

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**GENES PRINCIPAIS E GENES PREDISPOANTES
À DOENÇA DE PARKINSON:
ESTUDO SOBRE OS GENES PARK2, PARK6, PARK7, PARK8,
SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7
E O GENE DA GLUCOCEREBROSIDASE**

Autor: Mariana Peixoto Socal

Orientador: Prof^a. Dr^a. Laura Bannach Jardim

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Dissertação de Mestrado

2008

“... involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forward, and to pass from a walking to a running pace, the senses and intellect being uninjured.”

James Parkinson’s “Essay on the Shaking Palsy”, 1817.

DEDICATÓRIA

- Ao meu avô Erni Silveira Peixoto, Engenheiro Eletrônico autodidata, atualmente com 92 anos de idade e que idealizou, projetou e construiu, por conta própria, o primeiro aparelho de eletroencefalografia do Rio Grande do Sul, tendo atuado por vários anos na realização e interpretação de exames eletroencefalográficos, em conjunto com colegas Neurologistas, e muito tendo contribuído com o avanço da Neurologia em nosso Estado.

- Ao meu pai, Ernani Roberto Socal, pelo exemplo pessoal e profissional, como médico Urologista, pela visão humanitária e integral da Medicina, pela busca contínua do conhecimento e pela motivação e interesse persistentes, mesmo após 30 anos de exercício da profissão médica. Agradeço pelo apoio, amor e presença constantes.

- À minha mãe, Léa Otília Peixoto Socal, pelo exemplo como mulher, pela coragem, entusiasmo e pelo exemplo de dedicação incansável na busca pelos objetivos, tanto pessoais quanto profissionais, bem como pelo cultivo, ao longo dos anos, do hábito de aprender sempre. Agradeço pelo estímulo, incentivo e amor incondicionais, e pelo apoio nos momentos mais difíceis da execução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Arlete Hilbig, pela colaboração e parceria na execução deste projeto.

- Aos colegas Drs. Artur Schuh, Raquel Townsend e Andrew Chaves, pelo auxílio com a captação de pacientes na fase inicial do estudo.

- À equipe do laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial as Dras. Maria Luíza Saraiva Pereira, Kristiane Michelin e Vanessa Emmel, pela execução dos métodos diagnósticos bioquímicos e moleculares, pela contribuição científica e apoio em todas as fases deste estudo.

- Ao Dr. Vincenzo Bonifati, pela execução dos métodos de diagnóstico molecular e pelo trabalho colaborativo.

- À amiga e colega Dra. Camila Drago pelo auxílio na correção e revisão dos textos.

- Ao co-orientador Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder, pelo apoio, incentivo e contribuição científica permanentes.

- À orientadora Dra. Laura Bannach Jardim, pela coordenação da equipe de pesquisa, pelo estímulo e incentivo à integração dos diversos colaboradores, pelo dinamismo e pelo exemplo profissional e acadêmico.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado através de recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

SUMÁRIO

1	RESUMO	7
2	INTRODUÇÃO	9
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1	Epidemiologia da Doença de Parkinson	10
3.2	Características Clínicas da Doença de Parkinson	11
3.3	Características Anátomo-Patológicas da Doença de Parkinson.....	16
3.4	Etiologia e Patogênese da doença de Parkinson.....	17
3.5	Formas autossômicas dominantes da doença de Parkinson.....	21
3.5.1	Genes principais causadores de DP	21
3.5.2	Outras causas genéticas de DP	28
3.6	Formas autossômicas recessivas da doença de Parkinson	31
3.7	Genes predisponentes à doença de Parkinson	37
3.8	Contribuições para o entendimento fisiopatogênico da doença de Parkinson a partir dos fatores ambientais e genéticos	41
4	JUSTIFICATIVA.....	48
5	OBJETIVOS	49
5.1	Objetivo Geral	49
5.2	Objetivos Específicos.....	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
7	ARTIGOS	74
7.1	Artigo 1.....	74
7.2	Artigo 2.....	91
7.3	Artigo 3.....	109
8	CONSIDERAÇÕES GERAIS	115
9	ANEXOS	118
9.1	Estadiamento modificado de Hoehn e Yahr.....	118
9.2	Escala ADL – Atividades de vida diária	119
9.3	Escala Unificada para Avaliação da Doença de Parkinson	120
9.4	Escala: Mini-Exame do Estado Mental.....	121

1 RESUMO

A doença de Parkinson é freqüente no mundo todo, atingindo indivíduos de todas as idades e etnias. Embora comum e muito estudada, seus mecanismos causais ainda não são plenamente conhecidos e ainda não há tratamento curativo.

Atualmente, são conhecidos alguns fatores ambientais e genéticos associados ao desenvolvimento da doença de Parkinson. Dentre os fatores genéticos, foram identificados diversos genes que podem, ou determinar a ocorrência da doença de forma mendeliana (genes principais), ou apenas aumentar o risco de seu surgimento (genes de suscetibilidade).

Embora os fatores genéticos, em conjunto, sejam responsáveis por uma minoria dos casos, permanece relevante esta investigação, para promover um aconselhamento genético adequado para os portadores de formas mendelianas, para adequar medidas de tratamento e reconhecer características clínicas e de prognóstico, oportunizando, inclusive, ampliar o entendimento dessa condição.

O presente estudo analisou pacientes portadores de doença de Parkinson em acompanhamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que apresentavam baixa idade de início dos sintomas, história familiar positiva ou presença de manifestações atípicas da doença. Essas características foram utilizadas como critério de seleção dos pacientes por estarem associadas com maior probabilidade de detecção de causas genéticas.

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e à testagem molecular para diversos genes principais e de suscetibilidade. Foram, posteriormente, comparadas as características clínicas dos pacientes positivos com relação aos demais pacientes estudados.

Os resultados são apresentados sob a forma de três artigos, que descrevem, respectivamente, os achados moleculares da investigação para os genes causais autossômicos recessivos (genes PARK2, PARK6, PARK7 e PARK8), autossômicos dominantes (genes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 e SCA7) e o gene de suscetibilidade (gene GBA).

2 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer. Embora seja mais freqüente entre os indivíduos acima de 65 anos, faixa etária na qual atinge em torno de 2% da população, também pode surgir em indivíduos com menos de 45 anos (DP de início precoce) ou até com menos de 20 anos (DP juvenil). A DP foi descrita em 1817 por James Parkinson e sua recorrência familiar foi logo reconhecida, porém apenas no final do século XX suas bases genéticas começaram a ser identificadas.

Os fatores genéticos implicados na gênese da DP incluem genes principais, que determinam a ocorrência da doença de forma mendeliana, e genes predisponentes, que estão associados ao aumento do risco para esta condição. Ainda que diversos genes principais e predisponentes já tenham sido identificados, suas mutações são detectadas em um pequeno número de pacientes, restando uma grande parcela de casos cuja etiologia permanece inexplicada.

Ainda assim, as descobertas genéticas muito contribuíram para o entendimento dos mecanismos causadores da DP. As anormalidades bioquímicas ocasionadas pelas mutações apontam para sistemas celulares específicos, como a rota de degradação protéica, a função mitocondrial e os mecanismos de proteção ao *stress* oxidativo, que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença também naqueles pacientes sem mutações detectadas e podem tornar-se, futuramente, alvo de intervenções terapêuticas que permitam modificar o curso desta condição.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A prevalência e a incidência da DP variam conforme o método empregado nos diferentes estudos, principalmente devido à falta de um marcador diagnóstico único para esta doença. Com base em dados coletados em diversos países europeus por triagem porta-a-porta com posterior exame clínico para confirmação, foi possível demonstrar uma prevalência geral de 1,8 casos por 100 habitantes com mais de 65 anos, número que varia entre 0,6 casos por 100 habitantes entre 65 a 69 anos até 2,6 casos por 100 habitantes entre 85 e 89 anos (1). Estima-se que a DP seja cerca de 2,13 vezes mais freqüente entre os homens, embora nem todos os estudos populacionais tenham demonstrado tal diferença (1,2), assim como há evidência isolada de uma idade de início mais tardia entre as mulheres (3).

A incidência de DP varia mais entre os estudos, podendo ser tão alta quanto 326 casos novos por 100.000 habitantes por ano (2), porém uma constante é o fato de aumentar com a idade, assim como a prevalência.

O diagnóstico de DP está associado com uma mortalidade duas vezes maior do que a da população em geral para a mesma faixa etária, com *causas mortis* semelhantes às da população (doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e malignidade), porém diferindo por uma associação maior com broncopneumonia, com um risco de morte por esta causa até seis vezes maior do que o da população da mesma idade (4).

No Brasil, um estudo recente com base populacional avaliou uma coorte de 1186 indivíduos acima de 60 anos moradores de uma cidade no interior de Minas Gerais. A avaliação foi realizada por método de triagem porta-a-porta e posterior exame clínico para confirmação dos casos positivos, encontrando-se uma prevalência de 3,3% para DP, sem diferença estatisticamente significativa entre os homens e as

mulheres. Além disso, observou-se uma alta prevalência de parkinsonismo medicamentoso (2,2%) e vascular (1,1%), maiores do que o descrito na literatura mundial (5).

Outra particularidade do estudo brasileiro foi o fato de que 72% dos pacientes identificados pelos investigadores como portadores de DP não haviam, até então, sido diagnosticados como tal. O difícil acesso da população aos serviços de saúde é uma das causas do subdiagnóstico, mas também contribuem para isto a presença de sintomas leves nos quadros iniciais e a interpretação de “normalidade” para os sintomas como lentidão e tremor nos idosos entre nossa população.

3.2 Características Clínicas da Doença de Parkinson

A DP, tal qual descrita por James Parkinson, consistia em um “tremor involuntário, com redução da força motora, nos membros em repouso e mesmo quando sustentados; com uma propensão a inclinar o tronco para frente e de passar de um ritmo de caminhada para o de corrida, com os sentidos e o intelecto mantendo-se intactos” (6).

Esta descrição sintetiza as principais manifestações clínicas desta condição: a coexistência de fenômenos hiper- e hipocinéticos como o tremor de repouso e a rigidez com bradicinesia, embora estas últimas não estejam caracterizadas em detalhe. Como se sabe atualmente, essas características não são exclusivas da DP; na realidade, compõem a chamada “síndrome parkinsoniana”, um conjunto de sinais e sintomas que decorrem da lesão da via nigro-estriatal, uma das principais vias do sistema extrapiramidal (6).

A síndrome parkinsoniana, portanto, pode ser causada por outras doenças ou fatores que impeçam ou prejudiquem o funcionamento desta via, como na doença cerebrovascular, em outras doenças degenerativas (atrofia de múltiplos sistemas,

paralisia supranuclear progressiva, entre outras) ou, inclusive, pelo efeito de substâncias exógenas, como no parkinsonismo medicamentoso.

O que caracteriza a DP e a diferencia das demais síndromes parkinsonianas, do ponto de vista fisiopatológico, é a sua origem na degeneração primária ou “idiopática” dos neurônios produtores de dopamina localizados na pars compacta da *substantia nigra*, um núcleo mesencefálico que contém neurônios ricos em melanina, ocasionando redução na produção deste neurotransmissor e conseqüente interferência na transmissão de impulsos por esta via. O diagnóstico definitivo da DP é realizado somente com base no exame anátomo-patológico *post-mortem*, com a identificação da degeneração da *substantia nigra* com características específicas, como veremos em detalhe mais adiante (7).

A necessidade de um diagnóstico *in vivo*, porém, motivou diversos estudos. Combinações de critérios clínicos foram propostas, com o objetivo de determinar um grau de certeza suficiente para estabelecimento do prognóstico e decisão terapêutica (8). Os exames complementares não contribuem para a determinação do diagnóstico de DP, embora sejam úteis na exclusão de causas secundárias e outras patologias.

Gelb, em 1999 (9), ao realizar uma ampla revisão dos estudos de diagnóstico clínico *versus* anátomo-patológico, propôs uma combinação de critérios em que são necessários três entre os quatro principais aspectos: tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e início assimétrico de sintomas, além de uma positiva e sustentada resposta à levodopa ou aos agonistas dopaminérgicos e na ausência de manifestações atípicas que indiquem um diagnóstico alternativo (demência precoce, paralisia do olhar conjugado vertical, congelamento ou instabilidade postural grave precoces, disautonomia grave e sintomática precoce) e excluídas as demais condições causadoras de parkinsonismo (uso de medicamentos, lesão cerebral focal de etiologia conhecida sobre as vias dopaminérgicas, exposição a tóxicos específicos, etc).

A combinação de critérios proposta por Gelb permite um grau de certeza diagnóstica “provável” (quando todos os critérios acima são preenchidos e o paciente

tem mais de três anos de doença) ou “possível” (quando somente duas das características clínicas principais são preenchidas, ou o paciente não possui mais de três anos de doença, ou ainda não foi realizado o uso de levodopa / agonista dopaminérgico). Esta classificação permite priorizar a sensibilidade (DP possível) ou a especificidade (DP provável) do diagnóstico, tendo em vista que há uma queda da sensibilidade com o aumento da especificidade dos critérios exigidos (9). Para fins de triagem populacional, em que alta sensibilidade é priorizada, criaram-se outros instrumentos (10).

O diagnóstico clínico de DP feito por especialistas em Distúrbios do Movimento de um serviço de referência, quando comparado com o diagnóstico anátomo-patológico, demonstrou uma sensibilidade global de 91,1%, especificidade de 98,6% e valor preditivo positivo de 85,3% (11).

O tremor característico da DP está presente no repouso e desaparece ao realizar um movimento ou assumir uma postura. Sua frequência é de 2 a 6 Hz e seu padrão é descrito como “contar moedas”, “enrolar pílulas” ou “esfarelar pão” (12). Está presente em cerca de 80% dos pacientes com DP confirmada por necrópsia (13) e pode variar durante a evolução da doença, inclusive tornando-se presente na ação, nos casos mais avançados (9).

A rigidez (ou seja, o aumento da resistência muscular ao movimento passivo) é observada, nesta doença, com a mesma intensidade na musculatura agonista ou antagonista, no fim ou no início do movimento, testando-se com maior ou menor velocidade. O sinal da roda denteada, ou sinal de Negro, é característico, e consiste na percepção, ao movimento passivo sobre uma articulação, de uma resistência muscular que se interrompe e retorna, repetidamente (6). A rigidez na DP afeta predominantemente a musculatura proximal, estendendo-se distalmente com a evolução do quadro, mas afetando com maior intensidade os músculos do tronco e do pescoço e os flexores dos membros superiores (14).

A bradicinesia é a dificuldade para iniciar o movimento voluntário, com lentificação e redução da amplitude, tanto para a flexão como para a extensão dos membros (12). A bradicinesia é melhor observada ao solicitar ao paciente que realize movimentos rápidos e alternados, como abrir e fechar as mãos ou elevar e bater os pés no chão. Também é percebida sob a forma de redução dos “movimentos associados”, como o balanceio dos membros superiores durante a marcha.

Quer o sintoma inicial da DP tenha sido o tremor, quer tenha sido a rigidez e/ou a bradicinesia, é característico seu padrão de início unilateral – o chamado “início assimétrico”. O paciente é capaz de precisar o local de início: o membro superior ou inferior de um determinado lado do corpo. A progressão ocorre, inicialmente para o outro membro do mesmo lado, e, posteriormente, para o hemicorpo contralateral e a musculatura axial. Embora o tempo para esta progressão seja variável, com pacientes que permanecem com doença unilateral por longos períodos, estima-se que o tempo médio até o comprometimento do membro do mesmo lado é de 1 ano e dos membros do outro lado é de 2 anos e meio (15). Mesmo após a progressão e a generalização da doença, é freqüente que persista a assimetria dos sintomas (6).

Com a progressão da doença, é comum o surgimento da instabilidade postural, que consiste na perda dos reflexos posturais, com tendência a queda em decorrência de uma súbita mobilização do tronco, sem a possibilidade de correção rápida do eixo para o restabelecimento do equilíbrio. Embora a instabilidade postural possa ser muito grave e, geralmente, seja acompanhada de outras alterações características da marcha, como a festinação (aceleração dos passos com projeção do tronco para frente, para corrigir o centro de gravidade do corpo e permitir o movimento), as quedas costumam ocorrer com menor freqüência do que o esperado para a gravidade dos déficits (6). A presença de instabilidade postural é um critério para considerar doença avançada pela escala de Heohn-Yahr (16), e apenas 37% dos pacientes atingem este estágio antes dos 5 anos de evolução (9).

Outros sintomas freqüentemente encontrados nos pacientes com doença avançada são a disfagia, a disartria, a micrografia e os sintomas não-motores como demência, alucinações visuais, alterações do sono e do humor, principalmente depressão (17). Um sintoma pouco valorizado na prática clínica, porém muito freqüente, é a perda olfativa. Estima-se que esteja presente em 70 a 100% dos pacientes, ou seja, sendo tão comum quanto o tremor de repouso (18).

A resposta ao tratamento com levodopa (um aminoácido precursor da dopamina) ou com os agonistas dopaminérgicos é outro fator essencial para o diagnóstico clínico de DP e justifica-se pelo mecanismo fisiopatológico desta doença: a perda de neurônios produtores de dopamina na *pars compacta* da *substantia nigra* e a redução do aporte deste neurotransmissor ao núcleo estriado, que são os principais mecanismos da gênese dos sintomas motores, são em grande parte “neutralizados” por estes medicamentos, quer seja pelo aumento da produção de dopamina ou pelo efeito direto sobre os receptores pós-sinápticos. Na grande maioria dos casos, o uso destes medicamentos proporciona uma rápida e consistente resposta clínica de benefício (7). A descoberta deste efeito dramático sobre o quadro clínico foi demonstrada em 1969 por George Cotzias (19), e seu posterior uso em larga escala permitiu oferecer uma melhora da qualidade de vida e prolongamento da expectativa de vida para inúmeros pacientes, ao redor do mundo.

Entretanto, o tratamento da DP também se caracteriza por apresentar complicações de longo prazo. São as chamadas flutuações motoras, que surgem em cerca de 50% dos pacientes após 5 anos de tratamento (19). As principais flutuações motoras referem-se ao efeito da medicação, que pode encurtar progressivamente (fenômeno “*wearing-off*”) ou iniciar e terminar sem relação direta com as tomadas da medicação (fenômeno “*on-off*”). Além destes fenômenos, o surgimento de movimentos involuntários exagerados, coreoatetóides, desencadeados pelo uso de uma dose até então bem tolerada do medicamento ou pelo final do efeito deste medicamento, é denominado discinesia.

O manejo das complicações motoras e a prevenção de seu surgimento consistem em um desafio e justificam a variedade de agentes antiparkinsonianos já disponíveis no mercado e a contínua busca por novas alternativas terapêuticas.

3.3 Características Anátomo-Patológicas da Doença de Parkinson

O exame anátomo-patológico do cérebro de pacientes com DP, além de fornecer o diagnóstico definitivo desta doença, é um campo de investigação para compreender sua fisiopatogenia e sua relação com as demais doenças neurodegenerativas.

