaz de andar e ficar ereto sem ajuda.
Estágio 5	Confinado à cadeira de rodas: necessita de ajuda.

**ANEXO 6 - UNIFIED PARKINSON'S DISEASE RATING SCALE (UPDRS)-
PARTE MOTORA**

<p>Fala</p> <p>0 – Normal. 1 – Perda discreta da expressão, do volume ou dicção. 2 – Comprometimento moderado. Arrastado, monótono mas compreensível. 3 – Comprometimento grave, difícil de ser entendido. 4 – Incompreensível.</p>	<p>Expressão facial</p> <p>0 – Normal. 1 – Hipomímia mínima. 2 – Diminuição pequena, mas anormal da expressão facial. 3 – Hipomímia moderada, lábios caídos/afastados por algum tempo. 4 – Fascies em máscara ou fixa, com perda grave ou total da expressão facial. Lábios afastados ¼ de polegada ou mais.</p>
<p>Tremor de repouso</p> <p>0 – Ausente. 1 – Presente, mas infrequente ou leve. 2 – Persistente, mas de pouca amplitude ou moderado em amplitude mas presente de maneira intermitente. 3 – Moderado em amplitude tanto na ação como mantendo uma postura. 4 – Grande amplitude e presente a maior parte do tempo.</p>	<p>Tremor postural ou de ação das mãos</p> <p>0 – Ausente. 1 – Leve, presente com a ação. 2 – Moderado em amplitude, presente com a ação. 3 – Moderada em amplitude tanto na ação como mantendo uma postura. 4 – Grande amplitude, interferindo com a alimentação.</p>
<p>Rigidez</p> <p>0 – Ausente. 1 – Pequeno ou detectável somente quando ativado por movimentos em espelhos ou outros. 2 – Leve a moderado. 3 – Marcante, mas pode realizar movimento completo da articulação. 4 – Grave, e o movimento completo da articulação se consegue com grande dificuldade.</p>	<p>Bater dos dedos continuamente</p> <p>0 – Normal. 1 – Leve lentidão e/ou redução na amplitude. 2 – Comprometimento moderado. Fadiga precoce e bem clara. Pode ter paradas ocasionais durante o movimento. 3 – Comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando. 4 – Realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.</p>
<p>Movimentos das mãos (abrir e fechar rápido)</p> <p>0 – Normal. 1 – Lentidão leve e/ou redução em amplitude 2 – Comprometimento moderado. Fadiga precoce bem clara. Pode ter paradas ocasionais durante o movimento. 3 – Comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando. 4 – Realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.</p>	<p>Movimentos rápidos alternados das mãos</p> <p>0 – Normal. 1 – Lentidão leve e/ou redução em amplitude. 2 – Comprometimento moderado. Fadiga precoce bem clara. Pode ter paradas ocasionais durante o movimento. 3 – Comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando. 4 – Realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.</p>

<p>Agilidade da perna (calcanhar no chão)</p> <p>0 – Normal. 1 – Lentidão leve e/ou redução em amplitude. 2 – Comprometimento moderado. Fadiga precoce bem clara. Pode ter paradas ocasionais durante o movimento. 3 – Comprometimento grave. Hesitação frequente para iniciar o movimento ou paradas durante o movimento que está realizando. 4 – Realiza o teste com grande dificuldade, quase não conseguindo.</p>	<p>Levantar de uma cadeira</p> <p>0 – Normal. 1 – Lento: ou pode precisar de mais de uma tentativa. 2 – Levanta-se apoiando os braços na cadeira. 3 – Tende a cair para trás e pode tentar se levantar mais de uma vez, mas consegue se levantar. 4 – Incapaz de levantar-se sem ajuda.</p>
<p>Postura</p> <p>0 – Normal em posição ereta. 1 – Não bem ereto, levemente curvado para frente: pode ser normal para pessoas mais velhas. 2 – Moderadamente curvado para frente, definitivamente anormal, pode inclinar-se um pouco para os lados. 3 – Acentuadamente curvado para frente com cifose, inclinação moderada para uns dos lados. 4 – Bem fletido com anormalidade acentuada da postura.</p>	<p>Marcha</p> <p>0 – Normal. 1 – Anda lentamente: pode arrastar os pés com pequenas passadas, mas não há festinação ou propulsão. 2 – Anda com dificuldade mas precisa de pouca ou nenhuma ajuda: pode apresentar alguma festinação, passos curtos ou propulsão. 3 – Comprometimento grave da marcha, necessitando de ajuda. 4 – Não consegue andar sozinho, mesmo com ajuda.</p>
<p>Estabilidade postural</p> <p>0 – Normal. 1 – Retropulsão, mas se recupera sem ajuda. 2 – Ausência de resposta postural: cairia se não fosse ajudado pelo examinador. 3 – Muito instável, tende a perder o equilíbrio espontaneamente. 4 – Incapaz de ficar ereto sem ajuda.</p>	<p>Bradíinesia e hipocinesia corporal</p> <p>0 – Nenhum. 1 – Lentidão mínima. Pode ser normal em algumas pessoas: Possível redução na amplitude. 2 – Movimento definitivamente anormal. 3 – Lentidão moderada. Pobreza de movimentos ou com pequena amplitude. 4 – Lentidão acentuada. Pobreza de movimentos ou com pequena amplitude.</p>

