

# **BIOTRANS**

Programa de Pós-Graduação em  
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



DANIELLE DUTRA VOIGT

**Investigação de mutações nos genes *GBA* e *CHCHD2* em pacientes com doença de Parkinson em uma amostra da população brasileira**

**Duque de Caxias**

**2019**

DANIELLE DUTRA VOIGT

**Investigação de mutações nos genes *GBA* e *CHCHD2* em pacientes com doença de Parkinson em uma amostra da população brasileira**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, INMETRO e UEZO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientadores:** Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Márcia Mattos Gonçalves  
Pimentel

**Duque de Caxias**

**2019**

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NUCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

V891i Voigt, Danielle Dutra.

Investigação de mutações nos genes GBA e CHCHD2 em pacientes com doença de parkinson em uma amostra da população brasileira / Danielle Dutra Voigt. - Duque de Caxias, 2018.

175 f.: il. ;30 cm.

Tese (doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2018.

“Orientador: Profº. Pedro Hernán Cabello”.

“Coorientadora: Profa Márcia Mattos Gonçalves Pimentel”.

Bibliografia: f. 99-113.

1. Biomedicina. 2. Doença de parkinson. 3. Gene GBA. 4. Gene CHCHD2. 5. Mutações. I. Cabello, Pedro Hernán. II. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy. IV. Título.

CDD – 610

DANIELLE DUTRA VOIGT

**Investigação de mutações nos genes *GBA* e *CHCHD2* em pacientes com doença de Parkinson em uma amostra da população brasileira**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, INMETRO e UEZO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientadores:** Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Mattos Gonçalves  
Pimentel

Banca Examinadora:

Dr. Vivaldo Moura Neto  
Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer – IECPN e Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional - BIOTRANS

Dra. Claudia Maria Pereira  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

Dr. Fernando Regla Vargas  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dra. Carmen Lucia Antão Paiva  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Dra. Carina Maciel da Silva Boghossian (Suplente)  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

Dr. Jerson Lakes (Suplente)  
Universidade do Grande Rio – Unigranrio e Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

**Duque de Caxias**

**2019**

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre ombros de gigantes”.

***Isaac Newton***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar e iluminar meu caminho e pelas oportunidades e por me dar forças para seguir em frente.

À Universidade do Grande Rio, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional e ao Laboratório de Genética (LabGen), pela oportunidade em realizar este trabalho.

Aos meus queridos orientadores Dr. Pedro Cabello e Dra. Márcia Pimentel, por acreditarem no meu potencial e pela orientação, ensinamentos, paciência e me concederem a oportunidade de concluir mais uma etapa. Me sinto muito honrada em ser orientada por profissionais tão inspiradores e qualificados.

À Dra. Carina Boghossian por revisar este trabalho.

Aos meus pais, Sérgio e Luzia, pela confiança que sempre depositaram em mim, por acreditarem na minha capacidade, me apoiarem em todos os momentos que precisei, por serem indispensáveis na minha vida e pelo amor em todos os momentos.

Ao meu marido Bruno pelo amor, paciência, companheirismo, incentivo, compreensão e por acreditar no meu potencial e tornar minha vida mais feliz e serena.

À Vivianne, pela amizade, exemplo de profissional e pelo apoio profissional e emocional, além de ser essa amiga doce e com um coração gigante.

A toda equipe do LABGEN, pelos momentos de descontração e agradável convívio. Aos meus presentes do LABGEN, amigas queridas, Tamara, Raisia, Ritiele, Danielle R, Juliana, Caroliny, Karoline e Nicole, por todo apoio emocional, conselhos, por tornarem mais agradável essa dura jornada e principalmente pela amizade construída. Torço muito por vocês e me orgulho das suas conquistas.

À toda equipe do SEVGEN pelo agradável convívio. Às queridas Andressa, Veluma, Jussara por toda ajuda, pelos ensinamentos, carinho e paciência comigo e por separarem os DNAs. Às florzinhas Camilla e Caroline pelo apoio, ajuda e convívio.

Às técnicas e a plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ, pela disponibilidade e presteza em sequenciar as amostras, sempre com muito zelo.

À Ana Carolina, do Laboratório de Genética da Fiocruz, por ser uma amiga especial, me incentivar desde o início dessa jornada, onde começamos juntas.

Aos pacientes do SERVGEN, sem os quais este trabalho não teria sido realizado, e aos seus familiares, por entenderem a importância das investigações e à todos os médicos colaboradores, pela contribuição na captação dos pacientes.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

À minha família e amigos pela torcida e apoio durante essa difícil caminhada e por compreenderem minha ausência em diversos momentos.

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

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, atinge 3% das pessoas com idade superior a 60 anos e se caracteriza por ser uma condição multissistêmica, de etiologia complexa, que envolve a ação de múltiplos genes, bem como, interações com o ambiente. Além das mutações monogênicas já conhecidas que promovem alterações nas proteínas, variantes genéticas de risco também contribuem para a suscetibilidade à DP, podendo inclusive atuar como modificadores da progressão da doença, afetando a penetrância, a idade de manifestação e o seu curso clínico. O presente estudo, conduzido em casuística brasileira, teve como objetivo o rastreamento de mutações em toda extensão dos genes *GBA* e *CHCHD2*. Os pacientes foram diagnosticados por médicos especialistas em doenças do movimento provenientes de diferentes hospitais (HUPE/RJ, HUCFF/RJ, HUAP/RJ, INDC/RJ, SCMRJ e IINEURO/GO). As análises moleculares de ambos os genes foram realizadas através do sequenciamento automático, em 304 probandos com DP para o gene *GBA* e 122 com DP familiar para o gene *CHCHD2*. A análise do gene *GBA* identificou 17 alterações exônicas (13 *missense*, 3 sinônimas e 1 *nonsense*) em 37 probandos. Dentre essas, foram observadas três alterações patogênicas [c.1448T>C (L444P), c.1226A>G (N370S) e c.1342G>C (D409H)], comumente relatadas em pacientes com DP de diferentes grupos étnicos. Além disso, foram observadas as variantes c.1049A>G, c.1251G>C e c.1598G>A, ainda não descritas em pacientes com DP. A partir das análises *in silico*, seis alterações *missense* [c.1448T>C (L444P), c.1226A>G (N370S) e c.1342G>C (D409H), c.1049A>G) H311R, c.1251G>C (W378C) e c. 703T>C (S196P)], uma sinônima c.1497G>C (V460V) e uma *nonsense* c.1598G>A (W533X) foram classificadas como patogênicas e, ao compararmos esses dados com àqueles de controles saudáveis observamos diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,012$ ; OR: 13,07; IC95%: 1,72 - 98,98). A análise dos quatro exons do gene *CHCHD2* revelou ausência de variantes patogênicas ou de risco nos 122 probandos com história familiar de DP, corroborando trabalhos da literatura conduzidos em outras populações. O presente trabalho foi o primeiro a rastrear a presença de mutações no *CHCHD2* em uma população latino-americana. Nossos resultados sugerem que variantes patogênicas neste gene são causas raras da DP em pacientes brasileiros.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, gene *GBA*, gene *CHCHD2*, mutações, população brasileira.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, affecting 3% of people over the age of 60 years and is characterized by a multisystemic condition of complex etiology that involves the action of multiple genes, as well as environmental interactions. In addition to monogenic mutations already known that promote changes in proteins, genetic variants of risk also contribute to PD's susceptibility and may also act as modifiers of disease progression, affecting penetrance, the age of manifestation and its clinical course. The present study, conducted in a Brazilian case, aimed to track mutations throughout the whole extension of the *GBA* and *CHCHD2* genes. The patients were diagnosed by specialists in movement disorders from different hospitals across Brazil (HUPE / RJ, HUCFF / RJ, HUAP / RJ, INDC / RJ, SCMRJ and IINEURO / GO). Molecular analyzes of both genes were performed through automatic sequencing in 304 probands with DP for the *GBA* gene and 122 with familial PD for the *CHCHD2* gene. *GBA* gene analysis identified 17 exonic alterations (13 missense, 3 synonyms and 1 nonsense) in 37 probands. Among these, three pathogenic alterations were observed [c.1448T>C (L444P), c.1226A>G (N370S) and c.1342G>C (D409H)], all commonly reported in patients with PD of different ethnic groups. In addition, variants c.1049A>G, c.1251G>C and c.1598G>A were observed, not yet described in patients with PD. From the in silico analyzes, six missense alterations [c.1448T> C (L444P), c.1226A> G (N370S) and c.1342G>C (D409H), c.1049A> G) H311R, c.1251G> C (W378C) and c. 703T> C (S196P)], a synonym alteration c.149 7G> C (V460V) and a nonsense alteration c.1598G> A (W533X) were classified as pathogenic. The comparison of this data with those of healthy controls showed significant statistical differences ( $P = 0.012$ , OR: 13, 07, 95% CI: 1.72 - 98.98). Analysis of the four exons of the *CHCHD2* gene revealed no pathogenic or risk variants in the 122 index case with a family history of PD, corroborating to literature studies carried out in other populations. The present work constitutes the first mention of the presence of *CHCHD2* mutations in a Latin American population. Our results suggest that pathogenic variants in this gene not a common cause of familial PD in Brazilian patients.

**Keywords:** Parkinson's disease, *GBA* gene, *CHCHD2* gene, mutations, Brazilian population.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das fases pré-sintomáticas e sintomáticas e estágios da DP.....	24
Figura 2 - Sintomas clínicos associados à progressão da doença de Parkinson.....	25
Figura 3 - Principais categorias nas quais se enquadram os fatores de risco genéticos associados à DP.....	27
Figura 4 - Mecanismos moleculares envolvidos na doença de Parkinson.....	28
Figura 5 - Comparação entre o gene funcional <i>GBA</i> e o pseudogene <i>GBAP</i> de humanos.....	31
Figura 6 - Relação patogênica entre o <i>GBA</i> e a alfa-sinucleína contribuindo para a DP.....	35
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura do gene do cromossomo 7 e da localização <i>CHCHD2</i> .....	36
Figura 8 - Modelo da proteína <i>CHCHD2</i> nas mitocôndrias.....	37
Figura 9 - Representação do gene <i>GBA</i> e as principais alterações identificadas em nossa casuística de pacientes com DP.....	53
Figura 10 - Frequências das variantes patogênicas e neutras de acordo com os programas <i>PolyPhen-2</i> , <i>SIFT</i> e <i>MutationTaster</i> .....	56
Figura 11 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1448T>C (L444P) no paciente PAR4583/18.....	56
Figura 12 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR evidenciando o alelo <i>RecNci</i> no paciente PAR4271/14.....	57
Figura 13 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1226A>G (N370S) no paciente PAR4574/18.....	58
Figura 14 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1342G>C (D409H) no paciente PAR4522/17.....	58
Figura 15 - Heredograma do paciente PAR4522/18.....	59
Figura 16 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1251G>C (W378C) no paciente PAR2285/09.....	60

Figura 17 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1049A>G (H311R) no paciente PAR4472/17.....	60
Figura 18 - Heredograma da família da paciente (PAR4472/15) a partir da segregação da mutação H311R no gene <i>GBA</i> .....	61
Figura 19 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 6, mostrando a alteração c.703T>C (S196P) no paciente PAR4099/13.....	62
Figura 20 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1483G>C (A456P) no paciente PAR2374/10.....	62
Figura 21 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1444G>A (D443N) no paciente PAR4435/15.....	63
Figura 22 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1401G>A (E388K) no paciente PAR4552/17.....	64
Figura 23 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1093G>A (E326K) no paciente PAR4433/15.....	64
Figura 24 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1223C>T (T369M) no paciente PAR4470/15.....	65
Figura 25 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1200G>A (M361I) no paciente PAR4323/15.....	65
Figura 26 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 2, mostrando a alteração c.38A>G (K(-)27R) do paciente PAR4422/15.....	66
Figura 27 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1092G>A (G325G) no paciente PAR4368/15.....	67
Figura 28 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 3, mostrando a alteração c.326G>A (P68P) no paciente PAR4425/15.....	67
Figura 29 - Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 3, mostrando a alteração c.1598G>A (W533X) no paciente PAR4042/12.....	68