Os achados clássicos da histopatologia cerebral na DP envolvem, predominantemente, a *pars compacta* da *substantia nigra* mesencefálica. Nesta região, observa-se, macroscopicamente, a palidez decorrente da despigmentação associada à perda dos neurônios pigmentados e dopaminérgicos (20). Estima-se que, quando do surgimento dos sintomas clínicos, a perda dos neurônios dopaminérgicos da *pars compacta* da *substantia nigra* tenha atingido cerca de 60%, e a redução da liberação da dopamina na via nigro-estriatal tenha atingido em torno de 80% (22).

À microscopia, verifica-se gliose reacional e a presença dos denominados “corpos de Lewy”, inclusões intracitoplasmáticas presentes nos neurônios remanescentes, fortemente eosinofílicas (20). O conteúdo dos corpos de Lewy, segundo demonstram técnicas de imunofluorescência, inclui proteínas tais como alfa-sinucleína, ubiquitina, parkina e neurofilamentos (22). Acúmulos protéicos intracelulares filamentosos, também positivos para alfa-sinucleína, são chamados neuritos de lewy e estão presentes nestas regiões (23). Para o diagnóstico da DP, é necessária a detecção de, no mínimo, um corpo de Lewy na topografia da *substantia nigra* e a exclusão de sinais anátomo-patológicos que sugiram outras patologias (9).

Estudos em pacientes sintomáticos e pré-sintomáticos demonstram que o surgimento dos corpos de Lewy não é restrito às áreas mesencefálicas. Tais acúmulos

são detectados primeiramente em estruturas como o bulbo olfatório, núcleos motores dorsais dos nervos vago e glossofaríngeo (24), e também em estruturas autonômicas da medula espinhal, plexo mioentérico intestinal e gânglios simpáticos (23). Com a evolução da doença, as alterações histopatológicas apresentam um envolvimento ascendente das estruturas, com pouca variação interindividual: além do tronco cerebral, ocorre uma deposição progressiva de corpos de Lewy no córtex temporal ântero-medial (mesocórtex), nas áreas pré-frontais e áreas de associação sensitiva (neocórtex) e, por fim, nas áreas motora e sensitiva primárias e associativas motoras e sensitivas de primeira ordem (24).

Tais evidências morfológicas, associadas às manifestações clínicas descritas, demonstram que a doença de Parkinson, embora predominantemente extrapiramidal, envolve múltiplos sistemas neurológicos, provavelmente de acordo com tipos específicos de células suscetíveis (24).

3.4 Etiologia e Patogênese da doença de Parkinson

A primeira identificação da *substantia nigra* como substrato anatômico para a origem do parkinsonismo foi realizada em 1894 por Blocq e Marinesco, que descreveram uma lesão nodular por tuberculose no mesencéfalo causando parkinsonismo contralateral. Somente durante a década de 1950, porém, a associação do quadro parkinsoniano com lesões da *substantia nigra* passou a ser mais amplamente conhecida e aceita (15).

Da mesma forma, embora a existência das inclusões intraneuronais tenha sido descrita em 1912 por Lewy no núcleo dorsal do vago de pacientes com DP, a descrição de sua presença na *substantia nigra* ocorreu sete anos após (15), e a identificação de seus componentes estruturais (alfa-sinucleína, ubiquitina, parkina e

neurofilamentos) demorou mais 80 anos para ser atingida (22), enquanto sua função e significado seguem sendo objeto de estudo até os dias atuais.

O mecanismo que leva à morte neuronal e à gênese da DP não está completamente elucidado. Há evidências de que o surgimento da doença seja fruto de uma interação entre fatores ambientais e genéticos, e há casos nos quais apenas um destes fatores é determinante para a ocorrência da mesma.

Em 1979, foi descrito o caso isolado de um indivíduo que desenvolveu parkinsonismo após o uso intravenoso de um opióide ilícito; em 1983, novos casos surgiram em uma mesma comunidade, todos tendo utilizado por repetidas vezes um opióide sintético, ilícito, por via intravenosa, consistindo em 4-propionoxi-4-fenil-N-metilpiperidina, éster reverso da meperidina. Na investigação destes casos, descobriu-se que a solução continha um produto secundário: N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que foi identificado como o responsável pela perda maciça de neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal verificada nestes pacientes (25).

O quadro clínico apresentado pelos pacientes com parkinsonismo secundário ao MPTP era típico de DP, com acinesia intensa, rigidez, postura fletida e tremor de repouso, com baixas concentrações de ácido homovanílico (metabólito da dopamina) no líquido céfalo-raquidiano, indicando uma depleção deste neurotransmissor, e com reversão dos sintomas após o uso de levodopa ou bromocriptina, da mesma forma que o encontrado na DP (25).

A confirmação da toxicidade do MPTP veio com a replicação do seu efeito nocivo em macacos, ocasionando o mesmo quadro parkinsoniano típico observado em humanos, inclusive com resposta à levodopa. Os metabólitos do MPTP interferem com o complexo I da cadeia mitocondrial, depletam as células dos produtos da fosforilação oxidativa e expõem os neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* ao dano irreversível devido à falta de energia e ao *stress* oxidativo causado por radicais livres de oxigênio (26). A histopatologia cerebral nos casos de parkinsonismo secundário ao

MPTP, entretanto, tanto nos macacos quanto entre os humanos, não evidenciou a presença de corpos de Lewy (25).

A hipótese de uma origem ambiental para a DP foi reforçada com a identificação de outros agentes com efeito tóxico sobre os neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal: herbicidas contendo 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+, metabólito ativo do MPTP) ou paraquat, compostos com manganês (etilenobistiocarbamato de manganês) e rotenona, uma substância citotóxica natural presente em leguminosas e utilizada como inseticida e piscicida. A rotenona, um inibidor específico do complexo mitocondrial I é, inclusive, utilizada em modelos animais de DP, nos quais se observa a formação de corpos de Lewy (21).

A ocorrência de “agrupamentos” de casos de DP entre indivíduos que compartilharam exposição ambiental semelhante em suas condições ocupacionais, com exposição a dióxido de carbono, solventes orgânicos como benzeno e tolueno, ou ainda em ambientes sem causas tóxicas identificáveis, em que a incidência de DP superou o risco determinado pelo acaso e as causas genéticas investigadas foram negativas, também reforça a importância do ambiente para o desencadeamento da doença (27).

Além disso, segundo os estudos *post-mortem*, a formação dos corpos de Lewy, na DP, teria início nos núcleos do vago e hipoglosso, bulbo olfatório e no plexo mioentérico intestinal, locais do organismo que têm contato com a entrada de substâncias exógenas (23, 24).

Do ponto de vista genético, as evidências de causalidade têm princípio na verificação da recorrência familiar da DP, que foi reconhecida ainda no século XIX e que hoje, estima-se estar presente em cerca de 10 a 15 % dos pacientes. Na década de 1980, porém, o resultado de alguns estudos em gêmeos, onde não foi encontrada concordância de DP entre pares monozigóticos comparados com dizigóticos, chegou a lançar dúvidas sobre um real papel genético na gênese desta doença. Mais tarde, outros estudos identificaram esta concordância ao basear a comparação não somente

em fatores clínicos, mas também em estudos de neuroimagem (tomografia por emissão de prótons com ¹⁸fluorodopa) (26).

O estudo genético das famílias com DP permitiu identificar causas monogênicas para a doença e ampliar a compreensão da sua fisiopatologia: em 1997, Polymeropoulos conduziu um estudo de *scan* genômico em uma família italiana que apresentava um padrão de herança autossômico dominante para DP com muitos indivíduos afetados e identificou um gene ligado à DP que codifica a proteína alfa-sinucleína (28, 29).

Esta descoberta inaugurou a era da investigação genética da DP, sendo seguida pela identificação de outros genes, inicialmente nomeados de acordo com seus *loci* (sendo numerados em seqüência), o locus PARK1 correspondendo ao gene da alfa-sinucleína identificado por Polymeropoulos. Atualmente, existem 10 genes identificados neste grupo, que condicionam DP de herança autossômica dominante e recessiva (tabelas 1 e 2).

Outras doenças genéticas, que até então eram reconhecidas por seus quadros clínicos característicos, foram identificadas, recentemente, com fenótipos parkinsonianos típicos, com recorrência familiar em padrão autossômico dominante. É o caso das ataxias espinocerebelares (SCAs), a doença de Huntington, a distonia dopa-responsiva, a doença priônica familiar e a demência frontotemporal com parkinsonismo ligada ao cromossomo 17 (FTDP-17). Nesses casos, embora o diagnóstico molecular identifique alterações tradicionalmente ligadas a manifestações clínicas específicas (alteração piramidal e cerebelar nas SCAs e demência com manifestações psiquiátricas na FTDP-17, por exemplo), o quadro clínico pode ser somente parkinsoniano ou combinar os sintomas parkinsonianos com os achados característicos da patologia em questão, causando freqüentemente confusão diagnóstica e, às vezes, modificando o diagnóstico clínico realizado inicialmente, em função dos achados moleculares (30).

Além dessas causas genéticas determinantes de DP, há genes que não condicionam a ocorrência da doença, mas aumentam seu risco (genes predisponentes à DP). Tais genes compreendem o gene da beta-glicosidase, genes ligados ao citocromo P450 e genes da cadeia mitocondrial, entre outros, e estão descritos em detalhe mais adiante.

Ainda que a descoberta das diferentes causas genéticas da DP tenha progredido, em poucos pacientes uma causa genética é detectada, restando um grande número de casos que são negativos na análise para genes principais e para genes predisponentes à doença e que não possuem exposição a tóxicos ambientais. Mesmo nesses casos, há um aumento do risco de desenvolver a doença, para parentes de primeiro grau de um indivíduo afetado, de 2,7 a 3,5 vezes o da população sem história familiar para DP, sendo seu risco cumulativo de desenvolver a doença ao longo da vida estimado entre 3 e 7% (30).

3.5 Formas autossômicas dominantes da doença de Parkinson

3.5.1 Genes principais causadores de DP

a) PARK1: gene da alfa-sinucleína

O gene da alfa-sinucleína foi o primeiro gene identificado como causador de uma forma hereditária de DP. Após a primeira descrição de uma mutação deste gene causando DP familiar (28), a pesquisa de mutações em inúmeras famílias ao redor do mundo e inclusive no Brasil (31) demonstrou que esta é uma causa infreqüente da doença.

Até o momento, apenas 2 mutações diferentes do gene da alfa-sinucleína foram identificadas em associação com DP, em 12 famílias de ascendência grega

(mutação de ponto G209A resultando em uma troca de aminoácido A53T) e uma família da Alemanha (mutação C88G com troca de aminoácido A30P) (32). Mais recentemente, portadores de DP de uma família coreana com padrão de herança autossômico dominante foram identificados como portadores da mutação A53T do gene da alfa-sinucleína. A análise genômica destes pacientes não apresentou semelhança de haplótipos com as demais famílias que, entre si, haviam sido demonstradas com um efeito fundador desta mutação. As hipóteses para explicar tal fato incluem tanto uma mutação nova quanto um ancestral comum muito remoto entre a família coreana e as demais (33).

Nas famílias com DP e mutações no gene da alfa-sinucleína, o fenótipo é típico, com início assimétrico de sintomas, boa resposta à levodopa e uma tendência a idades de início progressivamente menores. Entretanto, uma penetrância incompleta foi observada, de forma que até 33% dos indivíduos portadores de mutações neste gene não apresentavam sintomas neurológicos no momento do exame (34).

Uma terceira mutação da alfa-sinucleína, também do tipo missense (E46K), foi identificada em uma família espanhola como associada a um fenótipo de parkinsonismo, demência e alucinações, classificado pela histopatologia como demência por corpos de Lewy. Nesta família, o padrão de herança era autossômico dominante, com vários indivíduos afetados (35).

A alfa-sinucleína é uma proteína solúvel com 140 aminoácidos que é abundante nos neurônios e especialmente concentrada nos terminais pré-sinápticos. Sua função é desconhecida, mas provavelmente atue como uma chaperona, mediando várias interações entre proteínas e lipídios (36). Na ausência de lipídios, a alfa-sinucleína não possui uma estrutura específica; entretanto, na presença de fosfolipídios, apresenta conformação helicoidal. No citoplasma, além de suas formas livres, a alfa-sinucleína encontra-se também ligada a vesículas lipídicas; acredita-se que possua um papel na maturação das vesículas pré-sinápticas e na liberação de neurotransmissores. Ainda não são conhecidas as substâncias responsáveis pela

regulação da ligação e da dissociação da alfa-sinucleína com as vesículas sinápticas (34).

As formas mutantes da alfa-sinucleína apresentam maior tendência a localizar-se no núcleo. Porém, tanto em pacientes com, quanto nos sem mutações, formas de alfa-sinucleína truncadas, oxidadas e fosforiladas, com tendência a formar oligômeros, são encontradas no citoplasma, agregadas, formando os corpos de Lewy. Tal fato sugere que o mau processamento desta proteína, causado por alterações na sua seqüência de aminoácidos, por modificações pós-translacionais, por degradação ineficiente, ou por sua maior expressão (ver abaixo) possui um papel importante na fisiopatogenia da DP, tanto nas formas raras, monogênicas, da doença, quanto nas suas formas mais comuns e para quais outras causas genéticas não foram identificadas (34).

b) “Gene” PARK4: triplicações e duplicações do gene da alfa-sinucleína

Um *locus* inicialmente denominado PARK4 foi identificado em uma grande família americana já descrita desde 1962, onde os indivíduos afetados apresentavam fenótipos que variavam entre DP típica e demência com corpos de Lewy, com um padrão de recorrência autossômico dominante. Foi identificado que, nesta família, o gene co-segregava com a expressão clínica da doença, embora com uma penetrância incompleta. Ainda assim, praticamente todos aqueles indivíduos que apresentavam o haplótipo, mas não tinham manifestações parkinsonianas, apresentavam tremor de ação, inclusive alguns com critérios diagnósticos completos para tremor essencial (37).

Posteriormente, foi demonstrado que o gene PARK4 localizava-se no mesmo *locus* do gene PARK1 e codificava a mesma proteína: alfa-sinucleína. Entretanto, nas famílias que apresentavam mutações no gene PARK1, a alfa-sinucleína era mutante, enquanto nas famílias com associação ao gene PARK4 havia produção apenas de

alfa-sinucleína normal. Descobriu-se, então, que o considerado gene PARK4 tratava-se, na realidade, de uma triplicação de uma grande região genômica, que inclui, entre outros, o gene da alfa-sinucleína. Esta região inclui entre 1.61 e 2.04 Mb e contém cerca de 17 genes, identificados ou putativos (38).

Os indivíduos que possuem a triplicação têm 4 cópias funcionais do gene da alfa-sinucleína (uma alelo com o gene normal e outro alelo com três cópias do gene), desta forma duplicando a expressão desta proteína, bem como a dos produtos dos demais genes que compõem a área triplicada (38). Sua dosagem no sangue de indivíduos portadores da triplicação gênica é 1,8 vezes maior do que a dos indivíduos não-afetados (proteína solúvel). No cérebro, sua expressão é dobrada e encontram-se tanto formas monoméricas quanto agregados com grande massa molecular desta proteína (proteína insolúvel) (39).

Duplicações do gene da alfa-sinucleína também foram identificadas em famílias da França (40, 41), Japão (42, 43), Estados Unidos (44) e em casos isolados, sem história familiar (2 entre 1106 pacientes), na Coreia (45). Outros estudos falharam em demonstrar duplicações ou triplicações entre pacientes com história familiar autossômica dominante (n=190), provenientes da Alemanha, Iugoslávia e Portugal (46) e entre pacientes com DP familiar (n=101), DP esporádica (n=325), demência por corpos de Lewy (n=65) e indivíduos-controle (n=366) nos Estados Unidos da América (47).

O estudo de uma família grande, de origem sueca, descrita em 1949 por apresentar DP com herança autossômica dominante, demonstrou que dois ramos diferentes da mesma família apresentam genótipos diferentes: duplicação nos indivíduos da Suécia e triplicação nos indivíduos do ramo americano da família. A origem ancestral comum foi confirmada por estudo genealógico e de documentos oficiais, bem como através do estudo de variabilidade de microsatélite dentro da região genômica de interesse (44).

Embora seja desconhecido o mecanismo que leva à duplicação ou triplicação do gene da alfa-sinucleína, uma disfunção da região promotora deste gene poderia ser comum a ambos os mecanismos de multiplicação (43).

As manifestações clínicas dos indivíduos com triplicações do gene da alfa-sinucleína têm início mais precoce do que os portadores de duplicações deste gene, e há maior frequência de demência e disautonomia importante entre os com triplicações (48), sugerindo que a dosagem gênica esteja relacionada com a gravidade da doença (40, 44). Por outro lado, entre os indivíduos com duplicação do gene, embora a maioria seja clinicamente indistinguível de pacientes com DP típica (41), com curso lentamente progressivo e sem manifestações atípicas, há também portadores assintomáticos, sugerindo uma penetrância incompleta deste gene (da ordem de 33%, em uma das famílias estudadas) e estão descritos portadores de duplicações de mesmo tamanho com fenótipos diferentes (42).

c) PARK5: gene da ubiquitina-C-terminal hidrolase-1 (UCH-L1)

Em apenas uma família, de ancestralidade alemã, foi identificada a associação da DP de herança autossômica dominante com mutações do gene denominado PARK5, que codifica a proteína UCH-L1. Esta é uma enzima envolvida na rota de degradação protéica pelo proteassoma; funciona como uma hidrolase, produzindo monômeros de ubiquitina e promovendo a desubiquitinização de compostos (32). Ao mesmo tempo, possui também função de ligase da ubiquitina e parece ser um alvo do *stress* oxidativo dentro da célula (36). A UCH-L1 é expressa apenas nos neurônios e nas células do sistema neuroendócrino; ela representa entre 1 e 2% do total de proteínas solúveis do cérebro, e também está presente nos corpos de Lewy (36).

O fenótipo dos pacientes portadores de mutação no gene da UCH-L1 é de uma DP típica, com início dos sintomas ao redor dos 50 anos, predominância de

tremor de repouso e com penetrância incompleta. Em diversas outras famílias testadas, ao redor do mundo, as mutações do gene da UCH-L1 não foram identificadas, e um polimorfismo deste gene (S18Y do éxon 3) demonstrou efeito protetor, inversamente associado à ocorrência de DP (48, 49).

Além de sua relação com a DP, a UCH-L1 está implicada em outras doenças neurodegenerativas: está reduzida na doença de Alzheimer; quando mutante piora a degeneração neuronal em modelos animais de ataxias espinocerebelares; em humanos portadores de doença de Huntington, seu polimorfismo S18Y parece ser protetor, reduzindo a idade de início (36).

d) PARK8: gene da dardarina (LRRK2)

O gene PARK8, ou da dardarina (proteína kinase 2 rica em repetições de leucina - leucine-rich repeat kinase 2 - LRRK2), é aquele cujas mutações são mais freqüentemente encontradas nos pacientes com o padrão autossômico dominante de herança familiar. Inicialmente descobertas em famílias japonesas (51), as mutações deste gene estão presentes em famílias do mundo todo: Estados Unidos da América, Noruega, Irlanda, Itália, Portugal, Polônia, Inglaterra, e, inclusive, Chile e Brasil (52, 53, 54, 55). Há relatos de que são mais freqüentes entre os judeus Ashkenazi e os árabes norte-africanos (30).