**ANEXO 7 - ESCALA DE ATIVIDADES DA VIDA DIÁRIA DE SCHWAB-
ENGLAND**

100%	Completamente independente. Capaz de realizar afazeres diários sem dificuldades ou lentidão. Não percebe qualquer dificuldade.
90%	Completamente independente. Capaz de realizar afazeres diários, mas com alguma dificuldade ou lentidão. Pode gastar o dobro do tempo. Começa a perceber dificuldades.
80%	Completamente independente na maioria dos afazeres. Gasta duas vezes mais tempo. Consciente da dificuldade e lentidão.
70%	Não completamente independente. Mais dificuldades com alguns afazeres. Três a quatro vezes mais lento em alguns afazeres. Gasta a maior parte do tempo fazendo as atividades diárias.
60%	Alguma dependência. Pode ainda realizar a maioria dos afazeres, mas extremamente lento e com muito esforço. Erros. Alguns afazeres impossíveis de serem realizados.
50%	Mais dependente. Precisa de ajuda com a maioria dos afazeres. Dificuldade para todas as atividades.
40%	Muito dependente. Necessita de ajuda para a maioria dos afazeres. Realiza muito pouco sozinho.
30%	Com esforço faz alguma coisa sozinho ou começa a fazer sozinho. Necessita de muita ajuda.
20%	Não realiza nada sozinho. Invalidez grave.
10%	Totalmente dependente. Completamente inválido.
0	Funções vegetativas não funcionam, tais como deglutir, urinar e defecar. Confinado ao leito.

ANEXO 8 - TERMO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Delcio Caran Bertucci Filho
Neste

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: "PARKINSONISMO PRECOCE: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO DO GENE PARKINA E CORRELAÇÃO CLÍNICA", foi analisado com pendência pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de janeiro de 2011. Após analisada a resposta da pendência, este CEP/HC considera o projeto aprovado em 25 de fevereiro de 2011. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0344.0.208.000-11
Registro CEP: 2399.006/2011-01

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 28 de agosto de 2011.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 9 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você tem uma doença neurológica que se denomina Doença de Parkinson. Na maioria dos pacientes esta doença começa após os 60 anos de idade, porém em 5 a 10% dos pacientes, como é o seu caso, o início dos sintomas ocorre antes dos 40 anos sendo então chamada de Doença de Parkinson de Início Precoce. Nestes casos a repercussão sócio-econômica da doença é muito mais importante porque atinge pessoas numa faixa etária ainda bastante produtiva e que terão a doença por vários anos.
- b) Você está sendo convidado a participar deste estudo intitulado "Estudo Clínico de Pacientes com Doença de Parkinson de Início Precoce" que tem como objetivo mostrar que os sintomas iniciais, a resposta aos medicamentos e a evolução da doença neste grupo especial de pacientes são diferentes daqueles que tem a doença de início tardio. Sabe-se também que quanto mais precoce é o início dos sintomas, maior é a chance de haver uma alteração genética nestes pacientes. Para que isto seja possível, você será submetido a uma consulta médica composta de sua história clínica e exame físico. Serão solicitados exames de sangue e tomografia de crânio rotineiros para o diagnóstico e acompanhamento da sua doença. Além disto, será feita coleta de sangue específica para verificar se você é portador ou não de uma mutação, isto é, uma alteração genética conhecida relacionada com a Doença de Parkinson.
- c) Como em qualquer tratamento você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados com a coleta de sangue.
- d) O risco que envolve a sua participação neste estudo é mínimo, pois é a possibilidade de um pequeno hematoma no local da coleta do sangue.
- e) Para tanto você deverá comparecer no Hospital de Clínicas para consultas médicas de acompanhamento e coleta de exame de sangue.
- f) O médico Dr. Délcio Bertucci Filho – tel: 42 2246466 será o responsável pelo seu tratamento e fará o acompanhamento através de consultas regulares conforme consta no padrão Ético e Vigente no Brasil. Em casos de emergência os pacientes devem procurar o serviço de Pronto-Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (24 hs).