Figura 30 - Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR das variantes c.28-133T>G (rs2070679), c.1224+96C>T (rs976829552), rs2075569 (c.454+47G>A) e rs7416991 (c.455-206A>G).....	69
Figura 31 - Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR das alterações rs2974923 (c.589-86A>G), rs140335079 (c.762-18T>A), rs3115534 (c.1225-34C>A) e rs2974924 (c.1389-68T>C).....	70
Figura 32 - Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR para as variantes c.-202A>G (rs188978150), c.-2G>A (rs1141801) e c.*102T>C (rs368275143).....	71
Figura 33 - Figura 32: Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do gene <i>CHCHD2</i> em 122 probandos com DP.....	75
Figura 34 - Frequência de variantes no gene <i>GBA</i> identificadas em pacientes com DP de diferentes grupos étnicos.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes associados à forma monogênica da doença de Parkinson.....	26
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 11 exons do gene <i>GBA</i> .....	44
Tabela 3 - Condições utilizadas para amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-4, 5-7 e 8-11 do gene <i>GBA</i> .....	45
Tabela 4 - Condições de ciclagem utilizadas na PCR dos segmentos do gene <i>GBA</i> .....	45
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos exons do gene <i>CHCHD2</i> .....	46
Tabela 6 - Condições utilizadas na reação da PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons do gene <i>CHCHD2</i> .....	46
Tabela 7 - Condições de ciclagem utilizadas na PCR dos segmentos do gene <i>CHCHD2</i> .....	47
Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos 11 exons do gene <i>GBA</i> .....	48
Tabela 9 - Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos 4 exons do gene <i>CHCHD2</i> .....	49
Tabela 10 - Condições de ciclagem utilizadas para o sequenciamento automático dos genes <i>GBA</i> e <i>CHCHD2</i> .....	49
Tabela 11 - Dados gerais sobre a amostra de pacientes com DP analisada para o gene <i>GBA</i> .....	52
Tabela 12 - Dados relativos ao gênero entre os pacientes com doença de Parkinson.....	52
Tabela 13 - Variantes evidenciadas na análise molecular do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP, de acordo com a localização, tipo de mutação, número de pacientes mutados e frequência das variantes em DP.....	54
Tabela 14 - Análise de predição das alterações <i>missense</i> por meio dos programas <i>Polyphen-2</i> , <i>Sift</i> e <i>MutationTaster</i> .....	55
Tabela 15 - Principais variantes encontradas nos introns do gene <i>GBA</i> , de acordo com a localização, número de pacientes com DP e frequência da variante em DP.....	68

Tabela 16 - Variantes identificadas nas regiões 5' UTR e 3' UTR do gene <i>GBA</i> .....	71
Tabela 17 - Dados sobre a amostra estudada de pacientes com DP portadores de mutações <i>GBA</i> e não portadores.....	72
Tabela 18 - Dados clínicos de pacientes com DP portadores de mutações patogênicas no <i>GBA</i> .....	73
Tabela 19 - Principais variantes encontradas nos exons analisados do gene <i>GBA</i> na amostra controle, de acordo com a localização, tipo de mutação, número de alterações e frequência das variantes em controles.....	74
Tabela 20 - Dados gerais sobre a amostra de pacientes com DP analisada para o gene <i>CHCHD2</i> .....	74
Tabela 21 - Síntese dos estudos que realizaram o rastreamento total do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP em diferentes grupos étnicos.....	79
Tabela 22 - Síntese dos estudos que avaliaram a presença da mutação L444P no gene <i>GBA</i> em pacientes com DP e controles saudáveis.....	83
Tabela 23 - Síntese dos estudos que avaliaram a presença da mutação N370S no gene <i>GBA</i> em pacientes com DP e controles saudáveis.....	85
Tabela 24 - Síntese dos estudos que avaliaram a presença do polimorfismo E326K no gene <i>GBA</i> em pacientes com DP e controles saudáveis.....	91

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	adenina
AD	autossômica dominante
Ala/A	alanina
AR	autossômica recessiva
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Ácido Aspártico
<i>ATP13A2</i>	Gene <i>ATPase type 13A2</i>
C	Citosina
c.DNA	Ácido desoxirribonucléico codificante
<i>CHCHD2</i>	Gene <i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
C-terminal	Carboxiterminal
Cys/C	Cisteína
DA	Doença de Alzheimer
del	Deleção
DG	Doença de Gaucher
<i>DJ-1</i>	Oncogene <i>DJ-1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>DNAJC13</i>	Gene DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13
<i>DNAJC6</i>	Gene DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>EIF4G1</i>	Gene <i>Eukaryotic translation initiation factor 4 Gamma 1</i>
F	Feminino
<i>FBXO7</i>	Gene <i>F-box protein 7</i>
<i>FIOCRUZ</i>	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
g	Giros
<i>GBA</i>	Gene da glicocerebrosidase

GBAP	Pseudogene da glicocerebrosidase
GIGYF2	Gene <i>GRB10-interacting GYF protein 2</i>
Gly/G	Glicina
GWAS	Estudos de associação do genoma
HCL	Ácido clorídrico
His/H	Histidina
<i>HLA-DR</i>	Gene <i>Major histocompatibility complex, classe II DR</i>
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro
<i>HTRA2</i>	Gene <i>HTRA serine peptidase 2</i>
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança
<i>IDT</i>	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IM	Idade de manifestação
INDC	Instituto de Neurologia Deolindo Couto
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
Leu/L	Leucina
LRRK2	Gene <i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
Lys/K	Lisina
M	Molar
M	Masculino
<i>MAPT</i>	Gene <i>Microtubule-associated Protein Tau</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
N	Normal
NR	Núcleo rubro
N-terminal	Amino-terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
OR	Odds ratio

p	Braço curto de um cromossomo
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Plataforma de desenvolvimento tecnológico em insumos para saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PINK1	Gene PTEN-induced putative kinase 1
PLA2G6	Gene Phospholipase A2 group VI
PRKN	Gene Parkin <i>RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
Pro/P	Prolina
q	Braço longo de um cromossomo
RAB39B	Gene Ras-related protein Rab-39B
RecNc//	Alelo recombinante
RIC3	Gene acetylcholine receptor chaperone ou Resistance to Inhibitors of Cholinesterase 3
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SCMRJ	Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro
Seg	Segundos
Ser/S	Serina
SERVGEN	Serviço de Genética Humana da UERJ
SN	Subtância negra
SNC	Sistema nervoso central
SNCA	Gene $\alpha$ -Synuclein
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SYNJ1	Gene Synaptojanin 1
T	Timina
TBE	Tampão tris-ácido bórico- <i>EDTA</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMEM230	Gene Transmembrane protein 230
Tris	Trihidroximetil aminometano
Trp/W	Triptofano
Tyr/Y	Tirosina
U	Unidade

UCHL1	Gene Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNIGRANRIO	Unversidade do Grande Rio
UPS	Sistema Ubiquitina-proteossomo
UTR	(do inglês: <i>Untranslated region</i> )
V	Volt
VPS13C	Gene <i>Vacuolar protein sorting 13</i>
VPS35	Gene <i>retromer complex component</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
pmol	Picomol
°C	Graus Celsius

## LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
+	Mais ou positivo
-	Não avaliado ou não informado
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual > Maior que
X	Vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 Aspectos clínicos da doença de Parkinson (DP).....	23
1.2 Etiologia da DP.....	25
1.3 Vias moleculares envolvidas na DP.....	28
1.4 Gene <i>GBA</i> e <i>CHCHD2</i> .....	30
1.4.1 Gene <i>GBA</i> .....	30
1.4.1.1 O gene <i>GBA</i> , a doença de Gaucher e a doença de Parkinson .....	32
1.4.2 Gene <i>CHCHD2</i> .....	36
1.4.2.1 Mutações no gene <i>CHCHD2</i> e a DP.....	38
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivo específico.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Casuística.....	41
4.2 Coleta de material biológico.....	42
4.3 Extração de DNA genômico.....	42
4.4 Ensaio molecular.....	43
4.4.1 Estimativa da concentração e da integridade do DNA.....	43
4.4.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR).....	44
4.4.2.1 Gene <i>GBA</i> .....	44
4.4.2.2 Gene <i>CHCHD2</i> .....	45
4.4.3 Análise dos fragmentos amplificados e do rendimento da reação das reações de PCR.....	47
4.4.4 Purificação dos produtos da PCR.....	47
4.4.5 Reação de sequenciamento.....	48
4.5 Análise das sequências.....	50
4.5.1 Ferramentas eletrônicas.....	50

4.6 Análise estatística.....	51
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1 Análise descritiva do gene <i>GBA</i> .....	52
5.2 Análise molecular do gene <i>GBA</i> .....	53
5.2.1 Alterações exônicas.....	53
5.2.1.1 Variantes <i>missense</i> identificadas no gene <i>GBA</i> .....	54
5.2.1.2 Variantes sinônimas identificadas no gene <i>GBA</i> .....	66
5.2.1.3 Variantes <i>nonsense</i> identificada no gene <i>GBA</i> .....	67
5.2.2 Alterações identificadas na região intrônica e 5' UTR e 3' UTR.....	68
5.2.3 Probandos com mutações no gene <i>GBA</i> .....	72
5.2.4 Análise da amostra controle para o gene <i>GBA</i> .....	74
5.3 Análise descritiva do gene <i>CHCHD2</i> .....	74
5.3.1 Análise molecular do gene <i>CHCHD2</i> .....	75
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
6.1 Gene <i>GBA</i> .....	76
6.1.1 Estudos do gene <i>GBA</i> em pacientes com DP na população brasileira.....	81
6.1.2 Alterações <i>missense</i> identificadas no gene <i>GBA</i> .....	81
6.1.3 Alterações sinônimas identificadas no gene <i>GBA</i> .....	93
6.1.4 Alteração sem sentido ( <i>nonsense</i> ) identificada no gene <i>GBA</i> .....	93
6.1.5 Alterações identificadas nos introns e na região promotora 5' UTR e 3'UTR.....	94
6.1.6. A influência de mutações no gene <i>GBA</i> no fenótipo da Doença de Parkinson.....	94
6.2 Gene <i>CHCHD2</i> .....	95
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>98</b>
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO A.....	114
ANEXO B.....	116
ANEXO C.....	118
APÊNDICE A.....	119

APÊNDICE B.....	127
APÊNDICE C.....	135
APÊNDICE D.....	146
APÊNDICE E.....	170
APÊNDICE F.....	173

## 1 INTRODUÇÃO

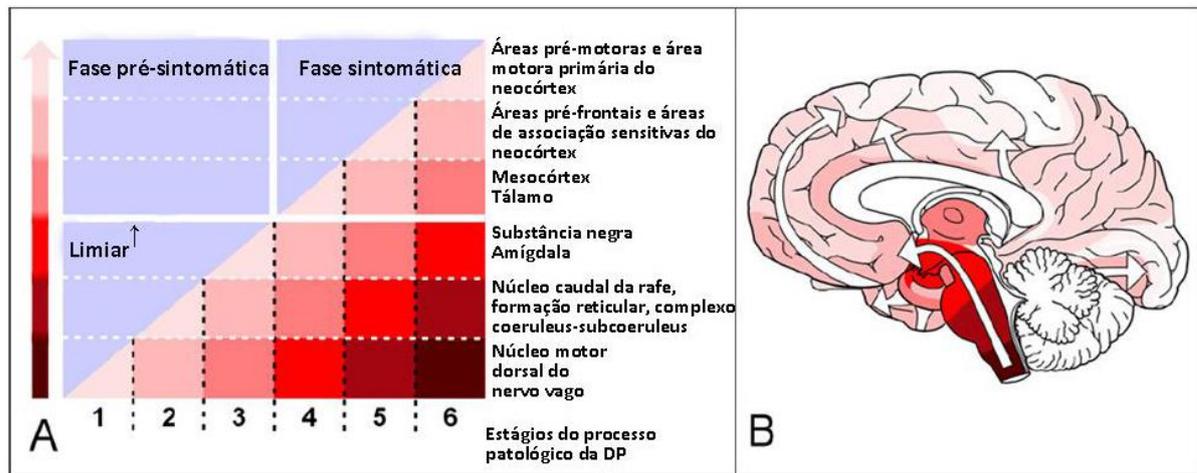
A doença de Parkinson (DP; OMIM 168600) foi inicialmente descrita pelo médico inglês James Parkinson, que a caracterizou como uma “paralisia agitante” (PARKINSON, 1817). No estudo, ele descreveu 6 pacientes que apresentavam tremor de repouso, diminuição da força muscular e tronco em flexão com alteração da marcha (PARKINSON, 1817). Posteriormente, Chacot, considerado por muitos como “pai da neurologia”, sugeriu que o nome da doença fosse modificado para doença de Parkinson. Além disso, acrescentou inúmeras contribuições à descrição do quadro clínico da DP, sendo responsável pela indicação das quatro manifestações motoras cardinais da doença: tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (TAN *et al.*, 2007a; PARKINSON, 2002; OBESO *et al.*, 2017).