Cerca de doze mutações patogênicas foram identificadas neste gene, mas a mais comumente encontrada é a 6055G→A, que causa a substituição de aminoácidos G2019S: foi encontrada em 5-7% dos casos de DP familiar autossômica dominante (30, 52, 53) e 1-2% dos casos isolados (56). Sua associação com um polimorfismo exônico demonstrou uma origem ancestral comum entre famílias identificadas nos países europeus e Estados Unidos da América (53, 57).

O quadro clínico de DP associado às mutações no gene LRRK2 é o que mais se assemelha com o padrão de DP esporádica, com idade de início variável, tanto entre as famílias quanto entre membros da mesma família: nos casos descritos na literatura, variou entre 34 (57) e 78 anos de idade (53), com média de 58,8 anos (18). Outras características da DP associada ao gene LRRK2 são um início preferencial no membro inferior, resposta à levodopa sustentada mesmo ao longo de muitos anos, sem discinesias limitantes e sem manifestações atípicas. A presença de tremor intenso nas famílias de origem basca deu origem ao nome “dardarina” para a proteína codificada pelo gene LRRK2, derivado da palavra basca “*dardara*”, que significa tremor (18). O desenvolvimento de alterações autonômicas, especialmente pressóricas e cardíacas, também foi identificado no estudo de um paciente com DP associada à mutação do gene LRRK2 (57).

A histopatologia cerebral destes pacientes também é característica da DP: perda neuronal com gliose na *substantia nigra* e presença de corpos de Lewy e neuritos de Lewy positivos para alfa-sinucleína tanto na *substantia nigra* quanto no *locus ceruleus* (18, 56, 59). Entretanto, alguns pacientes apresentam imunohistoquímica positiva para proteína tau, sob a forma de emaranhados neurofibrilares (18, 56, 59) e há casos sem formação de corpos de Lewy (60). Nos casos em que não foram identificados corpos de Lewy, houve a detecção dos chamados corpos de Marinesco (inclusões intranucleares eosinofílicas positivas para ubiquitina), nos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* (59,60) e de outras inclusões ainda sem classificação (60).

Embora condicione DP autossômica dominante, o gene LRRK2 apresenta penetrância incompleta, o que permite que muitos indivíduos de uma família sejam portadores, porém não venham a desenvolver a doença durante seu tempo de vida. Aos 50 anos, por exemplo, a penetrância encontrada foi de 17% e, aos 70 anos, foi 85% (53). Homozigotos e heterozigotos para mutações deste gene apresentam manifestações clínicas semelhantes (30).

No Brasil, as mutações no gene LRRK2 foram estudadas em uma amostra de pacientes que incluía casos com e sem história familiar e com variadas idades de início, provenientes do Rio de Janeiro. Entre 154 pacientes, foram identificados três casos positivos para a mutação G2019S e entre 250 cromossomos de indivíduos controles (não-portadores de DP), não houve detecção de nenhuma mutação neste gene. Os pacientes portadores desta mutação apresentavam um quadro clínico típico de DP, com idade de início entre 47 e 55 anos. A análise molecular de alguns familiares demonstrou portadores assintomáticos, os quais, entretanto, não podem ser considerados livres de doença, uma vez que a idade de início associada a estas mutações pode ser tão tardia quanto a oitava década de vida (55).

e) Outros genes

Outros genes que estão associados à ocorrência de DP dominante são os genes PARK3, PARK10 e PARK11 (vide tabela 1). Por enquanto, são conhecidos apenas seus *loci*, e não se sabe quais as proteínas que codificam. Tampouco se conhece sua relevância para a patogênese da DP e sua frequência entre os pacientes portadores desta doença.

3.5.2 Outras causas genéticas de DP

No grupo das causas genéticas de DP com padrão de herança autossômico dominante, além dos genes principais encontram-se os genes das SCAs que, ao serem identificados como expandidos, modificam o diagnóstico dos pacientes, que deixam de ser portadores de uma patologia predominantemente nigro-estriatal (DP) para serem portadores de uma doença que envolve degeneração multissistêmica, predominantemente do cerebelo, tronco cerebral e áreas corticais, também podendo

afetar os núcleos da base, os núcleos dos nervos cranianos oculomotores, as células da retina, os nervos periféricos, entre outros (61).

As SCAs compõem um grupo heterogêneo de doenças, do qual, atualmente, estão descritos 24 tipos diferentes. São classificadas de acordo com seu *locus* patogênico (tabela 3), e podem ser causadas por expansões de trinucleotídeos na porção do gene que codifica a proteína (SCAs 1, 2, 3, 6, 7 e 17), ou expansões fora desta região (SCA8, 10, 12), ou ainda por mutações “convencionais”, como deleções, mutações *nonsense*, *missense*, etc (SCAs 5, 13, 14, 27) (62).

As SCAs que se caracterizam por expansões de trinucleotídeos na porção codificadora de proteínas constituem as causas mais comuns de ataxias hereditárias autossômicas dominantes, correspondendo, juntas, a cerca de 50% dos casos diagnosticados ao redor do mundo (62). A SCA3 é a mais freqüente, em todos os países, sendo que, em nosso meio, além de corresponder a 84% dos casos de ataxia com causa genética conhecida (63), sua prevalência calculada é de 1,8 caso /100.000 habitantes, enquanto as demais SCAs têm prevalência estimada de 0,2 caso / 100.000 habitantes nesta região (64).

As principais manifestações clínicas das SCAs são a perda da coordenação do movimento, ataxia da marcha, perda do equilíbrio, disartria, disfagia, alterações do movimento ocular, nistagmo e espasticidade / piramidalismo. Em variados graus podem ser acompanhadas de neuropatia periférica, alterações cognitivas e manifestações extrapiramidais. Algumas SCAs apresentam manifestações características, como epilepsia na SCA10, retinopatia pigmentar na SCA7, retração palpebral e perda da sensibilidade térmica na SCA3 (61).

Os primeiros estudos sobre um fenótipo extrapiramidal para as SCAs surgiram na literatura a partir dos anos 2000. Na China, identificaram-se indivíduos que até então eram considerados portadores de DP com boa resposta à levodopa e que, ao exame molecular, apresentavam expansões no locus SCA2 (65) e indivíduos com distonia levodopa-responsiva que possuíam expansões SCA3 (66). No Reino Unido,

um paciente com SCA6 possuía fenótipo de distonia tarefa-específica do tipo câibra do escritor (67).

O fenótipo parkinsoniano das SCAs, embora já tivesse sido descrito anteriormente, em famílias sem diagnóstico molecular, foi detalhado pela primeira vez em 1995, em dois pacientes de origem açoreana que possuíam diagnóstico molecular de SCA3, mas que, entretanto, não possuíam manifestações atáxicas. Seu diagnóstico era de DP e apresentavam, inclusive, discinesias e flutuações motoras induzidas pela levodopa (68). Outros casos foram então sendo descritos em diversos países: Alemanha (69), Estados Unidos (70), Japão (71), Inglaterra, Índia, Jamaica, Gana, Brasil e França (72). A maioria dos pacientes descritos possuía história familiar positiva para DP e apresentava boa resposta à levodopa.

O fenótipo parkinsoniano da SCA2 também é típico, levodopa-responsivo, e foi descrito em uma família do Canadá (73) e, posteriormente, nos Estados Unidos, a partir do estudo de pacientes com diagnóstico de DP e história familiar positiva: entre 280 casos, um paciente apresentou expansão patogênica no locus SCA2 (74) e, entre mais 136 casos, outros dois pacientes com expansões limítrofes para SCA2 foram identificados (75).

Em Taiwan, cerca de 10% dos pacientes com DP familiar autossômica dominante foram identificados como portadores de expansões no locus SCA2. Nesta série de casos foi possível, ainda, identificar que os pacientes com fenótipo parkinsoniano da SCA2 possuíam uma idade de início mais tardia e um menor número de repetições do trinucleotídeo CAG do que aqueles com fenótipo atáxico desta doença (76). Mais recentemente, tais achados foram confirmados através do estudo de pacientes italianos com DP, onde, porém, apenas 1,2% dos casos de DP familiar investigados foram positivos para expansões CAG no locus SCA2 (77).

Na Coreia e na Alemanha, o fenótipo parkinsoniano foi descrito também em portadores de SCA6 (78, 79). A SCA1 não tem relatos de fenótipo parkinsoniano, porém é acompanhada de uma importante redução dos níveis de dopamina no

estriado, bem como de transportadores de dopamina e de marcadores de terminais neuronais, de forma semelhante à demonstrada na DP, porém sem uma perda celular relevante na *substantia nigra* (80).

Portanto, apenas as SCAs que se originam de expansões de trinucleotídeos na porção do gene que codifica a proteína foram descritas até o momento como apresentando fenótipo parkinsoniano. Estas ataxias caracterizam-se por fenômenos como o da antecipação, no qual os sintomas surgem mais cedo a cada geração, o que é compreendido como secundário a aumentos no número de expansões, que podem ocorrer na gametogênese. Além disso, embora não exista, até o momento, qualquer tratamento específico para as ataxias, o manejo dos sintomas parkinsonianos com levodopa, nestes pacientes, está associado com boas taxas de resposta (62).

3.6 Formas autossômicas recessivas da doença de Parkinson

f) PARK2: gene da parkina

No final da década de 1990, um grupo japonês identificou o gene PARK2 em pacientes que apresentavam uma forma de DP juvenil com padrão de herança autossômico recessivo, quadro clínico até então denominado “parkinsonismo juvenil autossômico recessivo”, por ter um início muito precoce de sintomas e um padrão de herança característico (81).

A proteína codificada pelo gene PARK2 foi denominada parkina, e mutações homozigóticas neste gene desencadeiam a doença, o que é compatível com o padrão de herança observado nos pacientes. Mais de mil mutações de ponto, além de rearranjos exônicos, como deleções e duplicações, já foram descritas neste gene desde então (30, 36, 82), inclusive mutações em sua região promotora (34). Defeitos

genéticos diferentes, em uma mesma irmandade, também foram identificados, sugerindo uma frequência destas mutações, na população em geral, maior do que a atualmente estimada (83). Tal variedade de mutações, somadas ao grande tamanho do gene da parkina (12 éxons, 465 aminoácidos e um tamanho total de 1,3Mb) fazem do estudo deste gene um processo detalhado e trabalhoso, envolvendo técnicas de sequenciamento e de dosagem gênica (84).

Estudos de prevalência das mutações no gene da parkina em pacientes com DP identificaram uma relação clara de sua frequência com a idade de início dos pacientes e a presença de casos na família, de tal forma que é possível estimar a chance de se encontrar mutações neste gene de acordo com as características do paciente. Por exemplo, entre os pacientes com uma idade de início inferior a 20 anos e com recorrência na família, mutações no gene da parkina são identificadas em mais de 90% dos casos. Este número vai diminuindo de acordo com o aumento da idade de início e a ausência de história familiar, de tal forma que, entre pacientes com idade de início entre 40 e 45 anos, sem herança familiar, mutações no gene da parkina são encontradas em somente cerca de 9% dos casos (85).

Entre os pacientes com DP de início tardio, mutações no gene da parkina são raras; não foram detectadas entre 118 pacientes dos Estados Unidos (86). Existem, entretanto, relatos de pacientes com idade de início até os 60 a 70 anos de idade (31, 87) e, aparentemente, a presença de apenas uma mutação neste gene pode servir como um fator de risco para o surgimento de DP de início tardio (ver abaixo) (88, 89, 90).

No Brasil, a testagem de treze casos isolados com início abaixo dos 45 anos identificou um caso positivo para mutação neste gene (perfazendo 8%) (91). Outros casos positivos foram identificados em séries menores, incluindo um caso local, descrito por Bertolli-Avella em 2005 (92). Além disso, duas famílias brasileiras isoladas, consangüíneas e numerosas apresentando DP com mutações homozigóticas no gene da parkina foram também descritas (93,94).

Os demais países em que pacientes com mutações do gene da parkina foram descritos são: Estados Unidos (95, 96), Inglaterra, Itália, Alemanha, Rússia, Irlanda, Holanda, Portugal e França (82, 91, 92, 97, 98), Tunísia (99), Argentina, Argélia, Líbano, Vietnã e Paquistão (97). O estudo comparativo das mutações encontradas nesses países permitiu determinar que as mutações caracterizadas por deleções exônicas, devido aos pontos de quebra diferentes entre os pacientes, mais provavelmente resultem de fenômenos novos, enquanto as mutações de ponto, por compartilharem semelhanças haplotípicas mesmo entre pacientes de origens tão diversas, são sugestivas de uma ancestralidade comum (97).

A apresentação clínica da DP causada por mutações no gene PARK2 possui algumas particularidades: caracteriza-se pelo início precoce dos sintomas, com distonias dos membros inferiores no início do quadro ou na evolução, podendo haver piramidalismo. A resposta à levodopa é importante e sustentada, sendo freqüentemente acompanhada de flutuações motoras e discinesias (82, 98). Entretanto, a evolução da doença tende a ser mais lenta do que os casos sem mutações deste gene. Na histopatologia, uma das características mais marcantes da DP associada a mutações no gene da parkina é a ausência de corpos de Lewy na *substantia nigra* (81, 99), embora os demais aspectos de gliose e perda neuronal estejam presentes, e embora haja descrição de um caso com corpos de Lewy presentes (100).

g) PARK6: gene da proteína PINK1

O gene do *locus* PARK6 foi identificado como causador de DP em 2001, em uma extensa família siciliana consangüínea. Mais tarde detectado em outras famílias consangüíneas com DP (101), somente teve sua proteína descoberta em 2004: a proteína PINK1 - fosfatase e tensina (PTEN) quinase 1 putativa homóloga-induzida

(102). Esta proteína localiza-se no interior das mitocôndrias, e a presença de mutações não modifica sua localização, mas prejudica sua função, de forma a desencadear uma maior taxa de apoptose induzida pelo *stress* em culturas celulares. Como as mutações descritas nos indivíduos com DP envolvem o domínio quinase putativa serina/treonina desta proteína, é compreensível a perda de função observada com as mutações homozigóticas (102).

A frequência de mutações detectadas no gene PINK1 entre pacientes com DP de início precoce fica em torno de 1,2% (103) a 4,4% (104). Entre pacientes que, além da baixa idade de início possuem recorrência familiar com padrão de herança autossômico recessivo, e que já foram excluídos para mutações nos genes PARK2 e PARK7, a detecção de mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas no gene PINK1 pode chegar a 20% (101). Entre indivíduos com idade de início tardia, raramente, também podem ser detectadas mutações (até 0,8% dos casos) (103).

As mutações no gene PINK1 estão presentes em famílias de vários países: Japão, Taiwan, Israel, Turquia, Filipinas (101), Itália (102, 103), Espanha (102), Irlanda (105) e, agora, Brasil. Nos Estados Unidos, foram estudadas por Deng, em 2007, mas não foram detectadas em nenhum caso (90). A análise de haplótipos entre os indivíduos com mutações deste gene ao redor do mundo não evidenciou haplótipos comuns, excluindo a possibilidade de um efeito fundador para as mutações (101).

Do ponto de vista clínico, os pacientes que apresentam DP associada a mutações no gene PINK1 apresentam um início muito precoce de sintomas, com progressão lenta e resposta excelente à levodopa. O início pode ser simétrico, com melhora com o sono e distonias no início do quadro, lembrando o fenótipo da DP associada a mutações no gene da parkina (104), ou pode ser igual a uma DP típica (101). Indivíduos portadores de mutações heterozigóticas tendem a apresentar uma idade de início mais tardia, o que raramente também está descrito entre homozigóticos, chegando até os 67 anos (103). Até o momento, não há descrições da

histopatologia cerebral de nenhum paciente com DP associado a mutações do gene PINK1.

h) PARK7: gene da proteína DJ-1

Em famílias consangüíneas com DP, da Holanda e Itália, a identificação do gene DJ-1 foi realizada em 2003, em um *locus* denominado PARK7. Uma das famílias apresentava uma grande deleção homozigótica nos éxons 1 a 5 da proteína DJ-1 incluindo o sítio promotor deste gene. A outra apresentava mutação homozigótica do tipo *missense*, ocasionando uma troca de aminoácidos (106,107).

A análise subsequente de 91 famílias francesas (17 consangüíneas) com, no mínimo, um indivíduo com DP de início precoce, além de nove casos isolados com início precoce e consangüinidade paterna não evidenciou nenhum caso positivo (108). Entre outros 100 casos de DP com início precoce provenientes de diversos países, dois casos apresentaram mutações heterozigóticas: um proveniente da Rússia com início de sintomas aos 17 anos e outro proveniente da Itália com início de sintomas aos 42 anos. Ambos apresentavam um fenótipo típico de DP, porém com progressão mais lenta da incapacidade. Além desses casos, este estudo detectou também a ocorrência de polimorfismos em 1,5% dos casos e dos controles (99 indivíduos sadios) (109).

Polimorfismos e mutações heterozigóticas parecem ser mesmo as alterações mais comuns do gene DJ-1 entre os indivíduos com DP. Em mais uma grande série de 89 pacientes com DP de início precoce e 354 controles, apenas uma mutação heterozigótica e dois polimorfismos, em um caso e um controle, foram identificados (110).

Embora a função da proteína DJ-1 não seja totalmente conhecida, é provável que atue como uma chaperona, auxiliando no processo de conformação protéica e na degradação protéica pelo proteassoma e sendo ativada pela presença de reações

oxidativas no citoplasma. Há evidências, inclusive, de que a alfa-sinucleína seja um substrato desta proteína: *in vitro*, a hiper-expressão de DJ-1 reduz os agregados citoplasmáticos de alfa-sinucleína, o que não é observado quando se expressa uma forma mutante da proteína DJ-1. Mutações neste gene também alteram a resposta celular ao *stress* oxidativo, relacionando-se com aumento da apoptose (111).

i) PARK9: gene da ATP13A2

O gene da proteína ATP13A2 foi descrito em uma irmandade consangüínea da Jordânia com um fenótipo inicialmente denominado de doença de Kufor-Rakeb: início na adolescência de letargia, rigidez, bradicinesia global, dificuldades na marcha e alterações na postura, seguidos de disfagia, disartria e perda cognitiva (112).

Apenas mais uma família chilena havia sido descrita quando uma mutação nova, homozigótica, deste gene foi encontrada em um caso isolado, não-consangüíneo, de parkinsonismo com início aos 12 anos, no Brasil. Esta mutação não foi detectada em 249 indivíduos controle (hígidos) nem em outros 78 pacientes com DP típica de início precoce da mesma população (113).

Na investigação de outros 10 pacientes com DP típica de início juvenil e 45 de início precoce, do Brasil e da Itália, (33 isolados e 13 com história familiar autossômica recessiva) foram detectados dois casos com mutações heterozigóticas do tipo *missense*, provavelmente causando perda de função da proteína ATP13A2, devido à troca de aminoácidos em uma porção extremamente conservada da proteína e com localização provavelmente relevante do ponto de vista funcional (113).