- g) Você também, se desejar poderá optar por uma abordagem alternativa ao que está sendo proposto, que consiste em: não realizar os testes propostos e permanecer com diagnóstico presuntivo do seu quadro.
- h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc...) não são da responsabilidade do paciente.
- m) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Nome do pesquisador

Data ___/___/___

Data ___/___/___

ANEXO 10 - PUBLICAÇÃO

Jacobs Journal of Neurology and Neuroscience

Research Article

Prevalence and Phenotype of Patients with PARK2 or PARK8 Gene Mutations in an Early-Onset Parkinsonism Brazilian Cohort

Delcio Bertucci Filho¹, Renato P. Munhoz¹, Suzanne Lesage², Alexis Brice², Salmo Raskin³ and Helio A. G. Teive¹

¹Movement Disorders Unit, Neurology Service, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Pr, Brazil

²Inserm, U975, Paris, France

³Genetika Laboratory, Curitiba, Pr, Brazil

*Corresponding author: Dr. Delcio Bertucci Filho, MD, Rua Marechal Deodoro 575, Ponta Grossa PR 84010-030 Brazil,

Tel: 55 42 3224-6466; E-mail: dbertucci@uof.com.br

Received: 07-15-2014

Accepted: 07-20-2014

Published: 07-30-2014

Copyright: © 2014 Delcio

Research Article

All authors have contributed to the work and agree with the presented findings. The paper has not been published before nor is being considered for publication in another journal.

Abstract

Objective: To estimate the prevalence of mutations in the PARK 2 or PARK 8 genes and characterize their phenotypes in a Brazilian cohort of early-onset Parkinsonism (EOP).

Methods: A total of sixty-nine unrelated patients with age at onset ≤ 45 were screened.

Results: Mean age of symptoms onset was 35.8 ± 6.8 years. A positive family history of Parkinsonism was found in 8 (11, 59%) patients. Molecular analysis detected five patients (7, 24%) with PARK2 mutations (two homozygous and three compounds heterozygous) and one patient (1.52%) with a heterozygous PARK8 G2019S mutation. The motor phenotype most prevalent in the patients with PARK2 mutations was the rigid-akinetic with postural instability in four (80%); dystonia at disease onset was present in one (20%). The patient with PARK8 mutation had tremor and dystonia at the disease onset but latter developed the rigid-akinetic motor phenotype with severe postural instability.

Conclusions: Although we acknowledge the caveat of examining a limited sample size, our study suggests that PARK2 and PARK8 mutations are uncommon in Brazilian patients with EOP.

Keywords: Early-Onset Parkinsonism, PARK2, Parkin, PARK8, LRRK2, Parkinson's Disease, Parkinsonism.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease [1]. Although PD was long considered a non-genetic disorder of 'sporadic' origin, 5–10% of patients are now known to harbor monogenic forms. Mutations in seven genes are robustly associated with autosomal dominant (SNCA/PARK1, PARK4, LRRK2/PARK8, EIF4G1, VPS35) or recessive

(Parkin/PARK2, PINK1/PARK6, DJ1/PARK7) PD or Parkinsonism [2-5].

The PARK2 (Parkin) gene spans 1, 35 Mb of genomic DNA, contains 12 exons and it encodes the parkin protein, an E3 ubiquitin-protein ligase that targets specific substrates for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway [6]. Mu-

Mutations in PARK2 are the most common known cause of early-onset parkinsonism (EOP), accounting for at least 15% of sporadic cases and 50% of those with recessive inheritance with a clear inverse correlation with age at onset [7,8]. From a phenotypic standpoint patients with PARK2 mutations may have a different clinical profile from those who do not have the mutation including early-onset lower limb dystonia, hyperactive deep tendon reflexes, a more symmetrical motor symptoms onset, a tendency toward a greater response to levodopa despite lower doses [9], a slower disease course and atypical clinical presentation at onset [10].