A DP é considerada o segundo distúrbio neurodegenerativo mais frequente após a doença de Alzheimer (NUSSBAUM E ELLIS, 2003; DE LAU E BRETELE, 2006; ERKKINEN, KIM E GESCHWIND, 2018), apresentando uma prevalência mundial estimada entre 50 a 200 casos e incidência variando de 5 a 35 novos casos por ano, ambos por cem mil habitantes, variando dentro dos subgrupos determinados por etnia, genótipo ou ambiente (SPATOLA E WIDER, 2014). A DP afeta entre 1% e 3% da população com idade superior a 60 anos e 4% com idade acima de 85 anos (DE LAU E BRETELER, 2006; DENG, GAO E JANKOVIC, 2013). Até o ano de 2030, estima-se que 8,7 a 9,3 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas por esta doença (DE RIJK *et al.*, 2000; FAHN, 2003; DORSEY *et al.*, 2007; DEPAOLO *et al.*, 2009). Essa condição acomete todos os grupos étnicos, de ambos os sexos, porém, estudos sugerem que, na maioria das populações, a taxa de incidência nos homens é duas vezes maior do que em mulheres. Acredita-se que esta diferença possa estar relacionada aos hormônios femininos ou a mecanismos genéticos associados ao sexo (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003; KIEBURTZ E WUNDERLE, 2013; POEWE *et al.*, 2017).

## 1.1 Aspectos clínicos da doença de Parkinson (DP)

A DP é uma condição crônica e progressiva, caracterizada patologicamente por degeneração dos neurônios dopaminérgicos na porção completa da substância negra (SNc) e aglomeração intracitoplasmática de proteínas (alfa-sinucleína), formando os chamados corpos de Lewy, encontrados em diferentes regiões do sistema nervoso central e periférico, o que resulta na carência de sinalização da dopamina nos gânglios basais, responsáveis pelo controle dos movimentos (BURRÉ, 2010; LOTIA E JANKOVIC, 2016; ZAFAR E YADDANAPUDI *et al.*, 2018). Braak e colaboradores (2003; 2004) publicaram dois importantes estudos, nos quais formularam uma nova ideia referente à progressão da DP, ao observarem que a distribuição dos corpos de Lewy envolve gradualmente diversas regiões do cérebro, à medida que a doença progride. Esses autores propuseram um esquema de estadiamento da doença em seis estágios e duas fases: pré-sintomática (1-3) e fase sintomática (4-6) (Figura 1). No estágio inicial (estágio1) ocorre o acometimento do núcleo motor dorsal, do vago, zona reticular e o núcleo olfativo anterior, evidenciados pela presença dos primeiros corpos de Lewy. No estágio 2, as primeiras lesões são observadas na ponte, especialmente nos núcleos da rafe, na formação reticular e no *locus coeruleus*. No estágio 3, a degeneração no mesencéfalo determina o aparecimento dos primeiros sintomas motores clássicos, havendo comprometimento da substância negra *pars compacta* do mesencéfalo, onde são encontrados os primeiros corpos de Lewy. Já no estágio 4, os corpos de Lewy atingem o mesocórtex e a partir do estágio 5, as alterações neuropatológicas progridem, do mesocórtex para o neocórtex e finalmente no estágio 6, etapa mais avançada, as áreas corticais são difusamente acometidas, destacando-se as pré-motoras, motoras e sensitivas (BRAAK *et al.*, 2003 e 2004).

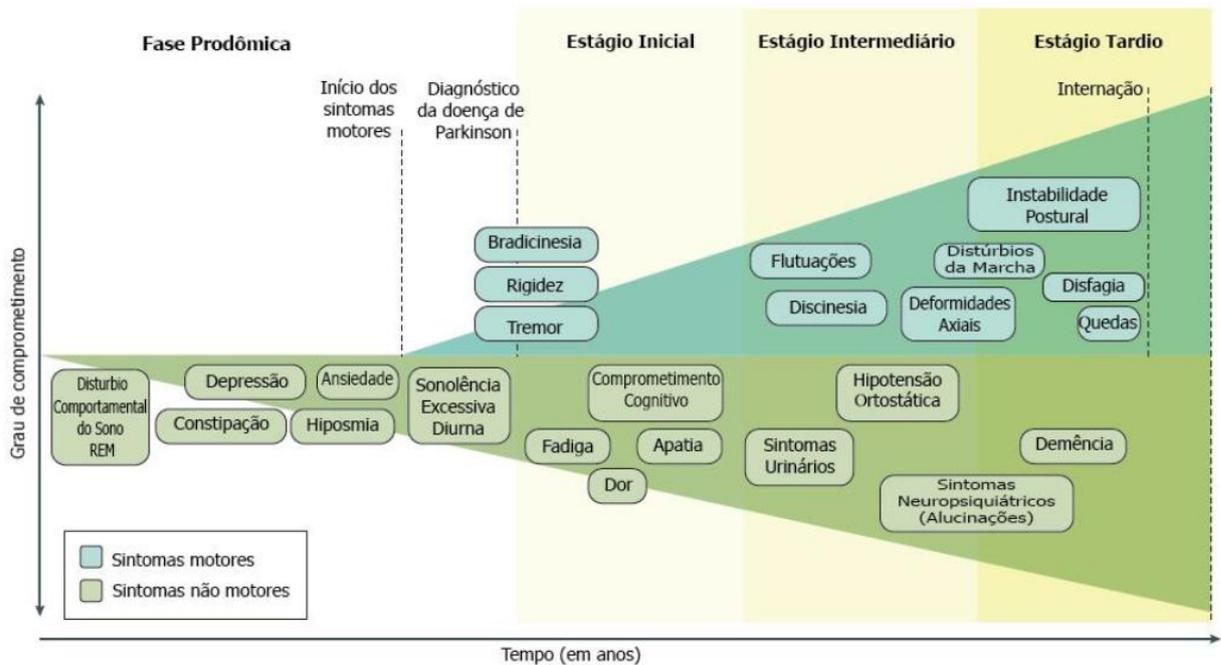
Figura 1. Representação das fases pré-sintomática e sintomática e estágios da DP



(A) Representação das fases pré-sintomática e sintomática e dos estágios da DP. (B) Diagrama mostrando as áreas do cérebro afetadas (setas brancas). As áreas sombreadas correspondem à gravidade da patologia que também é mostrada em A. Fonte: Adaptado de BRAAK *et al.*, 2004.

Clinicamente, a DP é definida pela presença de manifestações motoras cardinais, como tremor de repouso, bradicinesia (lentidão ao realizar os movimentos voluntários), rigidez e instabilidade postural (BOHLHALTER E KÄGI, 2011; JANKOVIC, 2008), geralmente, de forma unilateral/assimétrica. No entanto, a disfunção neuronal tem início antes da manifestação motora, com o surgimento de sintomas não motores como hiposmia, distúrbio comportamental do sono REM (do inglês *Rapid Eye Movement*), fadiga, depressão e constipação, que são observados na fase prodrômica da doença e evoluem com os sintomas motores (BERGANZO, *et al.*, 2016; POEWE *et al.*, 2017) (Figura 2).

Figura 2: Sintomas clínicos associados à progressão da doença de Parkinson



O diagnóstico da DP ocorre com o aparecimento de sintomas motores, mas é precedido por uma fase prodrômica, que dura anos ou, até mesmo, décadas, caracterizada por sintomas não motores específicos. Os sintomas não motores tornam-se cada vez mais predominantes ao longo do curso da doença, mas podem estar presentes em grau variável em todas as fases dessa. Fonte: Adaptado de POEWE *et al.*, 2017.

## 1.2 Etiologia da DP

A DP se caracteriza por uma patologia complexa e multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, associada ao envelhecimento (DENG *et al.*, 2018). Entre os fatores ambientais, destacam-se a exposição a substâncias tóxicas e herbicidas (HANCOCK *et al.*, 2018), doenças infecciosas, esportes profissionais que envolvem impactos na cabeça, e certas profissões, incluindo mineração e a soldagem (PEZZOLI E CEREDA, 2013; BRECKENRIDGE *et al.*, 2016). Em contrapartida, alguns fatores ambientais como o tabaco, assim como o consumo de café e chá, atuam como agentes neuroprotetores, reduzindo o risco de desenvolvimento da doença (HERNÁN *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2006; HANCOCK *et al.*, 2007; QI E LI, 2014; BRECKENRIDGE *et al.*, 2016; DORSEY *et al.*, 2018). Além disso, prática de atividades físicas também têm sido associadas a um risco diminuído de DP (THACKER *et al.*, 2008).

Além dos fatores ambientais, a contribuição genética à DP foi descrita por Polymeropoulos e colaboradores (1997), a partir da identificação da primeira mutação (A53T) no gene *SNCA*, segregando de forma autossômica dominante em famílias de pacientes com DP (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997). Após o reconhecimento da primeira alteração genética associada à DP, outras foram identificadas em 20 genes e associadas a essa doença. No entanto, até o momento, mutações em 11 genes são reconhecidas como causas bem estabelecidas da DP (Tabela 1) (MARRAS *et al.*, 2016).