Devido a sua associação com DP típica em seu estado heterozigótico, e DP de início juvenil em seu estado homozigótico, as mutações identificadas no gene da ATP13A2 fizeram com que este gene recebesse a denominação de *locus* PARK9,

embora seu papel nas demais formas de DP e em outras populações não seja ainda conhecido.

A proteína ATP13A2 localiza-se nos lisossomos quando normal, e é retida no retículo endoplasmático quando mutada, sendo degradada pelo proteassoma. Sua expressão principal é nos tecidos cerebrais, sendo que, em pacientes portadores de DP, suas concentrações nos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* são cerca de 10 vezes maiores do que nos indivíduos-controle (34).

3.7 Genes predisponentes à doença de Parkinson

Além dos genes principais, condicionantes de doença, outros genes foram encontrados como associados ao aumento do risco de desenvolvimento de DP, sendo denominados genes predisponentes ou de suscetibilidade. Genes que se associam com redução do risco para DP (genes protetores) também estão descritos, entre eles uma variante específica de uma enzima do complexo I mitocondrial (114).

Entre os genes de suscetibilidade estão exemplos como os genes da proteína tau, da apolipoproteína E (21) e o gene NR4A2, que codifica um receptor nuclear necessário para a diferenciação e a manutenção dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* (32). O gene da sinifilina-1, outro gene de suscetibilidade, codifica uma proteína que está presente nos corpos de Lewy, é um substrato da parkina e interage diretamente com a alfa-sinucleína. Estudos funcionais sugerem que a sinifilina-1, quando mutada, pode agregar-se formando inclusões citoplasmáticas e pode aumentar as taxas de apoptose celular, em culturas *in vitro* (30).

Também os genes principais podem exercer um papel de genes predisponentes quando as mutações que os afetam não produzem alterações fortemente patogênicas nas proteínas. Tanto o gene da alfa-sinucleína (115) quanto o gene da parkina (88), quando exibem determinados polimorfismos de nucleotídeo

único, promovem maior risco de desenvolvimento de DP sem, entretanto, condicionar de forma mendeliana esta ocorrência.

Os polimorfismos da parkina associam-se com uma menor idade de início dos sintomas de DP (116) e com maior risco para desenvolvimento de paralisia supranuclear progressiva (uma patologia caracterizada por neurodegeneração associada ao acúmulo de proteína tau), o que pode ser explicado pelo fato de que a proteína tau é um substrato da parkina na sua rota de degradação pelo proteossoma celular (117).

j) Gene GBA: gene da glicocerebrosidase

Até o momento, o principal gene de suscetibilidade para DP conhecido é o gene da glicocerebrosidase, ou glicosilceramidase (GBA). Este gene codifica uma enzima lisossômica que tem como substrato o glicocerebrosídeo, fazendo a hidrólise deste substrato em glicose e ceramida (118). Mutações homozigóticas deste gene ocasionam um acúmulo de glicocerebrosídeo nas células do sistema macrófago-monocitário, ocasionando alterações em diferentes tecidos como pele, ossos, válvulas cardíacas, fígado, baço e tecido pulmonar, determinando uma doença de depósito chamada doença de Gaucher (114).

A doença de Gaucher é a doença lisossômica de depósito mais comum. Sua prevalência é maior na população de judeus Ashkenazi, onde sua forma não-neuronopática (tipo 1) atinge um em cada 855 indivíduos, e onde um em cada 18 indivíduos é portador de uma mutação heterozigótica neste gene. Em outras populações, a prevalência da doença varia entre 1:5700 (Austrália) e 1,16:100.000 (Holanda) (114).

Quatro mutações (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1) são responsáveis por, aproximadamente, 90% dos alelos mutantes na população de judeus Ashkenazi. Em

outras populações, são detectadas em cerca de 50-60% dos alelos patogênicos, ocorrendo, geralmente, em heterozigose composta com uma das mutações mais raras (V394L, D409H, D409V, R463C, R463H, R496H, entre outras) (114).

Para o diagnóstico desta doença, além da pesquisa direta de mutações específicas, tanto das mais comuns quanto das mais raras, também é possível fazer o sequenciamento completo do gene e a dosagem da atividade leucocitária da enzima GBA através de um ensaio fluorimétrico com o uso do substrato 4-metilumbelliferil- -D-glucopiranosídeo (119). A atividade desta enzima, nos leucócitos de indivíduos sadios, varia de 7.0 a 25.3 nmol/h/mg proteína, enquanto nos portadores de doença de Gaucher varia entre 0 a 3.9 nmol/h/mg proteína (120). Valores intermediários podem ser considerados sugestivos de heterozigose, embora haja alguma superposição com os resultados de indivíduos normais (114).

A doença de Gaucher é herdada de forma autossômica recessiva e manifesta-se de três formas principais, de acordo com a presença de comprometimento neurológico e com a evolução/ idade de apresentação. O tipo 1 é o mais comum, não apresenta comprometimento neurológico, mas caracteriza-se por doença óssea, hepato- e esplenomegalia, citopenias e doença pulmonar. O tipo 2 manifesta-se predominantemente na infância e caracteriza-se pelos mesmos achados clínicos, acrescidos de doença neurológica com comprometimento cognitivo e sinais bulbares e piramidais. O tipo 3 consiste em alterações sistêmicas (citopenias, doença pulmonar, esplenomegalia) com comprometimento neurológico do tipo crises epilépticas e epilepsia mioclônica progressiva (121).

A histopatologia dos tecidos afetados, como o baço, por exemplo, evidencia a presença das chamadas “células de Gaucher”: macrófagos contendo acúmulo de glicocerebrosídeo em seu citoplasma, com aspecto de “papel enrugado” (122). No tecido cerebral dos pacientes sem doença neurológica (doença de Gaucher tipo 1) ocorrem alterações como gliose e astrocitose; não se observam acúmulos de glicocerebrosídeo, embora algumas células de Gaucher estejam presentes, em

localização perivascular. Nos indivíduos com comprometimento neurológico (doença de Gaucher tipos 2 e 3), ocorre perda neuronal e a presença de acúmulos protéicos do tipo corpos de Lewy, especialmente nas camadas CA2-CA4 do córtex hipocampal (123, 124), além de um conteúdo cerebral aumentado de glicocerebrosídeo (120, 124).

Em 1996, Neudorfer e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a ocorrência do fenótipo parkinsoniano em um paciente portador de doença de Gaucher do tipo 1 (125). Este fenótipo, mesmo posteriormente, permaneceu muito raro, com apenas um caso descrito no Brasil, em 2007 (122). O estudo de 17 portadores dessa condição demonstrou que, na histopatologia cerebral, repetiam-se os corpos de Lewy nos neurônios das camadas hipocampais CA2-CA4, porém sem aumento dos níveis cerebrais de glicocerebrosídeo (124). Outra característica desses pacientes foi a presença da mutação N370S, um genótipo até então considerado “neuroprotetor”, por condicionar o tipo 1, não-neuronopático da doença.

O estudo de pacientes com doença de Parkinson, entretanto, entre judeus Ashkenazi, demonstrou um alto risco da presença de mutações heterozigóticas no gene GBA, sendo sete vezes maior quando comparado a indivíduos sadios e dez vezes maior quando comparado a portadores de doença de Alzheimer (118), levantando a possibilidade de mutações no gene GBA, mesmo quando não suficientes para causar a ocorrência de doença de Gaucher, pudessem agir como um gene predisponente à DP.

Vários estudos reforçam esta associação. Entre portadores de DP, verificou-se que a ocorrência de mutações heterozigóticas no gene GBA tem freqüência significativamente maior do que na população em geral em diversos países do mundo (126, 127, 128, 129, 130), inclusive no Brasil (131,132). Entre familiares de pacientes com doença de Gaucher, verificou-se que a ocorrência de DP é cerca de duas vezes maior do que a da população sem história familiar para doença de Gaucher (133). Apenas o estudo de uma população procedente da Noruega não evidenciou associação significativa entre DP e mutações no gene GBA (134). Entretanto, entre

pacientes com outra sinucleinopatia: demência por corpos de Lewy também foi verificada maior frequência de mutações neste gene (135).

Mais recentemente, o estudo de 278 pacientes com DP e 179 indivíduos-controle demonstrou, não somente uma maior frequência de mutações heterozigóticas do gene GBA entre os portadores de DP, mas também uma maior associação entre a presença de mutações e a idade de início precoce (<50 anos), sendo que, neste grupo, os pacientes portadores de mutações apresentaram uma idade de início cerca de 2,5 anos menor do que aqueles sem mutações (130).

3.8 Contribuições para o entendimento fisiopatogênico da doença de Parkinson a partir dos fatores ambientais e genéticos

Embora a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que levam ao surgimento da DP ainda esteja grandemente incompleta, o estudo dos fatores ambientais, aliado a todas as descobertas genéticas, permitiu delinear prováveis sistemas envolvidos, o que, em última análise, tem grande importância para o desenvolvimento de tratamentos futuros.

A agregação e deposição protéicas dentro das células é um processo crucial para o desenvolvimento da DP; não por acaso, a formação dos corpos de Lewy pelas proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina é o critério anátomo-patológico mais relevante para o seu diagnóstico, ainda que o significado dessas inclusões citoplasmáticas ainda não seja conhecido.

Há vários mecanismos que levam à agregação e deposição protéicas: a falha na degradação causada por anormalidades no substrato (como nas mutações do gene da alfa-sinucleína – PARK1), pelo excesso de substratos (como nas triplicações e duplicações no gene da alfa-sinucleína – PARK4) ou, ainda, por alterações da rota da ubiquitina. Esta rota altera-se nas mutações do gene da parkina (PARK2), uma ligase

que acopla moléculas de ubiquitina no substrato para sinalizar sua degradação pelo proteassoma, nas mutações do gene DJ-1, cuja proteína que pode ter uma função importante como chaperona no processo de conformação protéica e degradação pelo proteassoma, ou ainda nas mutações do gene da ubiquitina carboxi-terminal hidrolase 1 (UCHL-1 – PARK5), enzima que promove a desubiquitinização de compostos, mas também exerce função de ligase da ubiquitina, sendo um alvo provável do *stress* oxidativo intracelular (136).

A interação com fatores ambientais também pode exercer um papel modificador sobre a agregação protéica: enquanto a exposição a pesticidas aumenta a deposição de alfa-sinucleína nos ratos em que esta proteína é mutante (137), a hiperexpressão da alfa-sinucleína exerce um papel protetor contra a toxicidade por paraquat em ratos (138). Em humanos, a toxicidade sobre os neurônios observada com o acúmulo de alfa-sinucleína não parece ser devida ao efeito direto desta proteína, mas sim à formação de espécies reativas de oxigênio em um processo dependente de dopamina, o que explicaria a maior suscetibilidade dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra (139).

A presença de anormalidades lipídicas (como nos pacientes portadores de mutações heterozigóticas no gene GBA) pode contribuir para a agregação da alfa-sinucleína, e para uma eventual toxicidade desta proteína, uma vez que ela circula agregada às vesículas sinápticas e a alteração na membrana lipídica destas vesículas pode modificar esta associação, liberando formas monoméricas de alfa-sinucleína no citoplasma e favorecendo sua deposição (140, 141).

Acúmulos protéicos também caracterizam as ataxias espinocerebelares, que apresentam inclusões protéicas intranucleares. Tais doenças, como já citado, podem apresentar-se através de um fenótipo parkinsoniano, demonstrando a suscetibilidade dos neurônios dopaminérgicos a outros acúmulos que não os de alfa-sinucleína e ubiquitina, como nos corpos de Lewy. Ainda não estão identificados os mecanismos pelos quais a expressão de ataxinas expandidas possa levar à ocorrência de DP, mas

há evidências de que a parkina exerça um papel importante na degradação da ataxina 2, tanto em sua forma normal (*wild-type*) quanto em suas formas mutantes, ao promover sua ligação com moléculas de ubiquitina. Esta relação pode contribuir para ampliar o entendimento desses mecanismos e, principalmente, para futuros alvos terapêuticos (143).

A função mitocondrial é, provavelmente, outro processo-alvo na fisiopatogenia da DP: sua suscetibilidade a fatores tóxicos ambientais (como a rotenona) e ao *stress* oxidativo, bem como o fato de ser o local onde se localizam as proteínas PINK1 (gene PARK6) e DJ-1 (gene PARK7), reforçam esta hipótese.

In vitro, o aumento da expressão da proteína PINK1 possui efeito protetor contra fatores de *stress* metabólico intracelular (Healy 2004 neurology) e previne apoptose, enquanto suas formas mutantes aumentam a ativação da caspase 3, que media este processo, além de aumentarem a toxicidade da rotenona (Gasser 2007). Na *Drosophila*, a disfunção mitocondrial causada pelas formas mutantes de PINK1 acarreta degeneração dos neurônios dopaminérgicos e de grupos musculares, o que, entretanto, é revertido quando se promove a hiper-expressão da parkina (Gasser 2007).

Por fim, outros mecanismos podem estar presentes na fisiopatogenia da DP, envolvendo eventos inflamatórios e resposta imune. Algumas evidências epidemiológicas para tal são o aparente efeito protetor para DP exercido pelo uso crônico de antiinflamatórios não-esteróides e o aumento de risco para DP em pacientes que sofreram traumatismos cranioencefálicos (Papachroni 2007). Evidências histológicas incluem a proliferação de células gliais na substantia nigra dos pacientes com DP, as quais podem funcionar como células apresentadoras de antígenos, ativando as respostas imunológicas, e o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios como a interleucina-6 e a molécula de adesão intercelular-1 estimulados pela presença de alfa-sinucleína mutante (Klein 2007). Ainda, a presença de auto-anticorpos contra alfa-sinucleína em pacientes com DP familiar em quantidades

significativamente maiores do que os pacientes com DP esporádicos e indivíduos-controle, sugere um papel imunológico neste processo (Papachroni 2007).

Em suma, as formas monogênicas da DP, embora sejam encontradas em uma baixa proporção (apenas 2 a 3%) dos casos, contribuíram muito para o entendimento dos mecanismos fisiopatogênicos desta doença, participando, provavelmente, de uma complexa interação com os fatores ambientais e os fatores genéticos de suscetibilidade, de forma a, não apenas determinar sua ocorrência, mas também a modificar suas características como gravidade, idade de início, entre outros (Klein 2007).

Tabela 1 - Genes principais associados à DP autossômica dominante

Gene	locus	Proteína	Função	Início (anos)	Características clínicas	Histopatologia
PARK1	4q21-q22	alfa-sinucleína	Ligação de vesículas sinápticas	~40	Menor prevalência de tremor	Degeneração SN Corpos Lewy
PARK3	2p13	desconhecida	Desconhecida	~60	Progressão rápida Demência	Degeneração SN Corpos Lewy Emaranhados NF Placas senis
PARK4	4q21	alfa-sinucleína (duplicação/ triplicação)	Idem PARK1	30-60	Rápida progressão Demência Tremor postural Disfunção autônômica	Degeneração SN Corpos Lewy Vacúolos nos neurônios hipocampus
PARK5	4p14	ubiquitina hidrolase L1 C-terminal (UCHL-1)	Hidrolase/ ligase ubiquitina	~50	DP típica	Não descrita
PARK8	12p 11.2- q13.1	dardarina (LRRK2)	Proteína quinase	~60	DP típica	Degeneração SN Corpos Lewy Emaranhados NF Placas senis
PARK10	1p32	Desconhecido		50-60	DP típica Início tardio	Não descrita
PARK11	2q34	Desconhecido		Tardio	DP típica	Não descrita

Tabela 2 - Genes principais associados à DP autossômica recessiva

Gene	locus	Proteína	Função	Início (anos)	Características clínicas	Histopatologia
PARK2	6q25.2-q27	Parkina	E3 ligase da ubiquitina	20-40	Progressão lenta Distonia e discinesias mais frequentes Hiperreflexia	Degeneração SN SEM corpos de Lewy
PARK6	1p35-37	PTEN-Induced Putative Kinase 1 (PINK1)	Proteína quinase mitocondrial	30-40	Progressão lenta	Não descrita
PARK7	1p36	DJ1	Resposta celular ao stress oxidativo?	30-40	Progressão lenta Sintomas psiquiátricos	Não descrita
PARK9	1p36	ATP13A2	ATPase lisossômica	Juvenil	Espasticidade Paralisia supranuclear do olhar Demência	Não descrita

Tabela 3 - Características moleculares das ataxias espinocerebelares

	Proteína	Seqüência expandida	Tamanho do alelo (número de repetições)		
			normal	Intermediário	Patogênico (penetrância completa)
SCA1	Ataxina 1	CAG	6-44	36-38	39-91
SCA2	Ataxina 2	CAG	<31	Não descrito	>32
SCA3	Ataxina 3	CAG	<44	45-51 (penetrância reduzida)	52-86
SCA6	CACNA1A*	CAG	<18	19 (significado questionável)	20-33
SCA7	Ataxina 7	CAG	<19	28-33 (mut normal) 34-36 (significado questionável)	>36

* Subunidade alfa-1a do canal de cálcio voltagem-dependente tipo P/Q

4 JUSTIFICATIVA

Em nosso meio, apesar da prevalência da DP não ser conhecida, existe uma grande população de parkinsonianos, muitos com história familiar positiva ou com início precoce de sintomas. O presente estudo proporcionará a identificação dos casos de etiologia monogênica, seja dentro do diagnóstico de DP ou redefinindo o diagnóstico para ataxia espinocerebelar, e ainda proporcionará a detecção de pacientes portadores de genes de suscetibilidade para esta doença. Estes dados favorecerão adaptações na terapêutica individual, bem como possibilitarão o estabelecimento de risco para as famílias em questão.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a existência de mutações em genes principais e genes predisponentes para doença de Parkinson em uma amostra de pacientes com esta condição.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconhecer a presença de mutações recessivas nos genes PARK2, PARK6 e PARK7 em um subgrupo selecionado de indivíduos parkinsonianos, seja por sua idade de início precoce, por consangüinidade entre os pais ou recorrência na irmandade.

- Reconhecer a presença de mutações no gene PARK8 no mesmo subgrupo.

- Reconhecer a presença de mutações dominantes nos genes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 e SCA7 em um segundo subgrupo selecionado de pacientes, os quais possuam história familiar sugestiva de herança autossômica dominante ou que apresentem outras manifestações neurológicas associadas, presentes na ataxia espinocerebelar.

- Averiguar a presença das mutações comuns L4444P, N370S, IVS 2+1 e 84GG no gene da enzima glicocerebrosidase associadas a risco aumentado para doença de Parkinson, bem como a atividade desta enzima, em todos os pacientes incluídos neste estudo.

- Correlacionar as mutações encontradas com as características clínicas, epidemiológicas e genéticas dos pacientes investigados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000; 54(11 Suppl 5): S21-3.