The PARK8 (leucine-rich repeat kinase 2 - LRRK2) gene was identified in 2004 [11,12] and consists of 51 exons (172,542 bases) that encode a 2,527-amino acid protein called dardarin which it is a multi-domain protein containing enzymatic domains of a GTP-ase and a kinase, along with the protein interaction motifs LRR (leucine-rich repeat) and WD40 [13]. PARK8 mutations are now recognized as the most common cause of genetic Parkinsonism, accounting for 10% of autosomal dominant cases [14] and 3.6% of sporadic cases [15]. Mutations in this gene are mostly associated with a classic PD-like phenotype with age at onset of 50–70 years, variable penetrance and phenotype similarities between patients with homozygous and heterozygous mutations [16] although some studies have also found an association with EOP [17,18].

The aims of this study were to estimate the prevalence of PARK2 or PARK8 gene mutations and characterize their phenotypes in a cohort of Brazilian patients with EOP.

Materials and Methods

Patients and Families: The study was carried out at the Movement Disorders Unit, Neurology Service, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná, and Curitiba, Brazil. Cases were recruited at this center and at the State of Paraná Parkinson Association. Sixty-nine unrelated patients with age at onset \leq 45 years were selected according to the Queen Square Brain Bank Criteria [19]. Eight patients (11.59%) had recessive inheritance of Parkinsonism. There were no cases of known consanguinity. One patient had two daughters with lower limb dystonia; however both were unavailable for examination.

The motor phenotype was divided into three forms: tremor-dominant when resting tremor was the main feature, with non-debilitating rigidity and/or bradykinesia; rigid-akinetic when tremor was not present, and mixed form [20]. DSM-V criteria were used to diagnose depression and the Mini-Mental State Examination (MMSE) to diagnose dementia. MMSE cut-off levels for diagnosing dementia were 13 for illiterate patients, 18 for patients with 1 to 8 years of schooling and 26 for patients with more than 8 years, as previously established for Brazilian patients [21]. The overall levodopa

equivalent daily dose (LEDD) was obtained using the formula described by Tomlinson et al. [22]. Disease stage was determined according to the Hoehn and Yahr scale (H&Y). The severity of the motor signs was quantified using the Unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS) part III and the limitations on daily life activities was assessed by the Schwab and England scale. Patients were assessed in the "on" levodopa period.

Molecular Analysis: Blood samples were taken from all 69 index cases. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard procedures at the Genetika Laboratory, Curitiba, Brazil. The genetic analysis was carried out at Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France, using methods described by Lesage et al. [23]. All 69 patients were tested for mutations in the PARK2 gene, and 66 for mutations in the LRRK2 gene. The study was approved by the Ethics Committee at the Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná.

Results

Prevalence and Molecular Analysis: Among the 69 patients included, six (8, 69%) were found to have a mutation in at least one allele: five (7, 25%) had a mutation in the PARK2 gene and one (1.45%) in the PARK8 gene.

Table 1 - Prevalence of PARK2 and LRRK2 gene mutations in patients with EOP stratified according to age of onset

Age of onset (years)	Patients with PARKIN mutation n (%)	Patients with LRRK2 mutation n (%)	Patients Without mutation n (%)	All patients n (%)
\leq 20	0	0	3 (4.35%)	3 (4.35%)
21-25	0	0	4 (5.80%)	4 (5.80%)
26-30	1 (1.45%)	0	11 (15.94%)	12 (17.39%)
31-35	0	0	10 (14.49%)	10 (14.49%)
36-40	3 (4.35%)	1 (1.45%)	25 (36.29%)	29 (42.09%)
> 40	1 (1.45%)	0	13 (18.94%)	14 (20.29%)
Total	5	1	63	69

EOP: Early Onset Parkinsonism.

Of the five cases with PARK2 gene mutations, two were homozygous (2, 9%), and the remainder (4, 35%) compound heterozygous. The Asn52fs mutation was present in two unrelated patients. We also found polymorphisms of the PARK2 gene in four (5, 8%) other patients: two with Met192Leu, one with A82E and one patient with the rare variant C377R. The only patient with PARK8 mutation was heterozygous for G2019S mutation.