Tabela 1. Genes associados à forma monogênica da doença de Parkinson

Gene*	Loci	Proteína	Modo de herança**	Idade de Manifestação da DP (anos)	Referência
PARK- <i>SNCA</i>	4q21-q23	Alfa-sinucleína	AD	38-65	POLYMEROPOULOS <i>et al.</i> , 1997
PARK- <i>PRKN</i>	6q25.2-q27	Parkin	AR	6-72	KITADA <i>et al.</i> , 1998
PARK- <i>PINK1</i>	1p35-p36	PINK1	AR	20-40	VALENTE <i>et al.</i> , 2004
PARK- <i>DJ-1</i>	1p36	DJ-1	AR	20-40	BONIFATI, 2003
PARK- <i>LRRK2</i>	12q12	LRRK2/ Dardarina	AD	50-70	PAISÁN-RUIZ <i>et al.</i> , 2004
PARK- <i>ATP13A2</i>	1p36	ATP13A2	AR	20-40	RAMIREZ <i>et al.</i> , 2006
PARK- <i>PLA2G6</i>	22q13.1	Fosfolipase A2	AR	Juvenil	PAISÁN-RUIZ <i>et al.</i> , 2009
PARK- <i>FBXO7</i>	22q12-q13	F-box 7	AR	Precoce	DI FONZO <i>et al.</i> , 2009
PARK- <i>VPS35</i>	16q11.2	VPS35	AD	-	ZIMPRICH <i>et al.</i> , 2011
PARK- <i>DNAJC6</i>	1p31.3	Desconhecida	AR	Juvenil	EDVARDSON <i>et al.</i> , 2012
PARK- <i>SYNJ1</i>	21q22.11	SYNJ1	AR	Juvenil	KREBS <i>et al.</i> , 2013; QUADRI <i>et al.</i> , 2013

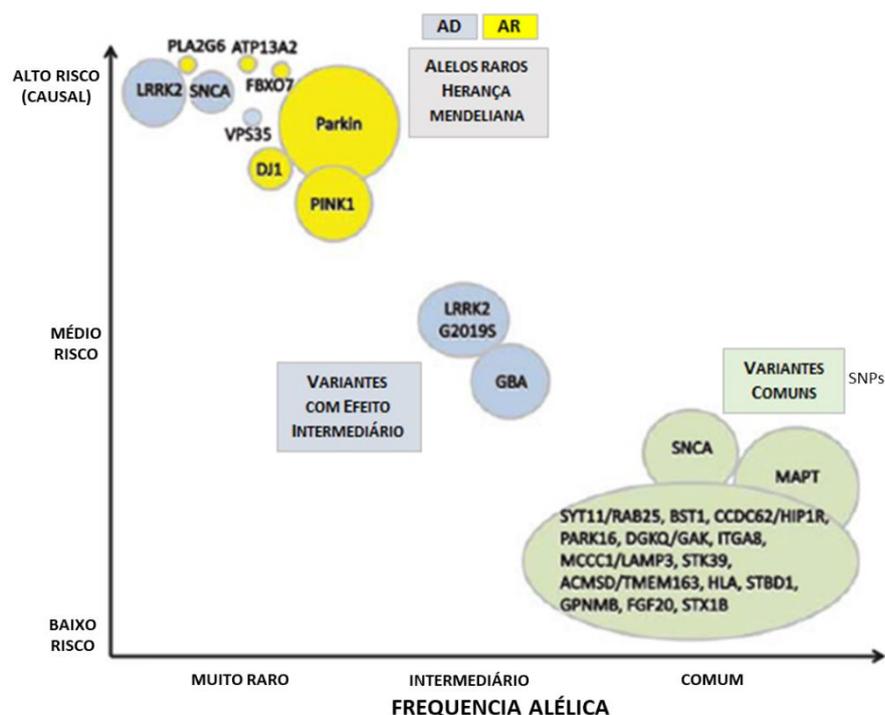
*SNCA* -  $\alpha$ -Synuclein; *PRKN* - Parkin; *PINK1* - PTEN-induced putative kinase 1; *DJ-1* - oncogene DJ-1; *LRRK2* - Leucine-Rich Repeat Kinase 2; *ATP13A2* - ATPase type 13A2; *PLA2G6* - group VI phospholipase A2; *FBXO7* - F-box only protein 7; *VPS35* - vacuolar protein sorting 35; *DNAJC6* - DnaJ heat shock protein Family; *SYNJ1* - synaptojanin.  
\*\* Autossômica dominante (AD) e autossômica recessiva (AR).

Além desses, alterações em outros genes, como o *UCHL1* (LEROY *et al.*, 1998), *HTRA2* (STRAUSS *et al.*, 2005), *EIF4G1* (CHARTIER-HARLIN *et al.*, 2011), *DNAJC13* (EDVARDSON *et al.*, 2012), *TMEM230* (DENG *et al.*, 2016), *VPS13C* (LESAGE *et al.*, 2016), *RIC3* (SUDHAMAN *et al.*, 2016), *RAB39B* (WILSON *et al.*,

2014) e *CHCHD2* (FUNAYAMA *et al.*, 2015), também têm sido identificadas associadas à DP, embora aguardem confirmação em outros grupos étnicos.

Recentes estudos de associação genômica (da sigla inglesa GWAS) (SATAKE *et al.*, 2009; FUNAYAMA *et al.*, 2015; BLAUWENDRAAT *et al.*, 2018; NALLS *et al.*, 2018) identificaram variantes genéticas que conferem risco, como fatores de susceptibilidade ou moduladores da DP, influenciando a penetrância, a idade de manifestação, o quadro clínico e a progressão da doença, o que reforça a complexidade genética dessa condição (GASSER, 2015; DOMINGO E KLEIN *et al.*, 2018). Essas variantes associadas à DP podem ser classificadas em três classes principais: alelos raros que correspondem às formas mendelianas da DP e conferem alto risco; aqueles que atribuem risco intermediário e alelos comuns, como aqueles presentes nos genes *SNCA*, *LRRK2* e *GBA*, associados à predisposição da doença (Figura 3) (GASSER, 2015).

Figura 3. Principais categorias nas quais se enquadram os fatores de risco genéticos associados à DP



Conjunto de variantes de diferentes forças e frequências alélicas. O tamanho das bolhas refere-se às frequências dos alelos da população. As cores simbolizam os modos de herança: dominante (azul), recessivo (amarelo), *loci* de risco (verde). Fonte: Adaptado de GASSER, 2015.

### 1.3 Vias moleculares envolvidas na DP

Algumas proteínas codificadas por genes associados ao desenvolvimento da DP estão envolvidas em um conjunto de vias moleculares que exercem funções importantes, tais como a dinâmica lipídica e vesicular (*SNCA*), sistema ubiquitina-proteossomo (*Parkin*, *DJ-1* e *UCHL1*), via de sinalização celular (*LRRK2*), estresse oxidativo, funcionamento mitocondrial (*DJ-1*, *PINK1*, *PRKN*, *HTRA2* e *CHCHD2*) e a via lisossômica (*GBA* e *ATP13A2*). Quando uma única proteína sofre alteração, pode ocorrer uma disfunção de componentes associados a essa via, levando à morte dos neurônios dopaminérgicos (Figura 4). Apesar do conhecimento sobre a patogênese da DP estar progredindo, ainda não se sabe exatamente como os genes interagem nessas vias. Assim, o estudo de novos genes e a interação entre eles podem contribuir para o melhor entendimento dos processos moleculares subjacentes à patogênese da DP (FARRER, 2006; KIM E LEE, 2008; MELKI, 2015; DELAMARRE E MEISSNER, 2017).

Figura 4. Mecanismos moleculares envolvidos na doença de Parkinson

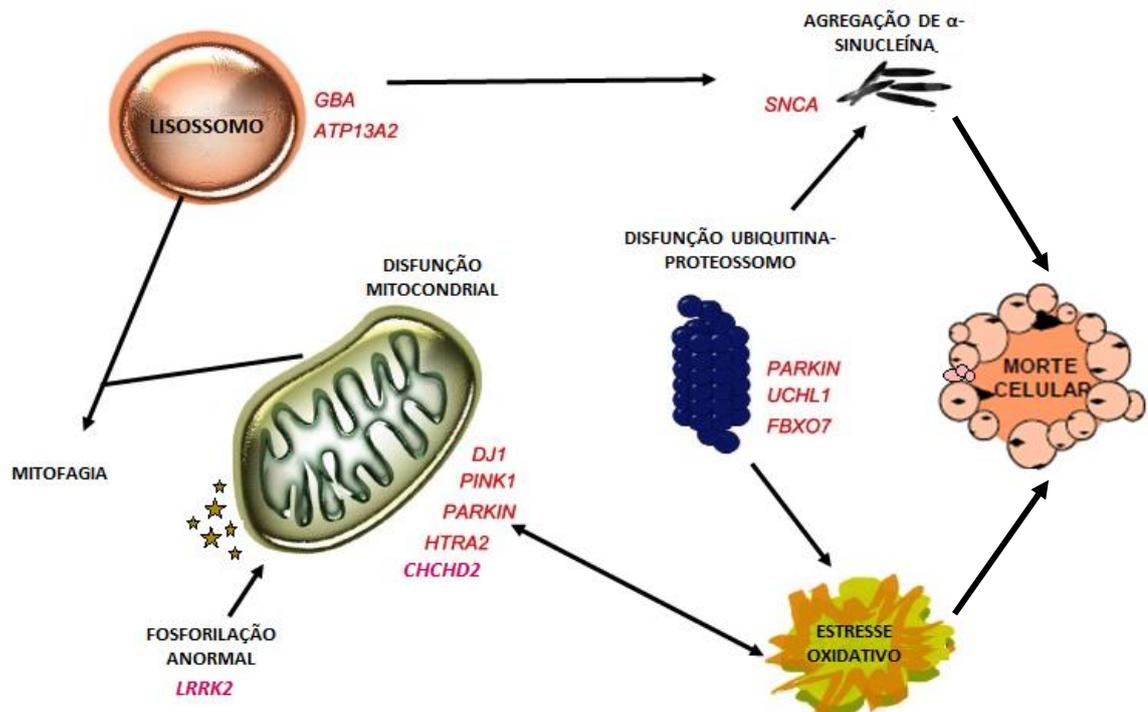


Diagrama esquemático mostrando interações entre as principais vias moleculares implicadas na patogênese da doença de Parkinson. Fonte: Adaptado de SCHULTE E GASSER, 2011.

O primeiro gene identificado associado à DP foi o *SNCA* (alfa-sinucleína) (POLYMERPOULOS *et al.*, 1997), que codifica a alfa-sinucleína, proteína pré-sináptica, envolvida na modulação de liberação dos neurotransmissores de dopamina, maturação de vesículas pré-sinápticas e plasticidade sináptica (BENDOR *et al.*, 2013).

O acúmulo citoplasmático de monômeros da proteína alfa-sinucleína, acarreta a formação de oligômeros tóxicos para a célula. Deste modo, o aumento nas proteínas que são degradadas pela via ubiquitina/proteossomo e/ou pela via lisossômica pode contribuir para o estresse proteolítico devido ao acúmulo e à agregação de proteínas no citosol (HASHIMOTO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000). Além disso, a ligação deficiente desta proteína com as vesículas prejudica a liberação de neurotransmissores, cujo acúmulo no citosol pode levar ao estresse oxidativo, o que contribui para agregação da alfa-sinucleína e morte dos neurônios dopaminérgicos (ZHANG *et al.*, 2000). Assim, para compreender a patogênese da DP, é extremamente importante o entendimento dos mecanismos celulares que levam à agregação da alfa-sinucleína, uma vez que essa proteína é o principal componente dos corpos de Lewy (EMAMZADEH, 2016).

O sistema ubiquitina-proteossomo (UPS) é um mecanismo complexo, que possui como alvo a degradação de proteínas que são reconhecidas, desdobradas e proteolizadas pela maquinaria de ubiquitinação (WONG E CUERVO, 2010; NIXON, 2013; TANAKA E MATSUDA, 2014). O gene *PRKN* codifica a proteína parkin que atua como uma ubiquitina ligase do tipo E3 e age como um regulador da degradação de proteínas, direcionando-as para o proteossomo. Além disso, esta proteína está envolvida na manutenção mitocondrial, podendo induzir a autofagia de mitocôndrias não funcionais (SCHULTE E GASSER, 2011; ARAS *et al.*, 2015). As primeiras mutações neste gene foram identificadas em famílias japonesas com parkinsonismo juvenil, representando a causa mais comum de DP de início precoce (SCHULTE E GASSER, 2011).