2. Baldereschi M, di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000; 55(9): 1358-63.

3. Munoz E, Pastor P, Marti MJ, Valldeoriola F, Oliva R, Tolosa E. Sporadic and familial Parkinson's Disease: comparative study. *Med Clin (Barc)* 2001; 116(16): 601-4.

4. Morgante L, Salemi G, Meneghini F, Di Rosa AE, Epifanio A, Grigoletto F, Ragonese P, Patti F, Reggio A, Di Perri R, Savettieri G. Parkinson Disease Survival. A Population-Based Study. *Arch Neurol*. 2000; 57:507-512.

5. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, Cardoso F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). *Mov Disord* 2006; 21(6): 800-8.

6. Victor M, Ropper AH. Degenerative diseases of the nervous system. In: Victor M, Ropper AH. Adams and Victor's Principles of Neurology. New York. McGraw-Hill Co. 7th Ed. 2001; 1106-1174.

7. Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's Disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 75-86.

8. Rieder CRM; Picon PD; Amaral KM;Picon PD; Beltrame A;. Doença de Parkinson. In: Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. Ministério da Saúde. Brasília - DF 2002 Dec 12; 235-260.

9. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1): 33-9.

10. Duarte J, Clavería LE, De Pedro-Cuesta J, Sempere AP, Coria F, Calne B. Screening Parkinson's Disease: a validated questionnaire of high specificity and sensivity. *Mov Disord* 1995; 10(5): 643-9.

11. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002; 125(4): 861-70.

12. Haerer AF. Abnormal Movements. In: De Jong's The Neurologic Examination. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1992. p. 402-419.

13. Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ.A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1993; 50(2):140-8

14. Haerer AF. Muscle Tone. In: De Jong's The Neurologic Examination. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1992. p. 375-385.

15. Lees AJ. Unresolved Issues Relating to the Shaking Palsy on the Celebration of James Parkinson's 250th Birthday. *Movement Disorders* 2007; 22(Suppl. 17): 327-334

16. Goetz CG, Poewe W, Olivier Rascol, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, et al. Movement Disorders Society Task Force report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: status and recommendations. *Mov Disord*. 2004; 19(9):1020-8.

17. Poewe W. Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. In: *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins 5th Ed. 2007. p. 67-76.

18. Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, Healy DG, Gilks WP, Sweeney MG, Ganguly M, Gibbons V, Gandhi S, Vaughan J, Eunson LH, Katzenschlager R, Gayton J, Lennox G, Revesz T, Nicholl D, Bhatia KP, Quinn N, Brooks D, Lees AJ, Davis MB, Piccini P, Singleton AB, Wood NW. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* 2005; 128(Pt 12):2786-96.

19. Rascol O, Brooks DJ, Korczyn A, De Deyn P, Clarke CE, Lang A, for the 056 Study Group. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 2000; 342: 1484-91.

20. De Girolami U, Frosch MP, Anthony DC. The Central Nervous System. In: *Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia. WB Saunders Company. 5th ed. 1994. p1295-1356.

21. Przedborski S. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. In: Parkinson's Disease and Movement Disorders. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins 5th Ed. 2007. p 77-92.

22. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. Nature 1997; 388: 839-840.

23. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. α -Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. Neuropathology and Applied Neurobiology 2006; 32: 284–295.

24. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 2003; 24(2):197-211.

25. Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. Proc. Natl.Acad. Sci. 1983; 80: 4546-4550.

26. Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. Hum Mol Genet 1997; 6(10):1687–1691.

27. Kumar A, Calne SM, Schulzer M, Mak E, Wszolek Z, Van Netten C, Tsui JKC, Stoessl J, Calne DB. Clustering of Parkinson's Disease: shared cause or coincidence? Arch Neurol 2004; 61: 1057-1060.

28. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274(5290):1197-9.

29. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7

30. Pankratz NP, Wojcieszek J, Foroud T. Parkinson's disease overview. In: *GeneReviews* 2007; <http://www.genetests.com>. Last revision: 2 Oct 2007.

31. Teive HA, Raskin S, Iwamoto FM, Germiniani FM, Baran MH, Werneck LC, Allan N, Quagliato E, Leroy E, Ide SE, Polymeropoulos MH. The G209A mutation in the alpha-synuclein gene in Brazilian families with Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59(3-B): 722-4.

32. Le W, Appel S. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 79-84.

33. Ki CS, Stavrou EF, Davanos N, Lee WY, Chung EJ, Kim JY, Athanassiadou A. The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. *Clin Genet* 2007; 71(5): 471-3

34. Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease.

Curr Opin Neurol 2007; 20(4):453-64.

35. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55(2): 164-73.

36. Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Rev* 2004; 46: 44-70.

37. Gwinn-Hardy K. Genetics of Parkinsonism. *Mov Disord* 2002; 17(4): 645-56.

38. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentzer M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 2003; 302: 841.

39. Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR, Singleton AB. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 2004; 62(10):1835-8

40. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364(9440): 1167-9

41. Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364(9440): 1169-71.

42. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59(2): 298-309

43. Obi T, Nishioka K, Ross OA, Terada T, Yamazaki K, Sugiura A, Takanashi M, Mizoguchi K, Mori H, Mizuno Y, Hattori N. Clinicopathologic study of a SNCA gene duplication patient with Parkinson disease and dementia. *Neurology* 2008; 70: 238-9

44. Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, Langston JW, Middleton FA, Ross OA, Hulihan M, Gasser T, Farrer MJ. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 2007; 68(12): 916-22.

45. Ahn TB, Kim SY, Kim JY, Park SS, Lee DS, Min HJ, Kim YK, Kim SE, Kim JM, Kim HJ, Cho J, Jeon BS. Alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70(1): 43-9.

46. Gispert S, Trenkwalder C, Mota-Vieira L, Kostic V, Auburger G. Failure to find alpha-synuclein gene dosage changes in 190 patients with familial Parkinson disease. *Arch Neurol* 2005; 62(1):96-8.

47. Johnson J, Hague SM, Hanson M, Gibson A, Wilson KE, Evans EW, Singleton AA, McInerney-Leo A, Nussbaum RL, Hernandez DG, Gallardo M, McKeith

IG, Burn DJ, Ryu M, Hellstrom O, Ravina B, Eerola J, Perry RH, Jaros E, Tienari P, Weiser R, Gwinn-Hardy K, Morris CM, Hardy J, Singleton AB. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; 63(3): 554-6.

48. Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, Hardy J, Singleton A, Crawley A, Goldstein DS. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004; 127(Pt 4): 768-72

49. Facheris M, Strain KJ, Lesnick TG, de Andrade M, Bower JH, Ahlskog JE, Cunninghamc JM, Lincoln S, Farrer MJ, Rocca WA, Maraganore DM. UCHL1 is associated with Parkinson's disease: A case-unaffected sibling and case-unrelated control study *Neurosci Lett* 2005; 381 (1-2): 131–134

50. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA; UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 2004; 55(4):512-21

51. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 2002; 51(3): 296–301.

52. Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. A frequent

LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. Lancet 2005; 365(9457): 412-5.

53. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. Am J Hum Genet 2005; 76(4): 672-80.

54. Perez-Pastene C, Cobb SA, Díaz-Grez F, Hulihan MM, Miranda M, Venegas P, Godoy OT, Kachergus JM, Ross OA, Layson L, Farrer MJ, Segura-Aguilar J. Lrrk2 mutations in South America: A study of Chilean Parkinson's disease. Neurosci Lett 2007; 422(3): 193-7

55. Pimentel MM, Moura KC, Abdalla CB, Pereira JS, Rosso AL, Nicaretta DH, Junior MC, Almeida RM, Santos JM, Bastos IC, Mendes MF, Maultasch H, Costa FH, Werneck AL, Santos-Rebouças CB. A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil. Neurosci Lett. 2007 Dec 23; [Epub ahead of print]

56. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. Lancet 2005; 365 (9457): 415-16.

57. Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ, Rohé CF, Zini M, Canesi M, Tesei S, Zecchinelli A, Antonini A, Mariani C, Meucci N, Sacilotto G, Sironi F, Salani G, Ferreira J, Chien HF, Fabrizio E, Vanacore N, Dalla Libera A, Stocchi F, Diroma C, Lamberti P, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Bertoli-Avella AM, Breedveld GJ, Oostra BA, Pezzoli

G, Bonifati V. 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(11): e65.

58. Goldstein DS, Imrich R, Peckham E, Holmes C, Lopez G, Crews C, Hardy J, Singleton A, Hallett M. Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation. *Neurology* 2007; 69(16):1580-4.

59. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44(4): 601-7.

60. Gaig C, Martí MJ, Ezquerra M, Rey MJ, Cardozo A, Tolosa E. G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78(6):626-8.

61. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004; 3(5): 291-304.

62. Soong BW, Paulson HL. Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 2007; 20(4):438-46

63. Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, Saute JA, Artigalás O, Kieling C, Wanderley HY, Rieder CR, Monte TL, Socal M, Alonso I, Ferro A, Carvalho T, do Céu Moreira M, Mendonça P, Ferreirinha F, Silveira I, Sequeiros J, Giugliani R, Saraiva-Pereira

ML. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 2006; 70(2):173-6.

64. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Moreira MC, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R. A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *J Neurol* 2001; 248: 870-6.

65. Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, Liu TY, Boss M, Seltzer W, Adam A, Singleton A, Koroshetz W, Waters C, Hardy J, Farrer M. Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology* 2000; 55(6):800-5.

66. Wilder-Smith E, Tan EK, Law HY, Zhao Y, Ng I, Wong MC. Spinocerebellar ataxia type 3 presenting as an L-DOPA responsive dystonia phenotype in a Chinese family. *J Neurol Sci* 2003; 213(1-2): 25-8.

67. Muzaimi MB, Wiles CM, Robertson NP, Ravine D. Task specific orcal dystonia: a presentation of spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1444-1446.

68. Tuite PJ, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Lang AE. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol.* 1995; Tuite PJ, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Lang AE. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol.* 1995; 38(4):684-7.

69. Buhmann C, Bussopulos A, Oechsner M. Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord.* 2003; 18(2): 219-21.

70. Gwinn-Hardy K, Singleton A, O'Suilleabhain P, Boss M, Nicholl D, Adam A, Hussey J, Critchley P, Hardy J, Farrer M. Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling Parkinson disease in a black family. *Arch Neurol* 2001; 58(2): 296-9.

71. Yoritaka A, Nakagawa-Hattori Y, Hattori N, Kitahara A, Mizuno Y. A large Japanese family with Machado-Joseph disease: clinical and genetic analysis. *Acta Neurol Scand* 1999; 99(4): 241-4.

72. Giunti P, Sweeney MG, Harding AE. Detection of the Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia three trinucleotide repeat expansion in families with autosomal dominant motor disorders, including the Drew family of Walworth. *Brain*. 1995; 118 (Pt 5):1077-85.

73. Furtado S, Farrer M, Tsuboi Y, Klimek ML, De la Fuente-Fernández R, Hussey J, Lockhart P, Calne DB, Suchowersky O, Stoessl J, Wszolek ZK. SCA-2 presenting as parkinsonism in an Alberta family. Clinical, genetic, and PET findings. *Neurology* 2002; 59:1625–1627

74. Simon-Sanchez J, Hanson M, Singleton A, Hernandez D, McInerney A, Nussbaum R, Werner J, Gallardo M, Weiser R, Gwinn-Hardy K, Singleton AB, Clarimon J. Analysis of SCA-2 and SCA-3 repeats in Parkinsonism: evidence of SCA-2 expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005; 382(1-2): 191-4.

75. Payami H, Nutt J, Gancher S, Bird T, McNeal MG, Seltzer WK, Hussey J, Lockhart P, Gwinn-Hardy K, Singleton AB, Hardy J, Farrer M. SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord* 2002; 18(4): 425-9.

76. Lu CS, Wu Chou YH, Kuo PC, Chang HC, Weng YH. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol* 2004; 61(1):35-8.

77. Modoni A, Contarino MF, Bentivoglio AR, Tabolacci E, Santoro M, Calcagni ML, Tonali PA, Neri G, Silvestri G. Prevalence of spinocerebellar ataxia type 2 mutation among Italian Parkinsonian patients. *Mov Disord.* 2007; 22(3): 324-7.

78. Lee WY, Jin DK, Oh MR, Lee JE, Song SM, Lee EA, Kim GM, Chung JS, Lee KH. Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Korean patients. *Arch Neurol* 2003; 60(6): 858-63.

79. Schöls L, Krüger R, Amoiridis G, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(1): 67-73.

80. Kish SJ, Guttman M, Robitaille Y, El-Awar M, Chang LJ, Levey AI. Striatal dopamine nerve terminal markers but not nigral cellularity are reduced in spinocerebellar ataxia type 1. *Neurology* 1997; 48(4):1109-1111

81. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392(6676): 605-8.

82. Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Böhme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A, the French Parkinson's disease Genetics Study Group e the European

Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Molec Genetics* 1999; 8(4): 567-74.

83. Bonifati V, Lücking CB, Fabrizio E, Periquet M, Meo G, Brice A. Three parkin gene mutations in a sibship with autosomal recessive early onset parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71(4):531-4.

84. Mata IF, Lockhart PJ, FarrerMJ. Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2004; 13: R127-R133.

85. Brice A, Dürr A, Lücking C. Parkin type of juvenile Parkinson's disease. PARK2-Related Juvenile Parkinsonism. In: GeneReviews <http://www.genetests.com> Last Update: 1 October 2007.

86. Oliveri RL, Zappia M, Annesi G, Bosco D, Annesi F, Spadafora P, Pasqua AA, Tomaino C, Nicoletti G, Pirritano D, Labate A, Gambardella A, Logroscino G, Manobianca G, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G, Quattrone A. The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease. *Neurology* 2001; 57(2): 359-62.

87. Chaudharya S, Beharib M, Dihanab M, Swaminathc PV, Govindappac ST, Jayaramc S, Goyalb V, Maitrae A, Muthanec UB, Juyald RC, Thelma BK. Parkin mutations in familial and sporadic Parkinson's disease among Indians. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12: 239–245.

88. Biswas A, Maulik M, Das SK; Indian Genome Variation Consortium, Ray K, Ray J. Parkin polymorphisms: risk for Parkinson's disease in Indian population. *Clin Genet* 2007; 72(5): 484-6.

89. Lücking CB, Chesneau V, Lohmann E, Verpillat P, Dulac C, Bonnet AM, Gasparini F, Agid Y, Dürr A, Brice A. Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60(9): 1253-6.

90. Deng H, Le W, Shahed J, Xie W, Jankovic J. Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families. *Neurosci Lett*. 2008; 430(1):18-22.

91. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126(Pt 6): 1271-8.

92. Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O, van der Linde HC, Martignoni E, Lopiano L, Lamberti P, Fincati E, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Squitieri F, Marini P, Abbruzzese G, Fabbrini G, Marconi R, Dalla Libera A, Trianni G, Guidi M, De Gaetano A, Boff Maegawa G, De Leo A, Gallai V, de Rosa G, Vanacore N, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20(4): 424-31.

93. Chien HF, Rohé CF, Costa MD, Breedveld GJ, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V. Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil. *Neurogenetics* 2006; 7(1):13-9.

94. Khan NL, Horta W, Eunson L, Graham E, Johnson JO, Chang S, Davis M, Singleton A, Wood NW, Lees AJ. Parkin disease in a Brazilian kindred: Manifesting heterozygotes and clinical follow-up over 10 years. *Mov Disord* 2005; 20(4): 479-84

95. Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 2002; 58(8): 1239-46.

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

97. Periquet M, Lücking C, Vaughan J, Bonifati V, Dürr A, De Michele G, Horstink M, Farrer M, Illarioshkin SN, Pollak P, Borg M, Brefel-Courbon C, Deneffe P, Meco G, Gasser T, Breteler MM, Wood N, Agid Y, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from Founder effects. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3): 617-26

98. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, de Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A, for the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Association between early-onset parkinson's disease and mutations in the *parkin* gene. *N Engl J Med* 2000; 342:1560-7.

99. Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Ben Hamida C, Bem Hamida M, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003; 9(5): 247-51.

100. Dekker MC, Bonifati V, van Duijn CM. Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain* 2003; 126(Pt 8):1722-33

101. Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Ataç FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology.* 2004; 63(8):1482-5.

102. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304(5674):1158-60.

103. Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, Gulick C, Gwinn-Hardy K, Kawarai T, Sato C, Morgan A, Werner J, Nussbaum R, Petit A, Okun MS, McInerney A, Mandel R, Groen JL, Fernandez HH, Postuma R, Foote KD, Salehi-Rad S, Liang Y, Reimsnider S, Tandon A, Hardy J, St George-Hyslop P, Singleton AB. Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004; 61(12):1898-904.

104. Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De

Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA; Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65(1):87-95.

105. Healy DG, Abou-Sleiman PM, Gibson JM, Ross OA, Jain S, Gandhi S, Gosal D, Muqit MM, Wood NW, Lynch T. PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology* 2004; 63(8):1486-8.

106. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299(5604): 256-9.

107. Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 2003; 24(3):159-60.

108. Ibáñez P, De Michele G, Bonifati V, Lohmann E, Thobois S, Pollak P, Agid Y, Heutink P, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Screening for DJ-1 mutations in early onset autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 2003; 61(10): 1429-31.

109. Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J,

Bressman SB, Pramstaller PP, Riess O, Klein C. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology*. 2004; 62(3):389-94.

110. Clark LN, Afridi S, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Singleton A, Wavrant De-Vrieze F, Hardy J, Mayeux R, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations. *Mov Disord*. 2004; 19(7): 796-800.

111. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*. 2004; 2(11):e362.

112. Lees AJ, Singleton AB. Clinical heterogeneity of ATP13A2 linked disease (Kufor-Rakeb) justifies a PARK designation. *Neurology* 2007; 68(19): 1553-4.

113. Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini G, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, Squitieri F, Horstink MW, Montagna P, Libera AD, Stocchi F, Goldwurm S, Ferreira JJ, Meco G, Martignoni E, Lopiano L, Jardim LB, Oostra BA, Barbosa ER; The Italian Parkinson Genetics Network, Bonifati V. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68(19): 1557-62.

114. Pastores GM. Gaucher Disease. In: GeneReviews 2005; <http://www.genetests.com>. Last update: 13 March 2008.

115. Winkler S, Hagenah J, Lincoln S, Heckman M, Haugarvoll K, Lohmann-Hedrich K, Kostic V, Farrer M, Klein C. alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology* 2007; 69(18): 1745-50.

116. Ghione I, Di Fonzo A, Saladino F, Del Bo R, Bresolin N, Comi GP, Rango M. Parkin polymorphisms and environmental exposure: decrease in age at onset of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2007; 28(3):698-701.

117. Ros R, Ampuero I, García de Yébenes J. Parkin polymorphisms in progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci.* 2007; [Epub ahead of print]

118. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi jews. *N Engl J Med* 2004; 351(19): 1972-1977.

119. Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel A, Rosenberg R, Pires RF, Pereira ML, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical properties of beta-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta.* 2005; 362(1-2): 101-9.