Table 2 - PARK2 mutations in patients with EOP

Patient #	Gender	Gene Exon Mutation	Sequence exon 1-12	Dosage Promoter-exon 1-12	Age at onset	
1	M	2	Asn52fs	----	40	Homozygous
2	F	1 + Prom	----	del prom ex1	28	Homozygous
3	M	2,3	----	Ex 2,3 het dupl	40	Compound heterozygous
4	F	2	Asn52fs	----	40	Compound heterozygous
5	M	7	Arg256Cys	----	43	Compound Heterozygous

EOP: Early Onset Parkinsonism.

Clinical Findings: Forty three patients were males (62.3%). The clinical features and the treatment profile of the patients with PARK2 gene mutations are shown in Table 3. In both patients with either heterozygous or homozygous Asn-52Stop81 mutation, age at onset was the same (40 years). Both patients with Met192Leu polymorphisms had atypical findings: bulging eyes in one and facial muscle atrophy in the other; one had a positive family history for PD (a female maternal cousin). The clinical profile of the groups with and without PARK2 mutations are shown in Table 4.

Table 3 - Clinical features of patients with EOP and PARK2 mutations

Patient	1	2	3	4	5
Mutation	Asn52fs	del prom ex1	Ex 2,3 het dupl	Asn52Stop81	Arg256Cys
	Homozygous	Homozygous	Compound heterozygous	Compound heterozygous	Compound heterozygous
Gender	M	F	M	F	M
Age at onset (years)	40	28	40	40	43
Current age (years)	75	58	48	44	51
Duration (years)	35	30	8	4	8
Family history	No	no	no	no	No
Initial symptom	Lower limb tremor	Dystonia lower limb	Bradykinesia upper limb	Bradykinesia upper limb	Tremor upper limb
Motor phenotype	Rigid-akinetic	Rigid-akinetic	Mixed form	Rigid-akinetic	Rigid-akinetic
UPDRS III score(m)	19	39	10	28	13
Hoehn-Yahr score	3	4	2	3	1
Depression	No	no	no	yes	No
MMSE score	29	25	30	30	30
Schwab England	80	80	90	70	90
Levodopa treatment					
Daily LED ^a	625	1200	850	1300	1100
Duration (years)	29	no information	7,5	7,5	0,5
Time for L-dopa use	6	no information	0,5	1,5	7,5
L-dopa use until complications (years)	21	no information	4	7	
Dyskinesias	No	a,b	a,b	a	No
Fluctuations	C	c,d,e	c	c,e	No
Stereotactic surgery	No	Left thalamotomy/ right pallidotomy	Right pallidotomy	no	No
Imaging study	Normal CT scan	Assymetry of lateral ventricles (B-L)	Normal CT scan	Normal CT scan	Normal CT scan

EOP: Early Onset Parkinsonism

^a Levodopa Equivalent Dose

a. peak dose

b. morning dystonia

c. wearing off

d. on-off

e. no-effect dose

Table 4 - Clinical characteristics of EOP patients with and without PARK2 mutations and with LRRK2 mutation

	PARK2 positive (n=5)	PARK2 negative (n=63)	LRRK2 positive (n=1)
Male/female ratio	3/2	40/23	0/1
Current age (years)	55,2 ± 12,2 (44-75)	46 ± 7,9 (21-65)	59
Age at onset (years)	38,2 ± 5,8 (28-43)	35,5 ± 7 (19-45)	37
Disease duration (years)	17 ± 14,3 (4-35)	10,3 ± 5,3 (2-21)	22
Family history	0	7 (12,7%)	No
Clinical signs at onset			
Rigid-akinetic	2 (40%)	32 (50,8%)	No
Dominant tremor	2 (40%)	27 (42,86%)	yes
Dystonia	1 (20%)	4 (6,06%)	yes
Asymmetry	5 (100%)	66 (100%)	yes
Clinical signs on examination			
Bradykinesia	5 (100%)	63 (100%)	yes
Rigidity	5 (100%)	63 (95,45%)	yes
Resting trem instability or	1 (20%)	26 (41,3%)	no
Postural	4 (80%)	20 (31,7%)	yes
UPDRS ^a	20 ± 8,9 (10-30)	22,5 ± 8,2 (7-47)	44
Hoehn-Yahr	2,6 ± 1,1 (1-4)	2,5 ± 0,6 (1-4)	5
Depression	1 (20%)	12 (18,8%)	no
Levodopa treatment			
Daily LED ^b (mg)	1015 ± 275 (625-1300)	744 ± 491 (0 ± 2115)	800
Duration (years)	11,1 ± 7,2 (0,5-29)	6,5 ± 4,8 (1,5 - 17)	20
Time to L-dopa use (years)	3,9 ± 3,4 (0,5-7,5)	4 ± 3,4 (0,5-8)	7
L-dopa use until complications (years)	10,7	4,6	5
Dyskinesias/fluctuations	4 (80%)	32 (50,8%)	yes