Diversos estudos têm evidenciado a disfunção mitocondrial como um elemento chave na patogênese da doença de Parkinson (SCHAPIRA, 2007; BOSE E BEAL, 2016; ARAS *et al.*, 2015). Essa disfunção pode ser resultado de alterações causadas por defeitos bioenergéticos, mutações genéticas no DNA nuclear ligadas à mitocôndria, mutações no DNA mitocondrial, alterações na dinâmica das mitocôndrias, tais como fissão e fusão, alterações de morfologia e alterações no transporte das mitocôndrias (PERIER *et al.*, 2010). Assim como mutações no gene

*SNCA* levam ao comprometimento funcional da alfa-sinucleína, alterações nos genes *PINK1*, *PARKIN*, *DJ-1* e *CHCHD2* também foram associadas ao desenvolvimento da DP, podendo ocasionar disfunção mitocondrial, levando a um processo de estresse oxidativo e à produção de espécies reativas de oxigênio, causando a morte celular (PARKER, PARKS E SWERDLOW, 2008; PERIER *et al.*, 2010; LARSEN, HANSS E KRÜGER, 2018).

O comprometimento lisossômico é um dos principais sistemas proteolíticos em células humanas e está envolvido na degradação da alfa-sinucleína, desempenhando um papel central na fisiopatologia da DP. Além de ser degradada pelo proteossomo esta proteína também é degradada pelo lisossomo. Disfunções nesta via podem induzir a agregação de proteínas no citosol, levando ao desenvolvimento da DP (CUERVO *et al.*, 2004; MOORS *et al.*, 2016). Além disso, o risco de desenvolver a doença tem sido fortemente associado a mutações nos genes *GBA* e *ATP13A2*, que codificam enzimas lisossômicas e participam da via lisossômica de degradação (MOORS *et al.*, 2016).

Mutações no gene *ATP13A2* podem ocasionar comprometimento funcional e sobrecarga da via lisossômica, tendo como consequência a agregação da proteína alfa-sinucleína (LIU *et al.*, 2016). Diversas variantes patogênicas no gene *GBA*, que codifica a proteína glicocerebrosidase, levam à deficiência desta enzima e, conseqüentemente, à disfunção lisossômica, interferindo na degradação e no aumento dos níveis citoplasmáticos de alfa-sinucleína, formando agregados proteicos, contribuindo, assim, para a etiologia da DP (SIDRANSKY E LOPEZ, 2012).

#### 1.4 Genes *GBA* e *CHCHD2*

A seguir, será dado destaque a detalhes referentes aos genes *GBA* e *CHCHD2*, objeto desta tese.

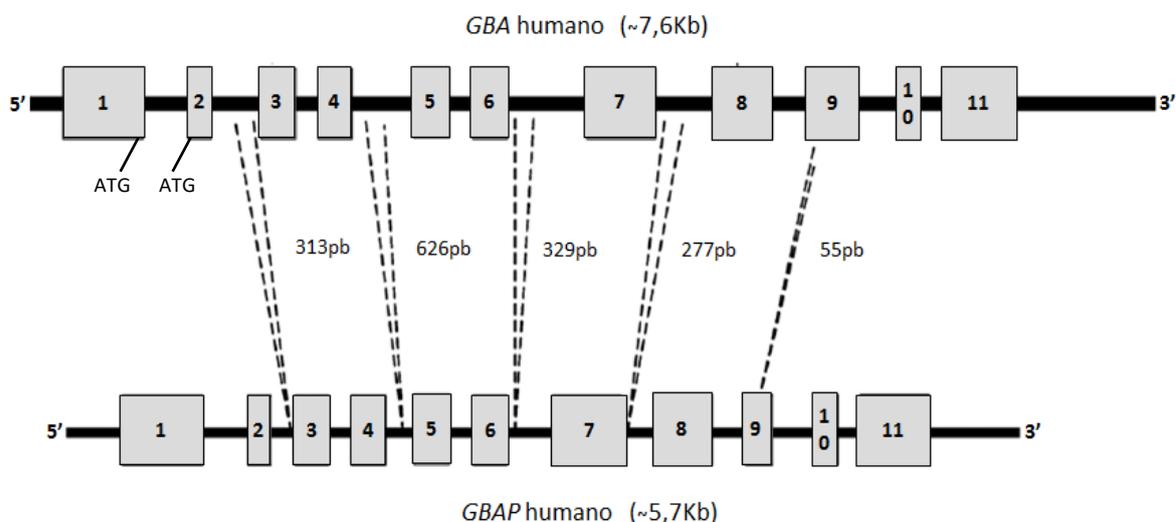
##### 1.4.1 Gene *GBA*

O gene glicocerebrosidase humano (*GBA*; OMIN 606463) está localizado em 1q21, região cromossômica com grande densidade gênica. Ele apresenta 11 exons e se estende por 7,6 Kb (SHAFIT-ZAGARDO *et al.*, 1981; BARNEVELD *et al.*, 1983). Localizado a 16 Kb à jusante do gene *GBA*, encontra-se o pseudogene (*GBAP*) altamente homólogo ao *GBA*, ao qual abrange uma extensão de 5,7 Kb e contém a

mesma organização de exons e introns que o *GBA*, não sendo, entretanto, funcional (Figura 5) (HOROWITZ *et al.*, 1989; SCHAPIRA, 2015).

Apesar destes dois genes apresentarem tamanhos diferentes, resultantes de inserções de sequências *Alu* nas regiões intrônica do gene *GBA*, há 96% de similaridade entre eles. A falta de funcionalidade do *GBAP* deve-se, em parte, a duas deleções exônicas, uma no exon 4 (4 pb) e outra no exon 9 (55 pb) (HOROWITZ *et al.*, 1989; ZIMRAN *et al.*, 1990; WINFIELD *et al.*, 1997; HRUSKA *et al.*, 2008).

Figura 5. Comparação entre o gene funcional *GBA* e o pseudogene *GBAP* de humanos



As linhas pontilhadas delimitam as sequências ausentes no pseudogene, com seus respectivos tamanhos em pb. Fonte: Adaptado de WAF AEI E CHOY, 2005.

O gene *GBA* codifica a enzima glicocerebrosidase (*GBA*), uma enzima presente na superfície da membrana interna do lisossomo, responsável por catalisar a hidrólise do glicocerebrosídeo glucosilceramida, um glicolípido de membrana, convertendo-o em glicose e ceramida (DVIR *et al.*, 2003; HRUSKA *et al.*, 2008; GAN-OR, *et al.*, 2015). A enzima *GBA* possui, aproximadamente, 62 kDa, 497 aminoácidos e é expressa de forma ubíqua em todos os tecidos (DINUR *et al.*, 1986; MISTRY e COX, 1993).

O cDNA do gene *GBA* tem aproximadamente 2 Kb e possui dois sítios ATG de início da tradução, sendo um localizado no exon 1 e outro no exon 2 (Figura 5), ambos eficazmente traduzidos produzem dois polipeptídios diferentes, que são

removidos da proteína madura. O primeiro ATG produz uma proteína com um peptídeo sinal de 39 resíduos e o segundo com 19 resíduos, que são processados durante a passagem pelo retículo endoplasmático numa enzima funcional de 497 aminoácidos, a glicocerebrosidase (GBA) (HRUSKA *et al.*, 2008). A estrutura dessa proteína, obtida pela primeira vez em 2003 (DVIR *et al.*, 2003), mostrou que esta possui três domínios não contínuos. O domínio I, formado pelos aminoácidos 1 a 27 e 383 a 414, relacionadas ao enovelamento correto da proteína. O domínio II, formado pelos aminoácidos 30 a 75 e 431 a 497, consiste em duas folhas beta, semelhantes à imunoglobulina e desempenham um papel regulatório ou estrutural. Finalmente, o domínio III, formado pelos aminoácidos 76 a 381 e 416 a 430, contém o sítio catalítico de GBA (DVIR *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.1 O Gene *GBA*, a doença de Gaucher e a relação com a doença de Parkinson

A doença de Gaucher (DG) é uma glicosfingolipidose pertencente ao grupo das doenças de armazenamento dos lisossomos, com um padrão de herança autossômico recessivo, causada por uma disfunção no gene *GBA*, que codifica a enzima glicocerebrosidase (BRADY *et al.*, 1966; HRUSKA *et al.*, 2008). O acúmulo da glucosilceramida nos lisossomos leva a falhas na hidrólise de seu substrato, resultando em uma disfunção celular (BEUTLER, 1996). Os efeitos desta deficiência são atribuídos ao acúmulo de glicocerebrosídeo, o que faz com que os macrófagos sejam caracterizados como “células de Gaucher” (LEE, 1968; GUGGENBUHL *et al.*, 2008).

A DG apresenta uma incidência de 1:40.000 a 1:60.000 indivíduos na população em geral e, apesar de afetar todos os grupos étnicos, sua frequência é maior entre os judeus *Ashkenazi*, sendo sua incidência de 1:800 nascimentos (HRUSKA *et al.*, 2008; GRABOWSKI, 2008; STIRNEMANN *et al.*, 2012). Tal condição, caracteriza-se por um fenótipo variável, apresentando manifestações multissistêmicas, que incluem principalmente o envolvimento do baço, fígado, medula óssea, pulmões e sistema nervoso (HRUSKA *et al.*, 2008). Com base na idade de manifestação, sintomas clínicos e, principalmente, o grau de envolvimento neurológico, pode-se classificar a doença em três tipos principais: do tipo 1, responsável por mais de 90% dos casos e caracterizada pela ausência do envolvimento neurológico; tipos 2 e 3, caracterizados por comprometimento

neurológico (GUGGENBUHL *et al.*, 2008; GRABOWSKI, 2008; STIRNEMANN *et al.*, 2012).

A relação entre alterações no gene *GBA* e a DP foi descoberta ao acaso, devido ao grande número de indivíduos pertencentes a famílias com doença de Gaucher que apresentavam DP (TAYEBI *et al.*, 2003; VÁRKONYI *et al.*, 2003). Essa associação levou pesquisadores a investigarem a presença de mutações no gene *GBA* nesses indivíduos.

Em 2004, foi realizado o primeiro estudo envolvendo o rastreamento de mutações no gene *GBA* em pacientes com DP (LWIN *et al.*, 2004) e os achados desse estudo apontaram um aumento da incidência de mutações no gene *GBA* em indivíduos com DP (21%). Além disso, verificou-se que os portadores de mutações neste gene manifestavam a doença de Parkinson mais precocemente. Dessa forma, os achados de Lwin e colaboradores (2004) reforçam a hipótese da relação entre mutações no gene *GBA* e a DP.

Após esse estudo, diversos grupos de pacientes com DP foram investigados em relação a mutações no gene *GBA* e se verificou uma alta incidência de alterações nesse gene associada à DP. Assim, esses estudos reforçam a hipótese de que mutações no *GBA* constituem fatores de risco comum e significativo para o desenvolvimento da DP em diferentes grupos étnicos (LWIN *et al.*, 2004; AHARON-PERETZ *et al.*, 2004; CLARK *et al.*, 2007; GAN-OR *et al.*, 2008; SIDRANSKY *et al.*, 2009; NEUMANN *et al.*, 2009; LESAGE *et al.*, 2011; MORAITOU *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; ASSELTA *et al.*, 2014; BANDRÉS-CIGA *et al.*, 2016; TÖRÖK *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2018).