120. Michelin K, Wajner A, Goulart Lda S, Fachel AA, Pereira ML, de Mello AS, Souza FT, Pires RF, Giugliani R, Coelho JC. Biochemical study on beta-glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects. *Clin Chim Acta.* 2004; 343(1-2): 145-53.

121. Hruska KS, Goker-Alpan O, Sidransky E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006(3): 78549.

122. Spitz M, Rozenberg R, Silveira PA, Barbosa ER. Parkinsonism in type 1 Gaucher's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(5): 709-10.

123. Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab*. 2004; 82(3):192-207.

124. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, Rosenbaum H, Schiffmann R, Bembi B, Sidransky E. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* 2003; 79(2):104-9.

125. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM*. 1996; 89(9): 691-4.

126. Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, Lamarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Molec Genet Metab* 2004; 81: 70-73.

127. Ziegler SG, Eblan MJ, Gutti U, Hruska KS, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidranski E. Glucocerebrosidase mutations in chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol Genet Metab* 2007; 91(2): 195-200.

128. Eblan MJ, Nguyen J, Ziegler SG, Lwin A, Hanson M, Gallardo M, Weiser R, De Lucca M, Singleton A, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations are also found in subjects with early-onset parkinsonism from Venezuela. *Mov Disord* 2006; 21(2): 282-3.

129. Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y, Ray PN, Farrer LA, St George-Hyslop P, Rogaeva E. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20(3): 367-70.

130. Clark LN, Ross BM, Wang Y, Meija-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69(12): 1270-77.

131. Socal MP, Michelin M, Saraiva-Pereira ML, Bock H, Giugliani R, Rieder CRM, Jardim LB. Biochemical and/or molecularly confirmed GBA mutation carriers among Parkinson patients. Poster presentation. 7th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. Rome, Italy, 27th-28th April 2007.

132. Spitz M, Rozenberg R, Pereira LV, Barbosa ER. Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(1):58-62.

133. Halperin A, Elstein D, Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells Molec Dis* 2006; 36(3) 426-8.

134. Toft M, Pielsticker L, Ross OA, Aasly JO, Farrer MJ. Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology* 2006; 66(3): 415-7.

135. Goker-Alpan O, Giasson BI, Eblan MJ, Nguyen J, Hurtig HI, Lee VM, Trojanowski JQ, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations are an important risk

factor for Lewy body disorders. *Neurology* 2006; 67(5): 908-10.

136. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22 (Suppl 17): S343-50.

137. Norris EH. Pesticide exposure exacerbates alpha-synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model. *Am J Pathol* 2007; 170(2):658-66.

138. Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, DiMonte DA. Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 2003; 23(8): 3095-3099.

139. Xu J, Kao SY, Lee FJS, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Med* 2002; 6(8): 600-606.

140. Feany MB. New genetic insight into Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; 351(19): 1937-1940.

141. Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR, Singleton AB. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 2004; 62(10):1835-8

142. Huynh DP, Nguyen DT, Pulst-Korenberg JB, Brice A, Pulst SM. Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death. *Experimental Neurology* 2007; 203(2): 531-541.

143. Papachroni KK, Ninkina K, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 2007; 101: 749–756.

7 ARTIGOS

7.1 ARTIGO 1

Analysis of autosomal recessive forms of Parkinson's disease - mutations in PARK2, PARK6, PARK7 and PARK8 genes

Socal MP¹, Bock H², Michelin-Tirelli K², Hilbig A³, Saraiva-Pereira ML⁴, Rieder CRM⁵, Bonifati V⁶, Jardim LB^{2,7}.

¹Post-Graduation in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³Morfological Sciences and Neurology Departments, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

⁴Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁶Internal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corresponding author:

Laura Bannach Jardim, M.D., PhD.

Medical Genetics Service

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90.035-903, Porto Alegre, Brazil

e-mail: ljardim@hcpa.ufrgs.br

Keywords:

Parkinson's Disease, genetics, PARK2, PARK6, PARK7, PARK8, parkin gene, early-onset, familial Parkinson's disease, DJ-1, PINK1, LRRK2.

Abstract:

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder and it may begin as early as the second decade of life. Causative and susceptibility genes have only recently been identified, and their presence in our population hasn't been evaluated in a comprehensive protocol. We selected PD patients from south Brazil with characteristics suggestive of autosomal recessive inheritance: patients with early onset of symptoms, parental consanguinity or affected siblings were included after consent. They underwent full neurological examination and were tested for PARK2, PARK6, PARK7 and PARK8 mutations. We found 4 carriers of PARK2 mutations (one homozygous, one a compound heterozygous and two heterozygous for single mutations, one of them probably being a normal variant of the protein), one carrier of a PARK6 homozygous mutation and other carrier of a common PARK8 mutation. The clinical characteristics of the positive cases are described, and comparisons with the remaining cases are made. The frequency of PARK2 mutations in our sample was lower than estimated, what might be explained by the fact that this gene was analyzed only by sequencing and gene dosage studies weren't made, or suggesting that in south Brazil autosomal recessive PD may have different genetic frequencies. The occurrence of mutations in PARK8, an autosomal dominant gene, among this sample of apparently autosomal recessive patients, is explained by its already described low penetrance. While the comparisons between positive and negative cases failed to show any difference between the groups, the PINK1 patient and her brother had some atypical manifestations such as hypoactive reflexes and proximal weakness.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder. It affects 2% of the population over 65 years (1), but it may begin before the age of 45 (early-onset PD) or even before the age of 20 (juvenile-onset PD). Since the identification of the first causative gene for this disease by Ploymeropoulos in 1997 (2), other 12 genes have been identified which determine the occurrence of PD in an autosomal dominant or autosomal recessive manner, as well as some genes that do not determine the occurrence of disease, but are associated with an increased risk for PD when heterozygous mutations are present.

So far, the genes associated with autosomal recessive forms of PD are PARK2, PARK6, PARK7 and PARK9. The PARK8 gene, which determines an autosomal dominant form of the disease, has an incomplete penetrance, thus, mutations in this gene may be present in cases of isolated PD or in apparently autosomal recessive forms of PD.

PARK2 mutations are detected in 15% of early-onset PD patients overall, but they can be as frequent as 90%, among juvenile-onset autosomal recessive patients, or 9%, among isolated PD patients with age of onset between 40 and 45 years. (3).

PINK1 mutations are detected in 1,2% (4) to 4,4% (5) of early-onset patients. Among patients that, besides the early age of onset, have a positive autosomal recessive family history and were negative for PARK2 and PARK7 mutations, the detection of a single or homozygous mutation in PARK6 gene may reach 20% (6). Rarely, mutations in PARK6 may be found among late-onset individuals (0,8% of patients) (4).

PARK7 gene is an uncommon cause of PD, and heterozygous mutations and polymorphisms are the most frequent alterations found in this gene among PD patients, with a frequency of detection of approximately 1,1% each (7).

PARK8 gene, an autosomal dominant cause of PD, is the most commonly identified genetic cause for this form of the disease. However, it has a low penetrance and a variable age of onset, ranging from the fourth to the eighth decade of life. A single mutation, 6055G→A, that causes the aminoacid change G2019S is found in 5-7% of autosomal dominant cases and 1-2% of isolated PD cases. (8). The association between this mutation and a single nucleotide polymorphism has shown a common ancestral origin of the identified families in european countries, north-african and american patients (9,10).

To this moment, there are no clinical features other than age of onset and family history that can predict a genetic cause for DP. Age of onset is inversely correlated to the probability of detecting a mutation in PARK2, PARK6 and PARK7 genes and the presence of parental consanguinity or affected siblings raise the probability of a genetic cause. Nevertheless, there are some clinical manifestations that are more frequent among patients with specific genes-associated PD. For example, PARK2-associated PD is commonly characterized by a slower disease progress and a marked and sustained levodopa response. Dyskinesias are frequent, and pyramidal signs and lower limb dystonia may be present (11).

Patients and Methods

We selected patients from the Movement Disorders Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre who were diagnosed with Parkinson's Disease (PD) according to the clinical criteria proposed by Gelb (12) and had early onset of symptoms (less than 45 years) parental consanguinity or any affected siblings. After consent, clinical and epidemiological data were collected and the patients underwent a thorough

neurological examination including Mini-Mental State Examination (MMSE), Activities of Daily Living (ADL), Hoehn-Yahr (HY) and Unified Parkinson's Disease Rating (UPDRS) scales. Blood samples were collected for DNA extraction and molecular analysis of the main causative genes. PARK2, PARK6 and PARK7 exons were sequenced by methods described elsewhere (4, 13, 14). PARK8 gene was analysed for the common mutation G2019S by TaqMan allelic discrimination assay (15).

Results

Thirty-four index patients were enrolled in the study: 33 had a disease onset earlier than 45 years (range: 17 - 45 years), 3 patients had consanguineous parents and 3 had recurrence among sibs. An affected brother from one of the index-cases was also included. Overall, 19 (37,2%) patients had a positive family history of PD. Patients had mixed ethnic backgrounds, including Portuguese, Spanish, Italian, German, Amerindian and African ancestry. The main clinical characteristics of the sample are listed in table 1.

Three patients were identified to carry PARK2 gene mutations (two homozygous and one compound heterozygous). One patient that had a heterozygous point mutation that did not determine any aminoacid change was not considered as carrier of pathgenic mutation and, therefore, was not included in case descriptions nor in the analyses.

One PINK1 homozygous mutation carrier was detected. The brother of this patient was also studied and is described further. No PARK7 mutatinns were found. One patient was identified t carry a common mutation in the PARK8 gene.

Analysis of clinical variables among the general sample showed a close relation, as expected, between disease duration and time on levodopa and daily levodopa dose (data not shown). For this reason, time and dose of levodopa were only considered as illustrations, in the following analyses.

When severity scores were tested against predictive, clinical variables, only HY and mean ADL both were related either to disease duration and / or time on levodopa (Spearman correlation coefficient after Bonferroni correction, Table 2).

PARK2 -positive patients

The clinical findings of PARK2, as well as the other positive cases, are listed in table 3. Comparison of the clinical variables from PARK2 positive cases with the remaining, negative patients, is shown in table 4.

In order to avoid biases due to disease duration, all severity scores but MMSE were corrected, using the relation “severity score / disease duration”. Even so, no relation was found between these scores and the presence of PARK2 gene mutations.

PARK2-positive patients had a significantly earlier age at onset than the general sample (24 versus 38 years of age at the disease onset) and used lower doses of levodopa. Only one patient had a family history of PD: case 2 has an uncle with early-onset of disease (40 years).

PARK 6-positive patients

The positive PARK6 cases are born from consanguineous parents. They have two other living, unaffected siblings with ages 26 and 28 years, and three siblings that died in infancy, two of them by respiratory problems. This is a very low-income family, with poor access to the health system, what limits further information about the pathologies of the deceased children.

Table 5 compares the clinical findings of the two PARK6 sibs with the remaining 33 patients. In order to avoid biases due to disease duration, all severity scores but MMSE were again corrected, using the relation “severity score / disease duration”. Even so, no relation was found between these scores and the presence of PARK6

mutations. Both sibs had HY scores and HY / disease duration lower than the general sample and an earlier age of onset, as well as a marked and sustained response to low levodopa doses.

PARK8-positive patient

The patient who carried the common mutation G2019S in PARK8 gene had onset of unilateral rest tremor at the age 58. He was born from non-consanguineous parents and two of his 9 siblings also had PD, with ages of onset of 55 and 57 years. The other siblings are younger than the affected ones, with ages between 47 and 60 years. The parents died at an advanced age (88 and 92 years), by clinical causes, and did not show any parkinsonian symptoms through life. This affected patient has no atypical clinical manifestations. He has a good response to levodopa, but he has intense dyskinesias, which started at 5 years of disease course. Except for the presence of PARK8 mutation, this is a typical PD patient.

Discussion

Autosomal recessive forms of PD are turning to be the most frequently demonstrated to have a positive, identifiable genetic cause, specially if other factors as early-onset and consanguinity are present along with a positive family history. In our sample, five out of 35 index-cases (14,7%) were diagnosed with a genetic cause for their PD, including one patient who carries an autosomal dominant gene mutation clinically expressed as autosomal recessive family history probably because of its low penetrance.

The frequency of positive PARK2 mutations (8,8%) was lower than expected. Although it was the most common identified genetic cause in our sample, similarly to what is reported by others, there would be expected a higher mutation frequency, what can be explained by the fact that gene dosage studies were not made. The gene

dosage analysis detects exonic duplications or deletions, and identifies 38% of all mutations in the PARK2 gene (16).

The lack of PARK7 positive cases was expected, once it is a rare cause of PD and we tested a small sample of patients, as well as a low positive diagnostic rate for PINK1 mutations. This is, to our knowledge, the first Brazilian family reported with a PINK1 mutation, and also the first report of neuromuscular findings of muscle wasting, proximal weakness and hypoactive tendon reflexes.

The clinical characteristics of the positive cases reinforced the good response to levodopa already described in PARK2 and PARK6 patients, and also the lower age of onset of this group. The PARK8 phenotype keeps being of typical PD, and should be investigated also among apparent autosomal recessive cases. Low age of onset was not associated with PARK8 mutations in our sample. The sleep benefit, traditionally assumed to be a PARK2-associated PD feature, had a high frequency in our sample (more than 70%) and was present in all but one positive genetic cases.

In conclusion, the main genetic causes of autosomal recessive parkinsonism are present among Brazilian patients and in frequencies similar to those reported by others. While the majority of the patients have findings consistent to the literature, we describe a family with PARK6 mutations and neuromuscular findings not yet reported. Moreover, our data show a lack of association between sleep benefit and the genetic causes of PD and a lower age of onset of PARK2 and PARK6 positive patients, reinforcing the good response to levodopa treatment and the low dosage requirements.

References

1. De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000; 54(11 Suppl 5): S21-3.

2. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274(5290):1197-9.

3. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126(Pt 6): 1271-8.

4. Rogaeva E, Johnson J, Lang AE, Gulick C, Gwinn-Hardy K, Kawarai T, Sato C, Morgan A, Werner J, Nussbaum R, Petit A, Okun MS, McInerney A, Mandel R, Groen JL, Fernandez HH, Postuma R, Foote KD, Salehi-Rad S, Liang Y, Reimsnider S, Tandon A, Hardy J, St George-Hyslop P, Singleton AB. Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004; 61(12):1898-904.

5. Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA; Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005; 65(1):87-95.

6. Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Ataç FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology*. 2004; 63(8):1482-5.
7. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*. 2004; 2(11):e362.
8. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365 (9457): 415-16.
9. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005; 76(4): 672-80.
10. Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ, Rohé CF, Zini M, Canesi M, Tesei S, Zecchinelli A, Antonini A, Mariani C, Meucci N, Sacilotto G, Sironi F, Salani G, Ferreira J, Chien HF, Fabrizio E, Vanacore N, Dalla Libera A, Stocchi F, Diroma C, Lamberti P, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Bertoli-Avella AM, Breedveld GJ, Oostra BA, Pezzoli G, Bonifati V. 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(11): e65.

11. Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Rev* 2004; 46: 44-70.
12. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1): 33-9.
13. Bertoli-Avella AM, Giroud-Benitez JL, Akyol A, Barbosa E, Schaap O, van der Linde HC, Martignoni E, Lopiano L, Lamberti P, Fincati E, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Squitieri F, Marini P, Abbruzzese G, Fabbrini G, Marconi R, Dalla Libera A, Trianni G, Guidi M, De Gaetano A, Boff Maegawa G, De Leo A, Gallai V, de Rosa G, Vanacore N, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; 20(4): 424-31.
14. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003; 299(5604): 256-9.
15. Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365(9457): 412-5.

16. Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 2002; 58(8): 1239-46

Table 1 – Clinical and demographical characteristics of the sample

Families (patients)	34 (35)
Male / female	24 / 11
School years (mean±sd)	9,25 ± 4,7
Age of onset (years) (mean ±sd)	37,44 ± 7,2
Disease duration (years) (mean±sd)	8,73 ± 6,1
First symptom	46,4% tremor 50% rigidity/bradykinesia
Asymmetric onset (%)	100
Time of levodopa use (months) (mean±sd)	54,67 ± 48,71
Daily levodopa dose (mg) (mean±sd)	559,05 ± 443,6
Motor fluctuations (%)	60
Dyskinesia (%)	51,7
Pretreatment dystonia (%)	6,9
Morning dystonia (%)	10,7
Off-period dystonia (%)	17,9
Sleep benefit (%)	71,4
Mini-mental (mean±sd)	27,3 ± 3
HY (median)	2,5
UPDRS (mean±sd)	30,6 ± 19
ADL (mean±sd)	70,65 ± 16,9

Table 2 – Relation between severity scores and some clinical variables

	MMSE	UPDRS	HY	Mean ADL
Disease duration	ns	ns	r = 0.522 p = 0.023	r = - 0.492 p = 0.026
Time on levodopa	ns	ns	r = 0.546 p = 0.023	r = - 0.668 p < 0.0001
Age at onset	ns	ns	ns	ns

Table 3 – Clinical and demographical characteristics of positive patients

Case number	PARK2			PARK6		PARK8
	1	2	3	4	5	6
Mutations	Exon 6-7 Deletion Hom	Exon 2 155DelA Het Exon 11 C120THet	Exon 6 G727Het	710delT Hom	710delT Hom	6055G→A Het (G2019S)
Sex	Male	Male	Male	Female	Male	Male
Age of onset (y)	17	27	28	25	27	58
Disease duration (y)	22	5	10	8	10	8
First symptom	Tremor	Rigidity	Bradykinesia	Tremor	Bradykinesia	Tremor
Asymmetric onset	+	+	+	+	+	+
Tendon reflexes	Hyperactive	Hyperactive	Normal	Hypoactive	Hypoactive	Normal
Postural instability	-	-	-	-	-	-
Dysautonomia	-	+	-	-	-	-
Cognitive loss	-	-	-	-	-	-
Amyotrophy	-	-	-	+	-	-
Proximal weakness	-	-	-	+	+	-
Daily Idopa intakes	2	2	2	2	3	12
Daily levodopa dose/ disease duration	4,5	Not applicable	40	31,25	42,5	187,5
Levodopa response	++	++	++	++	++	++
Motor fluctuations	+	-	+	+	-	+
Dyskinesia	+	-	+	+	+	+
Pretreatment dystonia	+	-	-	-	-	-
Morning dystonia	-	-	-	-	-	+
Off- dystonia	-	-	-	-	-	+
Sleep benefit	+	+	+	+	-	+
HY	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0	2,5
motor UPDRS	16	20	36	25	17	48
ADL on / off (%)	100 / 80	90 / 80	70 / 50	100 / 80	100 / 90	80 / 60

Table 4 – Clinical characteristics of PARK2 positive patients

	PARK2	N	Mean	Std. Deviation	p
Age of onset	1	3	24,00	6,083	0,003
	0	31	38,74	10,285	
Levodopa dose	1	3	166,67	208,166	0,013
	0	26	755,769	860,27	
MMSE	1	3	27,00	5,196	ns
	0	16	27,38	3,102	
HY/ Disease duration *	1	3	,2933	,18877	ns
	0	24	,4190	,32328	
UPDRS/ Disease duration*	1	3	3,66000	2,626557	ns
	0	24	6,17667	7,752683	
100-ADL/disease duration *	1	3	2,7033	1,46766	ns
	0	24	4,7087	5,03257	

* see text

Table 5 – Clinical characteristics of PARK6 patients

	Park-6	N	Mean	Std. Deviation	P
Age of onset	1	2	26,00	1,414	0.0001
	0	32	38,16	6,873	
Levodopa dose	1	2	287,5	53,03	0,016
	0	27	725,0	858,5	
MMSE	1	0	,	,	ns
	0	19	27,32	3,001	
HY				2	0.0001
				2.48	
HY/T*	1	2	,2250	,03536	0.01
	0	25	,4194	,32110	
UPDRS/T*	1	2	2,41250	1,007627	ns
	0	25	6,17580	8,698269	
InvADL/T *	1	1	1,2500	,	ns
	0	26	4,6104	4,22353,	

* see text

7.2 ARTIGO 2

Analysis of CAG expansions in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 and SCA7 genes among patients with autosomal dominant Parkinson's disease

Socal MP¹, Emmel VE², Rieder CRM^{1,3}, Hilbig A⁴, Saraiva-Pereira ML⁵, Jardim LB^{1,2,6}.