a. Unified Parkinson's Disease Rating Scale

b. Levodopa Equivalent Dose

The presence of only one patient with a mutation in the PARK8 gene, limits our possibility to present clinical correlations; her clinical features are shown in Table 4. There was no family history of Parkinsonism. This patient's initial clinical sign was right upper limb tremor, later developing the full blown manifestations of PD. She reported dystonia in her left foot from disease onset. At the time of clinical assessment, she did not have signs that fulfilled criteria for dementia (MMSE score of 23, cut-off of 18) and responded well to levodopa with typical motor complications (peak dose dyskinesias; wearing off and no-effect doses fluctuations).

Discussion

We found a low frequency of PARK2 mutations in our cohort of EOP. Our frequencies of PARK2 mutations were lower than those reported in Europe (8) and almost half than in other studies from Brazil [24,25]. Periquet et al in 2003 studied 146 patients of various geographical origins with EOP, without family history, including cases from Brazil, and concluded that at least 15% of patients had PARK2 mutations [8]. Camargos et al., studying 45 patients with EOP, found five with mutations (11.1%) in the PARK2 gene; heterozygous mutations in this gene accounted for 4.4% of

their patients, and 6.6% were compound heterozygous mutations [25]. Aguiar et al. described 72 patients with EOP and nine (12.5%) had a mutation in the PARK2 gene, two of these were homozygous and seven heterozygous for the mutation [24]. Other published studies including Brazilian patients with EOP confirm the frequent involvement of PARK2 gene [26-28].

The frequency of PARK2 mutations is estimated to be 49% in cases of EOP with a positive family history [7,8,29]. In our Brazilian series of 69 cases of EOP, only 11, 59 % had a family history of Parkinsonism. The finding of none PARK2 mutation in familial cases in our study may be due to the small sample size and also to different genetic background of the patients involved in others Brazilian series.

Some heterozygous PARK2 variants (polymorphisms) have been observed in healthy control individuals, making assessment of pathogenicity for these variants quite complex. It has been suggested a role of these heterozygous recessive mutations as risk factors for disease [30]. Atypical findings were found only in two of our patients and they both had Met192Leu polymorphisms.

The small number of patients with PARK2 mutations made comparative analysis unsuitable. But postural instability was the only clinical feature that tended to be more common in our patients with PARK2 mutations which had been described as part of the phenotype of Parkin disease [31]. The rigid-akinetic motor phenotype was prevalent in four of our five patients with PARK2 mutations including the two patients with homozygous mutations. One of the patients with homozygous mutations had dystonia as the initial symptom.

Only one of our patients had a mutation in the PARK8 gene, which can be explained by the fact that there is a higher prevalence of these mutations in patients in whom the disease has a late onset [15]. At disease onset the patient presented with tremor in her right hand, in agreement with a study by Marras et al. that found tremor to be the most frequent initial symptom [32]. The PARK8 G2019S mutation in our patient (heterozygous) is reported to be the most common one worldwide [14,33] and in Brazil [34,35]. The PARK8 G2019S mutation causes 4-5% of familial and 1-2% of sporadic PD in populations of European descent, 30-40% of both familial and sporadic PD in Arab patients from North Africa and 10-30% in Ashkenazi Jews [36]. In South America PARK8 G2019S mutation is estimated to be present in 3% of familial and 2% in sporadic cases of PD [34,37]. The prevalence of PARK8 mutations in a previously published Brazilian sample of EOP patients was 3, 5% [33]. Therefore PARK8 mutation is rare in sporadic EOP.

Although we acknowledge the caveat of examining a limited sample size, our study suggests that PARK2 and PARK8 mutations are uncommon in this southern of Brazil series of patients with predominantly sporadic EOP.