Até o momento, foram identificadas mais de 300 mutações no gene *GBA*, classificadas como mutações sem sentido, de sentido trocado, inserções e deleções de um ou mais nucleotídeos (SCHAPIRA, 2015; HRUSKA *et al.*, 2008, O'REGAN *et al.*, 2017). Além de mutações provenientes de recombinações entre o gene *GBA* e seu pseudogene *GBAP* (HRUSKA *et al.*, 2008). As mutações no gene *GBA* podem ser classificadas como brandas, graves, nulas e recombinantes. As brandas resultam em uma pequena diminuição na atividade da enzima glicocerebrosidase (GAN-OR *et al.*, 2008) as graves são consequência de uma enzima não funcional e as nulas estão relacionadas com a não produção desta proteína (SIDRANSKY, 2004). As mutações recombinantes resultam do alto grau de homologia e da proximidade na qual o gene *GBA* e seu pseudogene se encontram. A recombinação pode surgir devido a eventos

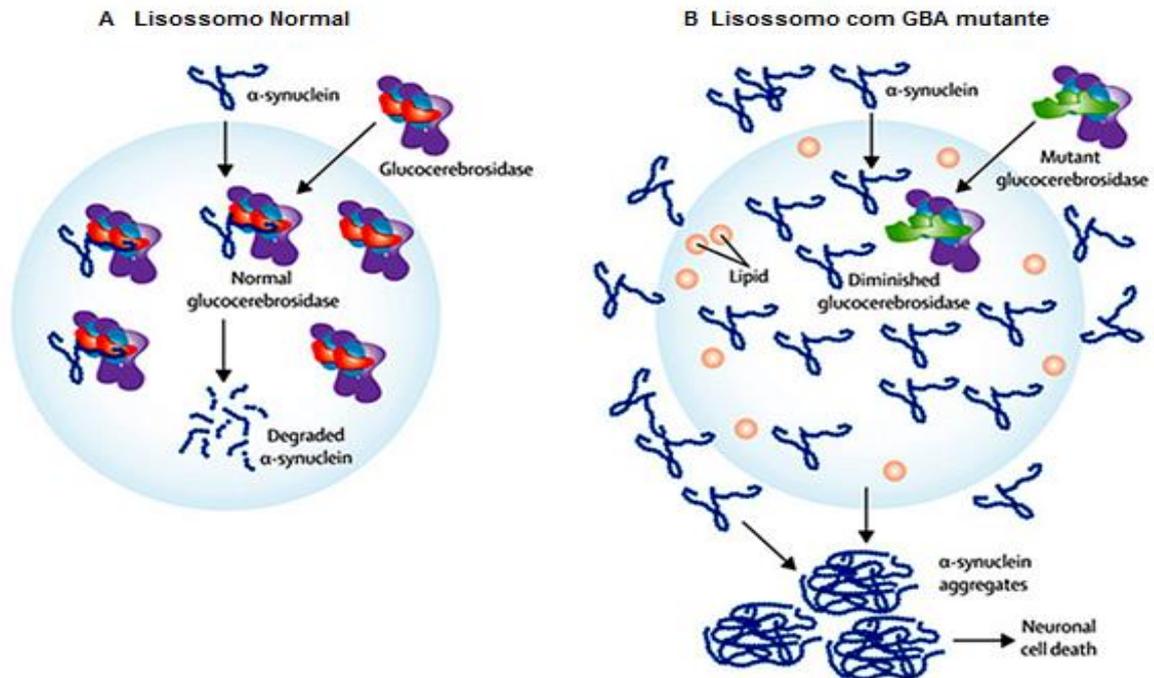
de conversão do gene funcional ou por *crossing over* desigual entre o gene e o pseudogene. Os sítios de recombinação são variáveis, podendo ocorrer desde o intron 2 até o exon 11 (HRUSKA *et al.*, 2008).

Entre as mutações mais frequentes observadas em todos os grupos étnicos, destacam-se a L444P e N370S, classificadas como grave e branda, respectivamente, as quais representam 70% de todos os alelos *GBA* mutados em pacientes com DP (SWAN e SAUNDERS-PULLMAN, 2013). Assim, variantes comuns no gene *GBA* são frequentemente identificadas, sendo esse considerado um importante fator genético de susceptibilidade, que aumenta expressivamente o risco de desenvolvimento da DP, com penetrância acentuadamente incompleta ou reduzida, pois nem todos os portadores de mutações nesse gene desenvolvem parkinsonismo (GOKER-ALPAN *et al.*, 2004; SIDRANSKY E HART 2012; ANHEIM *et al.*, 2012; SWAN E SAUNDERS-PULLMAN, 2013; DOMINGOS E KLEIN, 2018).

As mutações em *GBA* parecem ser mais comuns em indivíduos com histórico familiar de DP, em comparação com casos esporádicos, e estudos relatam que a penetrância das mutações em casos familiares aumenta de 7,6% em indivíduos com 50 anos para 29,7% em pessoas com idade igual ou superior a 80 anos (ANHEIM *et al.*, 2012). Dessa forma, o risco específico por idade de 1,5% aos 50 anos e 7,7% aos 80 anos para os portadores de mutações heterozigotas (ALCALAY *et al.*, 2014).

Embora os mecanismos moleculares pelos quais o *GBA* influencia a patogênese da DP não tenham sido totalmente elucidados, evidências crescentes apontam que o risco aumentado de DP em portadores de mutações neste gene é devido à diminuição da função da glicocerebrosidase (ALCALAY *et al.*, 2015). Tem sido sugerido, que a glicocerebrosidase mutante ou ausente pode afetar a degradação lisossômica da alfa-sinucleína, comprometendo a capacidade do lisossomo funcionar normalmente, resultando, assim, em maior risco de desenvolvimento da DP (Figura 7) (SIDRANSKY E LOPEZ, 2012; ALCALAY *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos exatos que promovem essa interação permanecem obscuros.

Figura 6. Relação patogênica entre o *GBA* e a alfa-sinucleína no desenvolvimento da doença de Parkinson



- (A) Funcionamento normal da interação entre a alfa-sinucleína e a glicocerebrosidase levando ao funcionamento normal do lisossomo. (B) Quando a glicocerebrosidase está mutada, a célula é incapaz de degradar alfa-sinucleína, levando ao comprometimento lisossômico e ao acúmulo dessa proteína, favorecendo a morte celular e o desenvolvimento de parkinsonismo. Fonte: Adaptado de SIDRANSKY E LOPEZ, 2012.

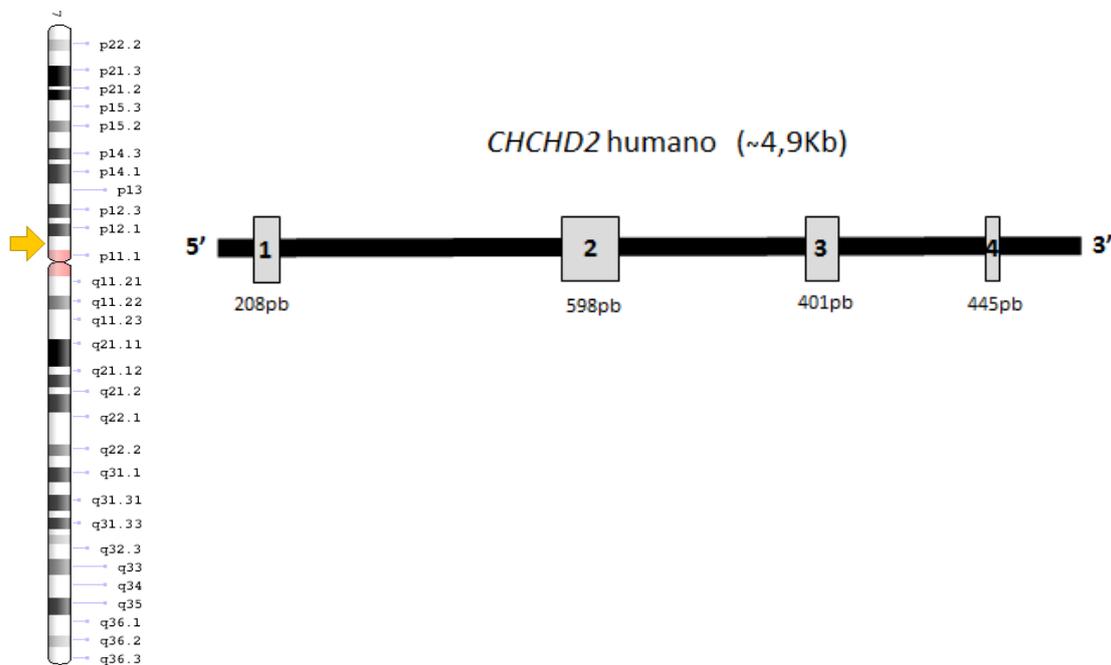
Diferentes modelos funcionais têm sido conduzidos buscando compreender a influência de mutações no gene *GBA* no desenvolvimento da doença de Parkinson. Utilizando cultura de células de neuroblastoma e camundongos transgênicos expressando alfa-sinucleína, estudos mostraram que a inibição da glicocerebrosidase induz o acúmulo dessa proteína (MANNING-BOĞ *et al.*, 2009) e a mutação L444P, em heterozigose, reduz a degradação da alfa-sinucleína ocasionando seu acúmulo, exacerbando os déficits motores e gastrointestinais em modelos de ratos (FISHBEIN *et al.*, 2014). Subsequentemente, dois estudos foram realizados, utilizando modelo mutante de *Drosophila*, e foi observado uma redução nos níveis de atividade da glicocerebrosidase, exibindo um déficit motor (DAVIS *et al.*, 2016). De forma semelhante, Sanchez-Martinez e colaboradores (2016) criaram um modelo mutante em *Drosophila*, porém, ao invés de realizarem a deleção total dos genes endógenos, geraram uma série de linhagens de *Drosophilas* expressando o gene *GBA* humano selvagem ou o *GBA* mutante, carregando as mutações N370S ou L444P.

Eles observaram que *Drosophila* portadoras das mutações N370S ou L444P desenvolviam perda neural dopaminérgica e déficits locomotores progressivos, sendo estes possíveis indicadores da contribuição dessas mutações para o desenvolvimento da DP em humanos (SANCHEZ-MARTINEZ *et al.*, 2016).

#### 1.4.2 Gene *CHCHD2*

O gene *coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing 2* (*CHCHD2*; OMIM 616244), localizado em 7p11.2, apresenta 4 exons (Figura 7) e codifica a proteína *CHCHD2*, com 151 aminoácidos, pertencente a uma classe de proteínas mitocondriais envolvidas na biogênese e regulação de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (ARAS *et al.*, 2015).

Figura 7. Representação esquemática da estrutura do cromossomo 7 e da localização do gene *CHCHD2*



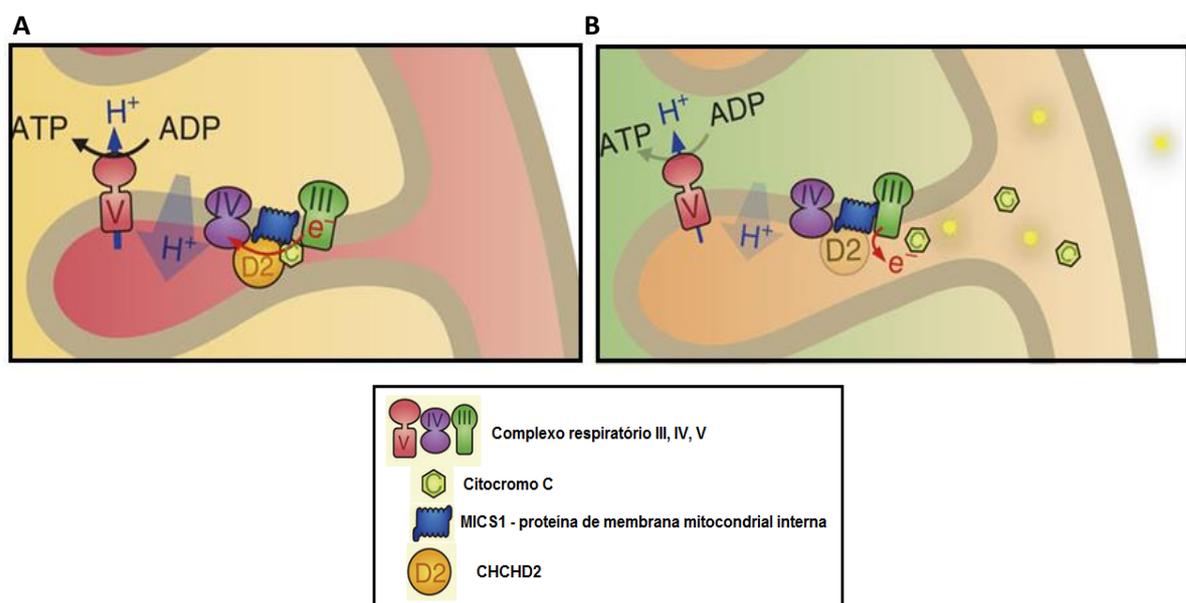
As caixas com números representam os exons do *CHCHD2*, separadas por introns. Fonte: Adaptado de FUNAYAMA *et al.*, 2015.