¹Post-Graduation in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁴Morphological Sciences and Neurology Departments, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

⁵Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁶Internal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Keywords:

Parkinson's Disease, autosomal dominant, familial, genetics, SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, spinocerebellar ataxia.

Abstract:

The parkinsonian phenotype of the spinocerebellar ataxias (SCAs), although having been described for long, wasn't a matter of much attention until the first cases of molecularly proved diagnoses were reported and studies involving patients clinically diagnosed as having Parkinson's disease (PD) showed SCA gene expansions underlying the clinical picture. Since then, many studies have shown the importance of testing for these mutations, but the low frequency of detection in isolated, late-onset PD cases has discouraged physicians to routinely perform this investigation. The aim of our study was to investigate a selected, high-risk group of PD patients for SCA gene expansions, in order to increase the frequency of positive diagnoses and to provide better counselling and treatment of positive cases. Patients with autosomal-dominant PD or with atypical manifestations suggestive of ataxia were enrolled for investigation. They underwent a full neurological examination and had blood samples collected for DNA extraction and molecular analysis after informed consent. From a total of 23 index-cases included, two patients were shown to carry a SCA3 expansion and 1 patient a SCA2 expansion. Although their main phenotype was composed of parkinsonian features, their affected relatives had different phenotypes, and one of the patients had progressed from a typical PD to a clearly ataxic phenotype.

The allele size of the SCA2-identified patients was concordant with recent data that suggest an association of the parkinsonian phenotype with a low repeat number of expansions and, specially, with the presence of truncating CAA repeats, which were

present in all sibs of our index-case. On the other hand, the number of expansions in SCA3 patients did not correlate with the parkinsonian phenotype, suggesting that other disease-modifying agents may play a role in determining the main presenting symptoms.

Introduction

Mendelian mutations in some genes have been implicated in the causation of Parkinson's disease (PD). In 1983, Rosenberg described a PD- and sensory loss phenotype of spinocerebellar ataxia (SCA) type 3 (SCA3), classifying it as type IV phenotype of this ataxia. Only in 1995 it was possible to confirm molecularly the SCA3 diagnosis in two parkinsonian patients (1).

After that, CAG expansions within other SCA genes such as SCA2 (2,3), SCA6, SCA7, SCA8 and SCA 17 (4,5,6) have been shown to underlie cases clinically considered as typical, levodopa-responsive PD. However, according to the pathological findings in the extrapyramidal system, including basal ganglia and *substantia nigra* that are present in SCAs, that is, dopamine depletion (7) and cell loss, there would be expected much more parkinsonian features in these patients (8).

Several studies analyzed the frequency of SCA gene mutations among PD patients, detecting positive SCA expansions in 0.35 (9) to 1,47% (10) of cases. This low rates may discourage clinicians to look for these etiologies, but they are probably explained by the inclusion of large, unselected series of patients in most of the studies. When testing only patients with familial, autosomal dominant PD, the positive diagnostic rate increases up to 10% (11).

The aim of the present study was to screen SCA expansions among selected, high-risk PD patients, in order to increase the rate of diagnostic success, helping to

identify positive families and to offer genetic counseling for mendelian forms of parkinsonism.

Patients and Methods

We recruited patients from the Movement Disorders unit who were diagnosed with PD according to the clinical criteria proposed by Gelb (12). Patients were included if they had a positive autosomal dominant family history or if they had atypical clinical findings suggestive of cerebellar ataxia: pyramidal signs, early or disproportionately severe dysarthria and/or dysphagia, ataxic gait, early or disproportionately severe stance impairment, eyelid retraction, limb ataxia, sensory loss, amyotrophy, nystagmus and impaired ocular movement. The study was approved by the local and national ethics committees, and all the patients gave their informed consent. The full neurological examination was conducted by a single neurologist (MS) and included the Hoehn and Yahr modified scale (HY), the motor part of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), the Mini-mental State Examination (MMSE) and Schwab and England's Activities of Daily Living (ADL) scale.

Peripheral blood was collected and genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes, using the salting-out technique as described previously (13). The fluorescence-based assay (Quant-iT - Invitrogen) was used for quantitation of DNA samples. SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 and SCA7 screening were performed by PCR amplification using fluorescent primers (14). Following multiplex PCR amplification, an aliquot of PCR products were mixed with formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems) and GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems) and electrophoresis was performed in an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Amplicon lengths were calculated by comparing with GeneScan500-ROX molecular weight by the Genescan 3.7 software (Applied Biosystems). The repeat lengths examined by PCR amplification and fragment analysis were also sequenced.

Results

Twenty-seven patients from 23 families were included (16 men). Their main clinical characteristics are listed in table 1. Among the 23 index cases, 13 had an autosomal dominant family history of PD and 16 had atypical clinical manifestations (6 patients had both). The patients with and those without atypical manifestations had similar ages, ages at onset, disease duration, time on l-Dopa, MMSE, UDPRS and ADL scores, except the mean HY score, that was lower in the 7 cases free of atypical manifestations (1.75 ± 0.5 versus 2.96 ± 1 , $p = 0.011$). Interestingly, in this sample, none of the predictive variables (age, age at onset, disease duration and time on l-dopa) showed association with PD severity scores (UDPRS, HY, ADL) or MMSE.

Three out of 23 index-cases were diagnosed as positive for a SCA gene expansion. Two index cases carried CAG expansions at SCA3 gene, and the other one carried a CAG expansion at SCA2 gene. We then included other 3 affected siblings from SCA2 case and one affected relative from each SCA3 index case.

The SCA2 pedigree

This family, consisting of 4 affected sibs, detected through index-case III.2 (Figure 1), has its molecular details described elsewhere (14). The clinical findings of these patients are summarized in table 2. All of them had a PD phenotype at onset, but now patient III.3 has also ataxic symptoms. All the expanded sequences were interrupted with one CAA repeat and all the normal alleles were unexpectedly large, with 33 repeats, and showed two CAA interruptions. Patients III.1, III.2 and III.3 had the sequence of expanded CAG repeats $(CAG)_{24}(CAA)_1(CAG)_9$ and the normal alleles $(CAG)_{23}(CAA)_1(CAG)_3(CAA)_1(CAG)_5$. The patient III.4 had the expanded sequence

(CAG)₃₃(CAA)₁(CAG)₉ and the normal allele sequence (CAG)₂₃(CAA)₁(CAG)₃(CAA)₁(CAG)₅.

Table 3 compares some of the clinical findings of the four SCA2 sibs with the remaining 23 patients. Although SCA2 patients were sick for a longer time than the others (9.75 versus 7.59 years, ns), they used significantly lower doses of L-dopa than the remaining group (312 versus 624 mg, $p = 0.033$). Other characteristics such as the presence of atypical manifestations, L-dopa-induced motor fluctuations and dyskinesia were similar to those found in the general sample.

The SCA3 patients

Two SCA3 pedigrees were detected. The first family (SCA3 “C” family) was detected through patient III.3 (Figure 2a). This patient started with parkinsonian manifestations at the age of 39. After 10 years, his PD was well controlled by L-dopa treatment, but he manifested ataxic symptoms, which increased progressively and, at this time, are the patient’s main disabling symptoms. Patient III.4 has a purely parkinsonian phenotype, that began at the age of 38 and, after 5 years of disease onset, are still the sole manifestation of the disease.

The second family (SCA3 “O” family) was discovered through case IV.1 (Figure 2b). This patient began, at the age 35, with dysequilibrium and tremor. He showed limb rigidity and bradykinesia, and there was a significant improvement after the onset of levodopa treatment. His family history consisted of an autosomal dominant ataxia trait: his mother (III.1), grandmother (II.1) and grand-grandfather (I.1) all presented with ataxia. Table 4 summarizes the clinical and molecular findings of both pedigrees and table 5 compares some of the clinical findings of the three SCA3 patients with the remaining 24 patients. SCA3 patients had earlier ages at onset: their parkinsonian manifestations started at 35, 38 and 39 years of age, whereas the mean age of onset of the remaining patients was of 46.7 ± 12 years ($p = 0.003$).

All SCA3 patients had sleep benefit in their parkinsonian manifestations, whereas 14 of 20 other PD, non SCA3 patients reported no sleep benefits, and this difference was significant ($p= 0.047$, exact Fisher test). SCA3 patients had more disturbances of ocular motricity (present in all three patients) and ataxic manifestations (present in 2/3 patients) ($p=0.003$ and 0.049 , respectively; Fisher exact test) than the other 24 patients under study. The other clinical characteristics of SCA3 patients were similar to those found in the general sample.

Discussion

In our population, the prevalence of SCA3 is 1,8/100.000 and of the remaining SCAs is 0,2/100.000 (15). SCA3 accounts for 84% of mollecularly confirmed ataxia cases (16); it is also the most frequent of the ataxias worldwide and, along with SCA2, composes the most frequently SCAs associated to PD phenotype. Thus, the finding of SCA3 and SCA2 mutations among our series of patients is in accordance to the expected.

The frequency rate of positive diagnoses in our sample was high (13%) and similar to the diagnostic rates found in studies in selected PD samples (11). There were main clinical findings associated with the positive diagnoses: symmetric onset, early postural instability and abnormalities of eye movements.

The SCA2 family showed phenotypical homogeneity, and, as already demonstrated by others, reinforces the association between the parkinsonian phenotype and short repeat numbers, specially in the presence of CAA interruptions. One of our SCA2 patients has a larger allele (44 repeats), although until now he hasn't shown any shifts in the phenotype, except for mild cognitive loss (mini-mental state examination= 25; patient has 16 school years).

In both SCA3 families there is heterogeneity of phenotypes. In SCA3 "C" family, the affected individual with longer disease duration added to his initial parkinsonian symptoms (which are well controlled by levodopa) a typical SCA phenotype that is

actually his main disabling determinant. The brother of this patient, although having a shorter disease duration, is a pure PD patient. In SCA3 “O” family, the heterogeneity was rather striking, since the pure PD index-case was born from a pure SCA mother.

Our results suggest that, regarding SCA2, the parkinsonian phenotype is determined by intragenic characteristics, reinforcing the importance of CAA interruptions rather than the smaller number of repeats, once one of our patients has CAG₄₄. On the other hand, parkinsonian phenotype of SCA3 may be related to other unknown modifying factors, because in the same families, strict parkinsonian and strict ataxic phenotypes do coexist.

In conclusion, a screening for SCA expansions in a high risk sample of PD seems to be a better approach to identify positive cases than open testing in unselected populations. Autosomal dominant family history and the presence of atypical manifestations are factors associated to increased diagnostic rate of SCA mutations.

References

1. Tuite PJ, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Lang AE. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol*. 1995; 38(4):684-7.
2. Furtado S, Farrer M, Tsuboi Y, Klimek ML, De la Fuente-Fernández R, Hussey J, Lockhart P, Calne DB, Suchowersky O, Stoessl J, Wszolek ZK. SCA-2 presenting as parkinsonism in an Alberta family. Clinical, genetic, and PET findings. *Neurology* 2002;59:1625–1627

3. Modoni A, Contarino MF, Bentivoglio AR, Tabolacci E, Santoro M, Calcagni ML, Tonali PA, Neri G, Silvestri G. Prevalence of spinocerebellar ataxia type 2 mutation among Italian Parkinsonian patients. *Mov Disord*. 2007; 22(3): 324-7.
4. Lee WY, Jin DK, Oh MR, Lee JE, Song SM, Lee EA, Kim GM, Chung JS, Lee KH. Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Korean patients. *Arch Neurol* 2003; 60(6):858-63.
5. Schöls L, Kruger R, Amoiridis G, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(1): 67-73.
6. Wu YR, Lin HY, Chen CM, Gwinn-Hardy K, Ro LS, Wang YC, Li SH, Hwang JC, Fang K, Hsieh-Li HM, Li ML, Tung LC, Su MT, Lu KT, Lee-Chen GJ. Genetic testing in spinocerebellar ataxia in Taiwan: expansions of trinucleotide repeats in SCA8 and SCA17 are associated with typical Parkinson's disease. *Clin Genet*. 2004; 65(3):209-14.
7. Kish SJ, Guttman M, Robitaille Y, El-Awar M, Chang LJ, Levey AI. Striatal dopamine nerve terminal markers but not nigral cellularity are reduced in spinocerebellar ataxia type 1. *Neurology* 1997; 48(4):1109-1111
8. Schöls L, Kruger R, Amoiridis G, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(1): 67-73.
9. Simon-Sanchez J, Hanson M, Singleton A, Hernandez D, McInerney A, Nussbaum R, Werner J, Gallardo M, Weiser R, Gwinn-Hardy K, Singleton AB, Clarimon J.

Analysis of SCA-2 and SCA-3 repeats in Parkinsonism: evidence of SCA-2 expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005; 382(1-2):191-4.

10. Payami H, Nutt J, Gancher S, Bird T, McNeal MG, Seltzer WK, Hussey J, Lockhart P, Gwinn-Hardy K, Singleton AB, Hardy J, Farrer M. SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord* 2002; 18(4): 425-9.

11. Lu CS, Wu Chou YH, Kuo PC, Chang HC, Weng YH. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol* 2004; 61(1):35-8.

12. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1): 33-9.

13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

14. Emmel V, Socal MP, Trott A, Wanderley H, Rieder CRM, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML. A large normal allele found at SCA2 family presenting with parkinsonism. Article in press.

15. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Moreira MC, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R. A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *J Neurol* 2001; 248: 870-6.

16. Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, Saute JA, Artigalás O, Kieling C, Wanderley HY, Rieder CR, Monte TL, Socal M, Alonso I, Ferro A, Carvalho T, do Céu Moreira M,

Mendonça P, Ferreirinha F, Silveira I, Sequeiros J, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. Clin Genet 2006; 70(2):173-6.

Table 1 – Clinical characteristics of the study sample

Families (total patients)	23 (27)
Male/female	16/ 11
Age (years)*	51,55 ± 15,4
Age at onset (years)*	45,62 ± 12
Disease duration (years)*	7,92 ± 6,3
Time on l-dopa (months) *	65,21 ± 80,9
Daily l-dopa dose (in mg) *	572,50 ± 409,690
MMSE *	27,64 ± 3,828
HY *	2,73 ± 1
UPDRS *	29,61 ± 17,624
Mean ADL *	65,50 ± 24,597

* mean ± sd

Table 2 - Clinical characteristics of SCA2 pacientes

	III.1	III.2	III.4	III.7
Sex	Male	Female	Female	Male
Age of onset (years)	41	46	35	40
Disease duration (years)	16	7	10	1
First symptom	Tremor	Rigidity	Rigidity	Postural Imbalance
Asymetric onset	+	-	-	-
Tremor	+	-	++	+
Rigidity	+	++	+	+
Bradykinesia	+	+	+	-
Use of Antiparkinsonian Medication	+	+	+	+
Levodopa Response	+	++	++	+
Dyskinesias	-	-	+++	-
Motor Flutuations	-	-	+	-
Gait ataxia	++	-	+	+
Limb ataxia	+	+	++	-
Postural Instability	+	+++	+	-
Piramidal Signs	+	+	+	+
Nystagmus	+	-	-	-
Disarthria	+	-	-	Stammering
Disphagia	+	-	-	-
Cognitive loss	-	-	-	+
Sensory loss	-	-	-	-

Table 3 – Comparison of SCA2 patients and general sample

		N	Mean	Standard deviation	P
Age of onset (years)	1	4	42,00	2,828	Ns
	0	22	46,27	12,973	
Disease Duration (years)	1	4	9,75	7,676	Ns
	0	22	7,59	6,170	
Time on l-dopa (months)	1	4	102,50	105,570	Ns
	0	20	57,75	76,234	
Daily l-dopa dose (mg)	1	4	312,50	175,000	0.033
	0	20	624,50	425,756	
MMSE	1	3	28,33	2,887	Ns
	0	8	27,38	4,274	
HY	1	4	2,75	,289	Ns
	0	16	2,72	1,140	
UPDRS	1	4	15,25	13,745	Ns
	0	14	33,71	16,763	
ADL	1	1	100,00	.	Ns
	0	15	69,00	22,136	

Table 4 - Clinical description of SCA 3 patients

	SCA 3 “C” pedigree		SCA3 “O” pedigree	
	Case III.3	Case III.4	Case IV.1	Case III.1
Sex	Male	Male	Male	Female
Age of onset (Years)	39	38	35	50
Disease duration (years)	49	43	5	12
First symptom	Dysesthesia in lower extremities	Pain in lower extremities, tremor	Postural instability	Postural instability
Asymmetric onset	-	-	-	-
Tremor	+	+	+	-
Rigidity	+	+	+	-
Gait ataxia	++	-	+	+
Limb ataxia	+	-	+	+
Pyramidal signs	+	-	+	+
Abnormal eye movements	++	+	+	+
Eyelid retraction	-	-	-	-
Disarthria	+	+	Mild	-
Dysphagia	-	+	-	-
Cognitive loss	-	-	-	-
Sensory loss	+	+	-	-
Postural instability	++	++	++	+
Response to levodopa	++	++	++	Not applicable
Dyskinesias	-	-	+	Not applicable
Motor fluctuations	-	-	+	Not applicable

Table 5 – Comparison of SCA3 patients and general sample

		N	Mean	Std. Deviation	p
Age of onset (years)	1	3	37,33	2,082	0.003
	0	23	46,70	12,393	
Disease duration (years)	1	3	6,67	2,887	ns
	0	23	8,09	6,640	
Time on l-dopa (months)	1	3	44,00	13,856	ns
	0	21	68,24	86,199	
Daily l-dopa dose (mg)	1	3	725,00	90,139	ns
	0	21	550,71	433,847	
MMSE	1	3	30,00	,000	ns
	0	8	26,75	4,200	
HY	1	3	2,83	1,041	ns
	0	17	2,71	1,047	
UPDRS	1	3	34,67	18,903	
	0	15	28,60	17,876	
ADL	1	2	80,00	7,071	
	0	14	69,64	24,056	