Acknowledgment

We wish to thank Dr. André Troiano (INSERM) for his help with the data.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008, 15 (Suppl 1): 14-20.
- Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and Parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkin Relat Disord*. 2013, 19: 407-415.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilarinho-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F et al. Translation Initiator EIF4G1 Mutations in Familial Parkinson Disease. *Am J Hum Genet*. 2011, 89: 398-406.
- Vilarinho-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 2011, 89: 162-167.
- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 2011, 89: 168-175.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is an ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*. 2000, 25: 302-305.
- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*. 2000, 342: 1560-1567.
- Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*. 2003, 126: 1271-1278.
- Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G et al. How much phenotype variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol*. 2003, 54: 176-185.
- Rawal N, Periquet M, Lohmann E, Lücking CB, Teive HA et al. New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology*. 2003, 60: 1378-1381.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004, 44: 601-607.

12. Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004, 44: 595-600.
13. . Seol W. Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease. *BMB Rep*. 2010, 43: 233-244.
14. . Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J et al. Italian Parkinson's Genetics Network: Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*. 2006, 14: 322-331.
15. . Paisan-Ruiz C, Nath P, Washecka N, Gibbs JR, Singleton AB. Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Hum Mutat*. 2008, 29: 485-490.
16. . Ishihara L, Warren L, Gibson R, Amouri R, Lesage S et al. Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Arch Neurol*. 2006, 63: 1250-1254.
17. . Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M et al. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006, 21: 1506-1510.
18. Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ, Rohé CF, Zini M et al. The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. *J Med Genet*. 2005, 42: e65.
19. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992, 55: 181-184.
20. Gerstenbrand F, Ransmavr G. Nosography of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1986, 22: 119-128.
21. Bertolucci PHF, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral-impacto da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr*. 1994, 2: 1-7.
22. Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R et al. Systematic Review of Levodopa Dose Equivalency Reporting in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2010, 25: 2649-2685.
23. Lesage S, Magali P, Lohmann E, Lacomblez L, Teive H et al. French Parkinson Disease Genetics Study Group: Deletion of the parkin and PACRG gene promoter in early-onset parkinsonism. *Hum Mutat*. 2007, 28: 27-32.
24. Aguiar P de C, Lessa PS, Godeiro C Jr, Barsottini O, Felício AC et al. Genetic and Environmental Findings in Early-onset Parkinson's Disease Brazilian Patients. *Mov Disord*. 2008, 23: 1228-1233.
25. Camargos ST, Dornas LO, Momeni P, Lees A, Hardy J et al. Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: phenotypic characterization and frequency of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations. *Mov Disord*. 2009, 24: 662-666.
26. Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O et al. Italian Parkinson Genetics Network: Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2005, 20: 424-431.
27. Chien HF, Rohé CF, Costa MD, Breedveld GJ, Oostra BA et al. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics*. 2006, 7: 13-19.
28. Barsottini OG, Felício AC, Aguiar Pde C, Godeiro-Junior C, Shih MC et al. Clinical and molecular neuroimaging characteristics of Brazilian patients with Parkinson's disease and mutations in PARK2 or PARK8 genes. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009, 67: 7-11.
29. Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H et al. Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 2006, 63: 548-552.
30. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes. A Mutation Update. *Hum Mutat*. 2010, 31: 763-780.
31. Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain*. 2003, 126: 1279-1292.
32. Marras C, Schüle B, Munhoz RP, Rogaeva E, Langston JW et al. Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology*. 2011, 77: 325-333.
33. . Abdalla-Carvalho CB, Santos-Rebouças CB, Guimarães BC, Campos M, Pereira JS et al. Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*. 2010, 17: 1479-1481.
34. Munhoz RP, Wakutani Y, Marras C, Teive HA, Raskin S et al. The G2019S LRRK2 mutation in Brazilian patients with Parkinson's disease: phenotype in monozygotic twins. *Mov Disord*. 2008, 23: 290-294.
35. Pimentel MM, Moura KC, Abdalla CB, Pereira JS, de Rosso AL et al. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Neurosci Lett*. 2008, 433: 17-21.
36. Bardien S, Lesage S, Brice A, Carr J. Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease. *Parkin Relat Disord*. 2011, 17: 501-508.
37. Lessage S, Brice A. Role of Mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease. *Parkin Relat Disord*. 2012, 18: S66-S70.