Entre as funções da proteína *CHCHD2* destacam-se a regulação do metabolismo mitocondrial, o controle do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla na língua inglesa), a regulação da atividade da citocromo C oxidase (COX)

(ARAS *et al.*, 2015) Além disso, esta proteína age como um fator antiapoptótico, mediado por mitocôndrias (FUNAYAMA *et al.*, 2015).

Em 2017, Meng e colaboradores, utilizando cultura de células e modelo animal transgênico de *Drosophila*, observaram que células que possuíam baixa expressão da proteína CHCHD2, apresentam uma diminuição na atividade da citocromo C oxidase, o qual exerce uma importante função durante a fosforilação oxidativa. A CHCHD2, junto à proteína de membrana mitocondrial interna 1 (MICS1, sigla na língua inglesa), estabilizam a COX para manter o fluxo normal de elétrons durante a fosforilação oxidativa (Figura 8). Quando a função da citocromo C oxidase está comprometida, o fluxo de elétrons do complexo III para o complexo IV é prejudicado, gerando um extravasamento de elétrons que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, que constituem uma das principais causas de estresse oxidativo (Figura 8) (ARAS *et al.*, 2015, MENG *et al.*, 2017).

Figura 8. Modelo da proteína CHCHD2 nas mitocôndrias



(A) A CHCHD2 junto à proteína MICS1, presente na membrana mitocondrial, estabilizam a COX para manter o fluxo normal de elétrons durante a fosforilação oxidativa. (B) Ausência de CHCHD2 desestabiliza COX na cadeia respiratória, o que causa um extravasamento de elétrons e geração de ROS. Fonte: adaptado de MENG *et al.*, 2017.

#### 1.4.2.1 Mutações no gene *CHCHD2* e a DP

A associação de mutações no gene *CHCHD2* e a DP foi identificada por Funayama e colaboradores (2015) em quatro famílias japonesas com DP segregando de forma autossômica dominante. Utilizando estudos de associação genômica, esses autores identificaram duas mutações *missense* (182C>T (T61I) no exon 2) e (434G>A (R145Q), no exon 3) e uma mutação em sítio de *splicing* (300 + 5G>A) (FUNAYAMA, *et al.*, 2015). Subsequentemente Shi e colaboradores (2016), identificaram em probandos chineses com DP a variante patogênica c.182C>T (T61I), além de cinco variantes já descritas (c.-11G>A, c.-9T>G1, c.5C>T, c.51-127G>A, c.456+125G>A), e consideraram a variante C.5C>T (P2L) como um fator de risco para a DP esporádica em populações chinesas (SHI *et al.*, 2016).

Mediante esses achados, outros estudos foram conduzidos para validar o papel do gene *CHCHD2* na susceptibilidade à DP em diferentes grupos étnicos, como em pacientes chineses (FOO *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2016), canadenses (ZHANG *et al.*, 2016), italianos (GAGLIARDI *et al.*, 2016; RUBINO *et al.*, 2017), espanhóis (TEJERA-PARRADO *et al.*, 2016), taiwaneses (FAN *et al.*, 2016), populações do oeste europeu (JANSEN *et al.*, 2015), alemães (KOSCHMIDDER *et al.*, 2016) e norte-americanos, poloneses e irlandeses (OGAKI *et al.*, 2015). No entanto, a maioria dos estudos fracassou em identificar variantes patogênicas ou de risco nas populações analisadas.

Recentemente, Tio e colaboradores (2017) realizaram estudos funcionais em modelo transgênico de *Drosophila* e demonstraram que as variantes R145Q e T61I são patogênicas e ocasionam disfunção proteica em diferentes níveis, gerando a desregulação do metabolismo mitocondrial, que afeta a sobrevivência e a função neuronal. Além disso, mostraram que a variante 5C>T, Pro2Leu é um fator de risco, possivelmente associado à DP esporádica (TIO *et al.*, 2017).

Até a realização do presente estudo, inexistem análises moleculares do gene *CHCHD2* em pacientes com DP em populações latino-americanas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da doença de Parkinson ser um dos distúrbios de movimento que mais acomete idosos, esta também tem sido observada precocemente e pouco se sabe da influência de fatores genéticos na predisposição à doença.

Ainda que diversos estudos tenham relatado à associação de alterações gênicas em pacientes com DP, existem inúmeros resultados controversos, o que justifica a necessidade de novas investigações.

Assim, considerando a escassez de estudos no Brasil e em populações latino-americanas, este trabalho visa contribuir para o preenchimento da lacuna existente no que tange à associação de mutações nos genes *GBA* e *CHCHD2* e suas possíveis relações com a DP em uma amostra de pacientes da população brasileira, caracterizada por sua alta miscigenação étnica. Além disso, o conhecimento da influência desses fatores genéticos, permitirá estabelecer um perfil de variações próprias da nossa população, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce, redução da morbidade nos afetados e dos custos para saúde pública.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo realizar o rastreamento de variantes em toda extensão dos genes *GBA* e *CHCHD2*, a fim de verificar a possível relação com o desenvolvimento da doença de Parkinson.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de mutações no gene *GBA* em amostras de pacientes com DP e controles saudáveis;

- Identificar a presença de mutações no gene *CHCHD2* em amostras de pacientes com DP familiar, compatível com herança autossômica dominante;

- Realizar o estudo comparativo das frequências genotípicas e alélicas nos genes *GBA* e *CHCHD2* entre os indivíduos com a doença de Parkinson e indivíduos controles saudáveis, gerando dados relativos à frequência de variantes gênicas encontradas e analisar comparativamente nossos achados com outros estudos realizados em diferentes grupos étnicos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Todos os participantes deste estudo foram provenientes de ambulatórios de Neurologia e Distúrbio do Movimento de: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC/UFRJ), Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE), Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro (SCMRJ), Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP/UFF), Instituto Integrado de Neurociências de Goiânia (IINEURO/GO) e Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV/UFAM). Os pacientes foram avaliados por neurologistas especialistas em distúrbios de movimento, seguindo os critérios estabelecidos pelo protocolo internacional para a DP – “*The United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank*” (HUGHES *et al.*, 1992). Após serem avaliados nesses centros, os pacientes com DP foram encaminhados ao Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN/UERJ) para coleta de material biológico. Os indivíduos participantes foram esclarecidos com relação aos objetivos da pesquisa e convidados a fazer parte do estudo. A coleta do material biológico para a análise molecular ocorreu mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes e controles (Anexos A e B). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo de pesquisa nº 032.2.2008 – Parecer 001/2016) (Anexo C) e todas as condutas adotadas seguiram as normas éticas do CNS/Ministério da Saúde (Resolução 196/96), que regem as pesquisas envolvendo seres humanos.

Para o gene *GBA*, foram incluídos 304 pacientes com DP, de ambos os sexos (187 homens e 117 mulheres; faixa etária: 15 a 96 anos; média das idades:  $60,0 \pm 12,4$  anos), não aparentados, com idade de manifestação variando de 15 a 79 anos ( $52,0 \pm 12,5$  anos). Dentre eles, 2 apresentaram DP juvenil (manifestação < 20 anos), 137 DP precoce (manifestação < 50 anos) e 162 DP tardia ( $\geq 50$  anos). Em nossa casuística, 115 (37,83%) relatam possuir história familiar da DP, 181 (59,54%) eram casos isolados e 8 (2,63%) não apresentavam informação (Apêndice C).

Para o gene *CHCHD2*, foram incluídos 122 pacientes brasileiros com DP, de ambos os sexos (81 homens e 41 mulheres; faixa etária: 32 a 96 anos; média das idades:  $60,5 \pm 11,1$  anos), não aparentados, com idade de manifestação variando de

18 a 79 anos ( $52,1 \pm 12,0$  anos). Dentre eles, 1 apresentou DP juvenil ( $< 20$  anos), 53 DP precoce ( $< 50$  anos) e 68 DP tardia ( $\geq 50$  anos) (Apêndice E). Os probandos foram classificados como casos familiares por apresentarem um ou mais portadores de DP na família e nenhum deles apresentou mutações em outros genes anteriormente analisados por nosso grupo (ABREU *et al.*, 2016, da SILVA *et al.*, 2017).

Além dos pacientes com DP, um grupo controle foi constituído por 100 indivíduos brasileiros saudáveis, residentes no Estado do Rio de Janeiro, de ambos os sexos, totalizando 53 homens e 47 mulheres, de faixa etária entre 50 e 95 anos (média de idades:  $65,84 \pm 9,97$  anos) (Apêndice F).

#### 4.2 Coleta do material biológico

Para a análise molecular, o DNA dos pacientes foi obtido a partir de sangue periférico ou saliva. A coleta de sangue foi realizada a partir de 5 mL de sangue periférico, armazenados em tubos *vacutainer*, contendo anticoagulante *EDTA* (ácido etilenodiamino tetra-acético). A saliva foi coletada em um frasco coletor do *Kit ORAGENE™ DNA self-collection* (DNAGenotek, Canada), delicadamente misturada, e mantida à temperatura ambiente. As recomendações dadas aos pacientes antes da coleta de saliva foram não beber, comer ou fumar nos 30 minutos anteriores ao procedimento.

#### 4.3 Extração de DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico compreenderam várias etapas que incluíram a lise celular, extração de proteínas do RNA e precipitação do DNA. Todas as amostras de DNA foram extraídas a partir de uma alíquota de sangue periférico ou saliva, utilizando os kits comerciais *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Wisconsin, EUA) para sangue periférico e o *ORAGENE™DNA* para saliva, ambos seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, uma alíquota da solução final contendo DNA de cada paciente foi encaminhada para a Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO e as demais alíquotas foram estocadas em microtubos de 1,5 mL a 4°C e -20°C no SERVOGEN - UERJ.

#### 4.4 Ensaio molecular

O ensaio molecular foi realizado em três instituições colaboradoras: Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN), situado no Campus do Maracanã/RJ, Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy (UNIGRANRIO), situado no Campus de Duque de Caxias/RJ e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), situado no Campus de Manguinhos/RJ.

##### 4.4.1 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

A integridade das amostras de DNA foi avaliada com a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1 % (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) diluída em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare, EUA*), ácido bórico 89 mM (*MERCK, Alemanha*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare, EUA*)]. No preparo das amostras para corrida da eletroforese, foram adicionados 3 µL da alíquota de DNA e 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (*GE Healthcare, EUA*); xileno cianol 0,25% (*GE Healthcare, EUA*); glicerol 30% (*ISOFAR*)], 1 µL de *GelRed™* previamente diluído em 500 µL de água destilada (*Uniscience*).

Essa etapa foi realizada em cuba horizontal [MS 250V Power Supply (*Major Science*)], a 70 V por 45 minutos, utilizando como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare, EUA*), ácido bórico 89 mM (*MERCK, Alemanha*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare, EUA*)]. Após a eletroforese, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação L-Pix® Ex (*Loccus Biotecnologia, Brasil*). A integridade e intensidade da banda apresentada pelas amostras de DNA genômico foram comparadas com um padrão de DNA de Bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) de 100 ng/µL.