Figure 1 – The SCA2 pedigree

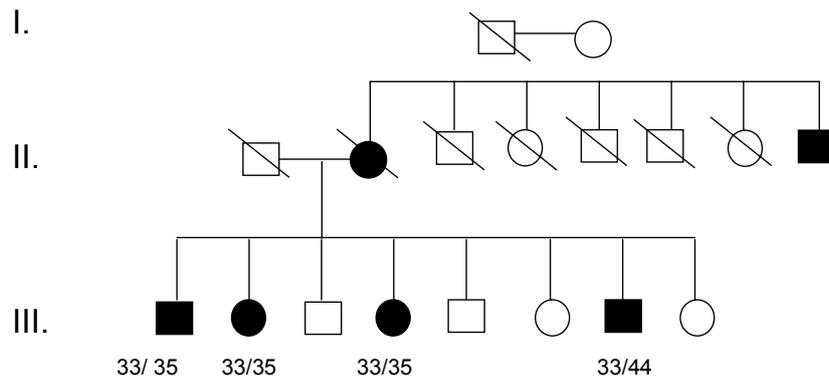
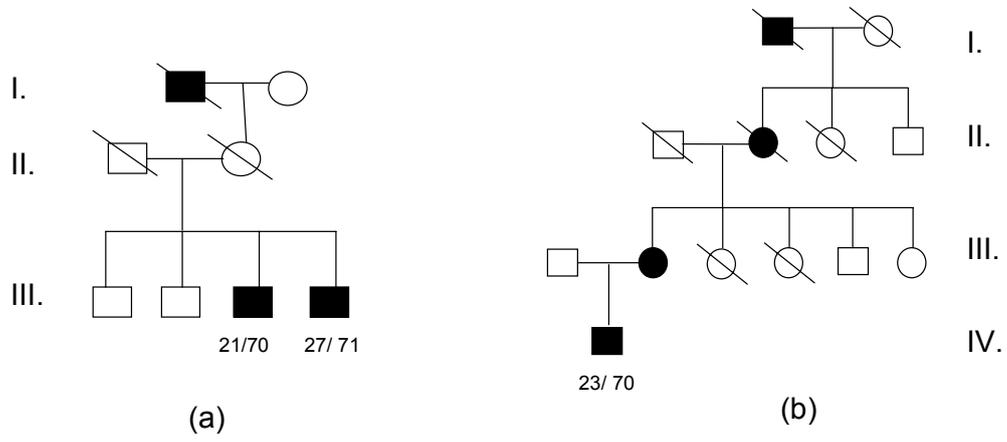


Figure 2 - The SCA3 pedigrees



7.3 ARTIGO 3

Letter to the Editor

Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians

We have read with interest the publication by Spitz and colleagues [1] regarding their results on the association study of glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease (PD) among Brazilian patients. Before them, several publications confirmed the association between PD and the heterozygote state for glucocerebrosidase (GBA) mutations these results in PD patients from Israel, USA , Canada, Norway, Venezuela, Taiwan (for a revision, see references [1] and [2]), and now São Paulo, Brazil. Table I summarizes these results.

We also investigated the association between PD and GBA mutations in Brazilians, recruiting patients with PD in Porto Alegre, Brazil. PD was diagnosed according to the clinical criteria proposed by Gelb [3]. Patients participated in the study, which was approved by the local and national ethics committees, after giving their informed consent. All cases were examined by a single neurologist (MS), who performed a full neurological examination and applied the Hoehn and Yahr modified scale (HY) as well as the Unified PD rating scale (UPDRS). Patients recruited were unrelated. All patients had their GBA activity measured in their peripheral leukocytes using the standard 4-methylumbelliferyl- β -D-glycopyranoside assay. Activities below 10 nmol/h/mg were considered to be associated with an increased risk for the carrier state if they were confirmed in a second blood specimen. Common GBA mutations L444P, N370S, and

IVS2+1 were analysed by PCR-RFLP using NciI, XhoI and HphI, respectively, and 84GG was analysed by ARMS-PCR.

The clinical data of 62 (37 male) recruited patients are shown in Table II. Mean \pm sd age at examination was 50.14 ± 10 years; mean \pm sd age at onset was 41.4 ± 10 years. Patients were of Brazilian origin with mixed ethnic backgrounds, including Portuguese, Spanish, Italian, German, Amerindian and African ancestry. There were two (3.5%) heterozygotes for GD as follows: one carrying the N370S mutation and the other carrying the L444P mutation. Five patients, that is, the L444P carrier plus four additional patients without common mutations, presented a leukocyte GBA activity below 10 nmol/h/mg of protein.

The two GBA heterozygotes seemed to have an earlier age at onset than the other PD patients (37 ± 4 versus 41.4 ± 10.8 yr.), although the difference was not significant. However, these differences almost reached significance when ages at onset of PD were compared between patients with normal (41.4 ± 10 yr.) levels of GBA activity to patients with low (37.5 ± 2 yr., $p=0.0052$) levels of GBA activity, as shown in Table II. Other disease characteristics, namely, MMSE, HY, UDPRS, ADL-on and ADL-off scores, as well as consanguinity, recurrence in the family, years of schooling, and patterns of daily levodopa intake, showed no differences between groups.

Our results were quite comparable to what has been previously found and confirm the rate of 3% of the heterozygote state among PD in Brazilians. Although the attributable risk was not too high, it was repeatedly found in several ethnic backgrounds, with one exception, i.e., the Norwegian study. In other words, being a PD patient was related to a 3 to 9 times increased risk of being a GBA mutation carrier (Table I). We also observed that PD patients with either GBA mutations or low GBA activity had an earlier

onset of symptoms; this finding has been described as early as the first reports on this association and has been recently reinforced by Clark (revised in [2]).

All these recent observations suggest a connection between Gaucher disease and/or the GBA heterozygote state and the synucleinopathies. Not only the screening of patients with parkinsonism has identified a greater than expected frequency of GBA mutations, but also in Gaucher probands and their relatives an increased incidence of synucleinopathies has been noted. Moreover, in four individuals with Gaucher disease and parkinsonism, Lewy bodies were observed in the substantia nigra (SN), as well as SN neural depletion, SN gliosis, and involvement of hippocampal CA2-4 layers [4]. Several hypotheses have been raised to explain these findings. Mutations in GBA might cause lysosomal dysfunction or interfere with receptor binding of alpha-synuclein at the lysosomal membrane, resulting in reduced alpha-synuclein degradation and cell toxicity. Or perhaps GBA mutations that result in misfolded protein might overwhelm the ubiquitin-proteasome ability to degrade other abnormally accumulated proteins, including alpha-synuclein. A third mechanism proposed was that abnormal lipids, present in neurons with low GBA activities, would promote alpha-synuclein aggregation and toxicity through the formation of protofibrils (for a review see [5]). In any case, the underlying mechanism does not depend on the GBA substrate storage in neurons; it would neither be necessary nor sufficient for the appearance of PD, since the majority of Gaucher disease patients do not develop parkinsonian features. However, we are certain that studying the pathophysiology underlying this association will help understand both Parkinson's and Gaucher's disease, perhaps resulting in a better management of these conditions.

References

1. Spitz M, Rozenberg R, da Veiga-Pereira L, Barbosa ER. Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Relat Disord* 2007 Aug 17 [Epub ahead of print]
2. Ziegler SG, Eblan MJ, Gutti U, Hruska KS, Stubblefield BK, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol Genet Metab* 2007; 91: 195-200.
3. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56(1): 33-9.
4. Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrisson A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schifmann R. Neuropathology gives clue to the patophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2004; 82: 192-207.
5. Hruska KS, Goker-Alpan O, Sidranski E. Gaucher disease and the synucleinopathies. *J Biomed Biotechnol* 2006; 2006(3): 78549.

Mariana P. Socal¹, Hugo Bock⁴, Kristiane Michelin-Tirelli⁴, Arlete Hilbig⁴, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1, 2, 5}, Carlos R. M. Rieder^{1, 6}, and Laura B. Jardim^{1, 3, 5}

¹Postgraduation in Medicine: Medical Sciences, ²Biochemistry and ³Internal Medicine Departments, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ⁴Neurological Sciences and Neurology Departments, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ⁵Medical Genetics and ⁶Neurology Services, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Table 1 – Frequency of GBA mutations among PD patients

Author	Subjects	Population	Frequency of GBA heterozygotes in normal population	Frequency of GBA heterozygotes among PD patients	OR
Lwin et al, 2004 ²	57 autopsies from patients with PD	Mixed	0.006 to 0.03	0.14	4.7
Aharon-Peretz et al, 2005 ^{1,2}	99 PD patients, 74 Alzheimer patients and 1543 control subjects	Ashkenazi (Israel)	0.03	0.27	9
Zimran et al, 2005 ^{1,2}	310 PD patients	Ashkenazi (Israel and US)	0.03	0.10	3
Sato et al, 2005 ^{1,2§}	88 PD patients and 122 control subjects	Canadian	0.008	0.056	7
Eblan et al, 2005 ^{1,2}	33 PD patients and 31 control subjects	Venezuelan	0.03	0.12	4
Ziegler et al, 2007 ²	92 PD patients and 92 control subjects	Chinese (Taiwan)	0.01	0.04	3
Toft et al, 2006 ^{1,2}	311 PD patients and 92 control subjects	Norwegian	0.017	0.023	1.3
Clark et al, 2007 ^{2§}	278 PD patients and 179 control subjects	American	0.045	0.137	3
Socal et al, personal comm.	62 PD patients	Brazilian	? 0.006	0.03	5

Table 2 – Clinical characteristics of PD patients under study

	Confirmed or suspected heterozygosity for GBA locus			Nonheterozygous (normal results)	p
	Common mutation identified	Low GBA activity	All		
Number (male)	2	5	6 (4)	53 (30)	
Atypical manifestations *			3 (one patient)	17 (9 patients)	ns
Ancestry *					ns
GBA activity: mean±SD **	8.8		7.68 ± 1.17	14.96 ± 4.06	0.0001
Age mean±SD **			42.5 ± 3.5	50.14 ± 10	0.002
Age at onset: mean±SD **	34 and 40		37.5 ± 2.7	41.4 ± 10	0.052
L-dopa/day (mg) mean±SD **			547 ± 338	588 ± 363	ns
Hoehn and Yahr: median ***			2	2.5	ns
ADL on mean±SD ***			95 %	80 %	ns
Mini-mental state mean±SD **			28.7 ± 1.8	26.7 ± 3.5	ns
UDPRS mean±SD ***			21 ± 4.8	33.7 ± 21	ns

* chi-square test

** t test

*** Mann –Whitney or KW test

8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo permitiu o reconhecimento, em nosso meio, de fatores genéticos causais e predisponentes entre os pacientes portadores de doença de Parkinson. No total, foram estudados 62 casos-índice; 13% dos casos foram positivos para mutações em um dos genes principais e 3% foram positivos para o estado de heterozigose para o gene de suscetibilidade GBA.

Entre os grupos selecionados para investigação, o grupo autossômico recessivo apresentou maior taxa de detecção de causas genéticas para DP: 14,7% dos casos-índice deste grupo foram positivos. O gene PARK2 foi o mais freqüentemente acometido, o que concorda com dados da literatura. Entretanto, segundo Periquet (91), a proporção geral esperada de casos com mutações no gene PARK2 entre pacientes com DP com idade de início até os 45 anos seria de 15%, enquanto na nossa casuística foi pouco menor de 10%. Dois fatores podem explicar este fato: o tamanho reduzido da amostra de pacientes e a não realização do método de dosagem gênica, que em alguns estudos provou aumentar a taxa de detecção de mutações (deleções e duplicações exônicas) em quase 40% (95).

No grupo autossômico recessivo, chamou atenção a detecção de um caso positivo para mutação no gene PARK8. Este gene condiciona DP de herança autossômica dominante, mas como possui penetrância incompleta, está descrito como presente tanto em casos isolados como naqueles com padrão de herança aparentemente autossômico recessivo. O paciente positivo para mutação no gene PARK8 apresentava a mutação G2019S, a mais comumente encontrada na literatura,

e também apresentava um polimorfismo de nucleotídeo único compatível com o haplótipo encontrado nos pacientes portadores de mutação de origem européia e norte-africana.

Entre os pacientes do grupo de investigação autossômico dominante foi possível confirmar a presença de ataxias espinocerebelares com fenótipo parkinsoniano em nosso meio, entre casos que buscaram atendimento na Unidade de Distúrbios do Movimento e foram inicialmente diagnosticados como portadores de DP. Demonstramos que uma seleção criteriosa de pacientes para esta investigação aumenta as taxas de positividade, como se pode perceber ao compará-las com as encontradas na investigação de séries grandes e não-selecionadas de casos. Encontramos, na nossa amostra, positividade apenas para SCA2 e SCA3, que são as mais freqüentemente descritas em associação ao fenótipo parkinsoniano, e nossos achados corroboraram o conceito de que o fenótipo parkinsoniano, nas famílias SCA2, é condicionado por alterações intragênicas (baixo número de expansões e a presença de interrupções CAA dentro da seqüência expandida), enquanto, na SCA3, parece depender de outros fatores modificadores.

Ainda, o estudo permitiu reconhecer a ocorrência de heterozigose para o gene de suscetibilidade GBA, confirmando um achado recente, entre pacientes brasileiros, de uma freqüência de 3% para este estado entre pacientes com DP no nosso país.

A permanência de diversos pacientes sem diagnóstico genético identificado, entre eles inclusive, casos com alto grau de suspeição (pacientes que apresentavam idade de início precoce e consangüinidade paterna, ou casos com história familiar autossômica dominante e com manifestações atípicas), demonstra que é muito provável a existência de outros genes causadores de doença não identificados até o

momento e indica a necessidade de mais estudos em busca de outros fatores genéticos que determinem ou aumentem o risco para esta doença.

Nos casos positivos, embora não seja possível oferecer alternativas terapêuticas diferentes dos demais pacientes não-portadores de causas genéticas, é possível oferecer o aconselhamento genético para as formas mendelianas da doença e é possível adaptar o tratamento medicamentoso de acordo com as características de resposta terapêutica associadas às mutações – por exemplo, a lenta evolução e a grande ocorrência de discinesias nos pacientes com mutação do gene PARK2, a excelente resposta à levodopa nos pacientes com mutação do gene PARK6, entre outros.

9 ANEXOS

9.1 Estadiamento modificado de Hoehn e Yahr

Estágio 0 - Sem sinais da doença.

Estágio 1 - Doença unilateral.

Estágio 1.5 - Acometimento unilateral e axial.

Estágio 2 - Acometimento bilateral, sem prejuízo do equilíbrio.

Estágio 2.5 - Leve acometimento bilateral, recuperação no teste de equilíbrio ("pull test").

Estágio 3 - Acometimento leve a moderado; alguma instabilidade postural; independente fisicamente.

Estágio 4 - Acometimento severo; ainda capaz de caminhar ou permanecer em pé sem auxílio.

Estágio 5 - Usando Cadeira de rodas ou acamado exceto se auxiliado

9.2 Escala ADL – Atividades de vida diária

Schwab and England Activities of Daily Living

- 100% - Completamente independente. Capaz de realizar atividades rotineiras sem lentidão, dificuldade ou prejuízo. Não percebe dificuldades. Essencialmente normal.

- 90% - Completamente independente. Capaz de realizar atividades rotineiras porém com algum grau de lentidão, dificuldade e prejuízo funcional. Pode tomar o dobro do tempo. Começa perceber suas dificuldades.

- 80% - Independente para maioria das atividades rotineiras. Toma cerca do dobro do tempo na realização das mesmas. Consciente das dificuldades e lentificação.

- 70% - Não é completamente independente. Maior dificuldade na realização de atividades rotineiras. Algumas atividades rotineiras tomam 3-4 vezes mais tempo. Pode tomar grande parte do dia para realização dessas atividades.

- 60% - Algum grau de dependência. Pode realizar a maioria das atividades rotineiras, porém com muita lentidão, dificuldade e prejuízo funcional. Erros; algumas atividades são impossíveis.

- 50% - Mais dependente. Necessita auxílio na metade das atividades rotineiras. Dificuldades em todas atividades.

- 40% - Muito dependente. Pode auxiliar nas atividades rotineiras, porém necessitando auxílio em quase todas.

- 30% - Com esforço, ocasionalmente (porém não sempre), realiza ou inicia algumas atividades sozinho. Necessita de muito auxílio.

- 20% - Não realiza nada sozinho. Pode auxiliar muito pouco em algumas atividades da rotina.

- 10% - Totalmente dependente, incapaz de auxiliar em atividades rotineiras.

- 0% - Funções vegetativas tais como deglutição e controle vesical e intestinal não são funcionantes. Restrito ao leito.

(observação: um escore intermediário pode ser selecionado)

9.3 Escala Unificada para Avaliação da Doença de Parkinson

(UPDRS – Unified Parkinson’s Disease Rating Scale)

	On	Off
III. Exame Motor		
18.Fala		
19.Facies		
20.Tremor de repouso: Face		
MSD		
MSE		
MID		
MIE		
21.Tremor de ação: Direita		
Esquerda		
22.Rigidez: Cervical		
MSD		
MSE		
MID		
MIE		
23. “Finger taps”: Direita		
Esquerda		
24.Abre/Fecha: Mão D		
Mão E		
25. Prona/supina: Mão D		
Mão E		
26. Agilidade: Perna D		
Perna E		
27.Levantar-se		
28.Postura		
29.Marcha		
30.Estabilidade		
31.Bradicinesia		
TOTAL (Max.108)		

9.4 Escala: Mini-Exame do Estado Mental

(Mini-Mental State Examination)

ORIENTAÇÃO

- * Qual é o (ano) (estação) (dia semana) (dia mês) e (mês) – PONTOS: 5
- * Onde estamos (país) (estado) (cidade) (**rua/local**) (andar) – PONTOS: 5

REGISTRO

- * Dizer três palavras: PENTE RUA AZUL. Pedir para prestar atenção, pois terá que repetir mais tarde. Pergunte pelas três palavras após tê-las nomeado. Repetir até que repita corretamente e anotar número de vezes. – PONTOS: 3

ATENÇÃO E CÁLCULO

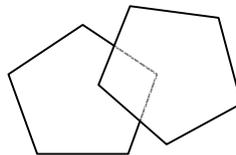
- * Subtrair: 100-7 (5 tentativas: 93 – 86 – 79 – 72 – 65) – PONTOS: 5

EVOCAÇÃO

- * Perguntar pelas 3 palavras anteriores – PONTOS: 3

LINGUAGEM

- * Identificar lápis e relógio de pulso – PONTOS: 2
- * Repetir: “Nem aqui, nem alí, nem lá” – PONTOS: 1
- * Seguir o comando de três estágios: “Pegue o papel com a mão direita, dobre ao meio e ponha no chão”. – PONTOS: 1
- * Ler ‘em voz baixa’ e executar: FECHER OS OLHOS – PONTOS: 1
- * Escrever uma frase (um pensamento, idéia completa) – PONTOS: 1
- * Copiar o desenho:



TOTAL: ____ (MÁXIMO 30)