A fim de estimar a concentração de DNA das amostras e seu grau de pureza foi utilizado de um espectrofotômetro, modelo *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) ou *Denovix DS-11* (*Uniscience, EUA*), configurado para ácidos nucleicos de fita dupla (modo *doublestrand*). O preparo das amostras foi realizado com 1 µL da alíquota de DNA. Como branco, na calibração do equipamento, foi utilizado o tampão TE [Tris 10 mM (*GE Healthcare, EUA*), HCl (*MERCK, Alemanha*), EDTA 1 mM (*GE Healthcare, EUA*); pH 7,4]. A relação de pureza foi calculada através da razão 260/280, que deve atingir aproximadamente 1,8 e/ou 2,0.

#### 4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada a fim de amplificar a região de interesse dos genes *GBA* e *CHCHD2*.

##### 4.4.2.1 Gene *GBA*

Para avaliar a presença de alterações no gene *GBA* realizamos a amplificação do DNA nos 304 probandos com DP, para todos os 11 exons, através da técnica de PCR, seguida por sequenciamento automático.

A amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes aos 11 exons, assim como das regiões de limite exon/intron, que incluem sítios doadores e receptores de encadeamento, foi realizada com o emprego de 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) (Tabela 2). Todas as reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, em fluxo laminar vertical, sob condições de plena assepsia, seguindo as condições e reagentes descritos na Tabela 3. A PCR foi realizada em um termociclador *Veriti 9902 (Thermo Fisher Scientific, EUA)* e os parâmetros de ciclagem (desnaturação inicial, ciclos de desnaturação, pareamento e extensão) constam na Tabela 4.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos 11 exons do gene *GBA*

Exons	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento amplificado (pb*)	Referência
1 ao 4	F 5' CCTAAAGTTGTCACCCATAC 3' R 5' GCAGAGTGAGATTCTGCCTC 3'	1.895	
5 ao 7	F 5' GACCTCAAATGATATACCTG 3' R 5' AGTTTGGGAGCCAGTCATTT 3'	2.049	MITSUI <i>et al.</i> , 2009
8 ao 11	F 5' TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG 3' R 5' ACCACCTAGAGGGGAAAGTG 3'	1.682	

\*pb = pares de base; F= Foward e R= Reverso.

Tabela 3. Condições utilizadas na amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons 1-4, 5-7 e 8-11 do gene *GBA*

Reagentes	Exons		
	1-4	5-7	8-11
Tampão de reação (10X)	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0 mM	3,0 mM	2,0 mM
dNTP (5 mM)	300 µM	400 µM	200 µM
Oligonucleotídeo F (10 µM)	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Oligonucleotídeo R (10 µM)	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Platinum™ Taq DNA Polimerase (1U/µL)	1,0 U	2,0 U	1,0 U
DNA (~50 ng/µL)	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Volume final	25 µL	25 µL	25 µL

\*10X tampão de PCR, sem Mg (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM). Tampão de Reação, MgCl<sub>2</sub>, platinum™ Taq DNA Polimerase e dNTP (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific, EUA); Oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies).

Tabela 4. Condições de ciclagem utilizadas na PCR dos segmentos do gene *GBA*

Etapas	Exons 1-4	Exons 5-7	Exons 8-11
Desnaturação inicial	94°C – 10 m	94°C – 2 m	94°C – 2 m
Desnaturação	94°C – 30 s	94°C – 30 s	94°C – 30 s
Pareamento	55°C - 1m30s	59°C – 1m30s	61°C – 1m30s
Extensão	72°C – 2 m	72°C – 2 m	72°C – 2 m
Extensão Final	72°C – 10 m	72°C – 10 m	72°C – 10 m

x = número de ciclos; m = corresponde a minutos; s = corresponde a segundos.

#### 4.4.2.2 Gene *CHCHD2*

Para análise molecular dos 4 exons do gene *CHCHD2*, bem como das regiões de limite exon/intron que incluem os sítios doadores e receptores de encadeamento, foi realizada a amplificação dessas sequências pela técnica de PCR, utilizando 4 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (*IDT- Integrated DNA Technologies, EUA*), descritos por Funayama e colaboradores em 2015 (Tabela 5).

Todas as reações de amplificação (Tabela 6) foram realizadas em tubos de 0,2 mL, utilizando o termociclador *Veriti 9902 (Thermo Fisher Scientific, EUA)* e os parâmetros de ciclagem (desnaturação inicial, ciclos de desnaturação, pareamento e extensão) constam na Tabela 7.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos exons do gene *CHCHD2*

Exons	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento amplificado (pb*)	Referência
1	F 5' CCTCCCATCTTCCGGTCTCC 3' R 5' CCTCCCTCTGCGTCATTGC 3'	208	
2	F 5' GGGCAACAAGAGCGAAGC 3' R 5' TGCTGGCCTAAGGCAGTAAC 3'	598	Funayama <i>et al.</i> , 2015
3	F 5' CATCTGGTGCTAGTTCCATTTTCC 3' R 5' TCCGGCCCAGTTGTTAGGAG 3'	401	
4	F 5' GGCCTTTTGTGCTGCTTTC 3' R 5' CTGTCAGATCTGGGAGGATGC 3'	455	

\*pb = pares de base; F= Forward e R= Reverso.

Tabela 6. Condições utilizadas na reação da PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes aos exons do gene *CHCHD2*

Reagentes	Exons 1 - 4
Tampão de reação (10X)	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 mM
dNTP (5mM)	200 µM
Oligonucleotídeo F (10mM)	1,0 mM
Oligonucleotídeo R (10mM)	1,0 mM
Platinum™ Taq DNA Polimerase (1U/µL)	1,0 U
DNA (~ 50 ng/µL)	1,0 µL
Volume final	25 µL

\*10X tampão de PCR, sem Mg (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM). Tampão de Reação, MgCl<sub>2</sub>, platinum™ Taq DNA Polimerase e dNTP (Invitrogen™- Thermo Fisher Scientific, EUA); Oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies).

Tabela 7. Condições de ciclagem utilizadas na PCR dos segmentos do gene *CHCHD2*

Etapas	Exons 1, 2, 3 e 4
Desnaturação inicial	95°C – 5 m
Desnaturação	} x      95°C – 1 m } }            60°C – 1 m } 30x }            72°C – 1 m } }            72°C – 7 m }
Pareamento	
Extensão	
Extensão Final	

x = número de ciclos; m = corresponde a minutos.

#### 4.4.3 Análise dos fragmentos amplificados e do rendimento das reações de PCR

Para análise dos fragmentos amplificados, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) diluído em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare, EUA*), ácido bórico 89 mM (*MERCK, Alemanha*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare, EUA*)]. As amostras foram preparadas com 4 µL da alíquota do produto da reação de PCR, 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (*GE Healthcare, EUA*); xileno cianol 0,25% (*GE Healthcare, EUA*); glicerol 30% (*ISO FAR*)] e 1 µL de *GelRed™* (*Uniscience, EUA*). A eletroforese foi realizada a 75 V por, aproximadamente, 1 hora em cuba horizontal K33-10H (*KASVI*), utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (*GE Healthcare, EUA*), ácido bórico 89 mM (*MERCK, Alemanha*), EDTA 2 mM (*GE Healthcare, EUA*)]. Após a corrida, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação L-Pix<sup>®</sup> Ex (*Loccus Biotecnologia, Brasil*). Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado foi utilizado um padrão de peso molecular 100 Kb DNA ladder (*Invitrogen, EUA*).

#### 4.4.4. Purificação dos produtos da PCR

Antes de serem utilizados na reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram submetidos a uma purificação com a enzima *ExoSAP-IT<sup>®</sup>* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A purificação resulta na remoção de resíduos provenientes dos reagentes empregados na reação de amplificação.

#### 4.4.5. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos purificados foram realizadas com o *kit Big Dye Terminator V3.1* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*). A condição final na qual as reações foram conduzidas foi a mesma para as onze regiões do gene *GBA* analisadas e para as quatro do gene *CHCHD2*. O preparo da amostra foi realizado com 50 ng do DNA purificado; 3,2 pmol do oligonucleotídeo senso ou antisenso para cada exon separadamente (Tabelas 8 e 9, respectivamente); 1 µL de tampão de sequenciamento (5X) (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), 0,5 µL do Kit (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) e água deionizada (MilliQ) para um volume final de 10 µL de reação. As reações foram realizadas em uma placa contendo 96 poços [*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (*Thermo Fisher Scientific, EUA*)] e conduzidas ao termociclador Veriti modelo 9902 (*Thermo Fisher Scientific, EUA*), seguindo as condições de ciclagem apresentadas na Tabela 10.

Tabela 8. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos 11 exons do gene *GBA*

Exons	Senso	Antisenso	Tamanho do fragmento amplificado (pb*)
1	5' TAGTGGATCCTCTATCCTTC 3'	5' AAATCCAGTGCCAGGATTC3'	161
2	5' AAAGGCAGCTAAGCCCTGCC 3'	5' GCTACCAAAGGACTATGAGG 3'	238
3	5' AGTCTCTCCTAGCAGATGTG 3'	5' TCCATGGTGATCACTGACAC 3'	343
4	5' AAATGGTGTGAGTGATCACC 3'	5' GCAGAGTGAGATTCTGCCTC 3'	315
5	5' GCAAGTGATAAGCAGAGTCC 3'	5' CAAGCAGACCTACCCTACAG 3'	282
6	5' AATGGCTGAACCGGATGCAC 3'	5' AAGTGGAACTAGGTTGAGGG 3'	342
7	5' TCAAGTGATCCACCTGCCTC 3'	5' AGTTTGGGAGCCAGTCATTT 3'	426
8	5' TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG 3'	5' GCTTCTGTCAGTCTTTGGTG 3'	340
9	5' ACCCTTACCTACACTCTCTG 3'	5' GTGATGTAAGCCATCCGATG 3'	249
10	5' GGGTGACTTCTTAGATGAGG 3'	5' AGCTGAGAGTGTGATCCTGC 3'	263
11	5' GGAAGTGGGCTGAAGACAGC 3'	5' TTAGTCACAGACAGCGTGT 3'	259

\*pb = pares de base.

Tabela 9. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos 4 exons do gene *CHCHD2*

Exons	Senso	Antisenso
1	5' CCTCCCATCTCCGGTCTCC 3'	5' CCTCCCTCTGCGTCATTGC 3'
2	5' GGGCAACAAGAGCGAAGC 3'	5' TGCTGGCCTAAGGCAGTAAC 3'
3	5' CATCTGGTGCTAGTTCCATTTTCC 3'	5' TCCGGCCCAGTTGTTAGGAG 3'
4	5' GGCCTTTTGTGCTGCTTTC 3'	5' CTGTCAGATCTGGGAGGATGC 3'

Tabela 10. Condições de ciclagem utilizadas para o sequenciamento automático dos genes *GBA* e *CHCHD2*

Etapas	Sequenciamento
Desnaturação inicial	96°C – 1 m
Desnaturação } Pareamento } x	96°C – 10 s } 50°C – 15 s } 15x
Extensão }	60°C – 1m15 s }
Desnaturação } Pareamento } x	96°C – 10 s } 50°C – 15 s } 5x
Extensão }	60°C – 1m30 s }
Desnaturação } Pareamento } x	96°C – 10 s } 50°C – 15 s } 5x
Extensão }	60°C – 2 m }

x = número de ciclos; s = segundos; m = minutos.

Após a ciclagem, o excesso de reagentes não incorporados na reação foi removido através da precipitação dos produtos de sequenciamento. Para isso, foram adicionados ao produto da reação 80 µL de isopropanol 75% e em seguida, a placa foi centrifugada a 2300 g por 50 minutos (*Thermo Fisher Scientific, EUA*). O sobrenadante foi descartado e a placa com as amostras precipitadas foi centrifugada em posição invertida a 700 g por 1 minuto, sendo posteriormente levada ao termociclador *Veriti 9902 (Thermo Fisher Scientific, EUA)* por 5 minutos a 75°C para secagem. Em seguida, o material precipitado foi ressuspense em 10 µL de formamida *Hi Di (Thermo Fisher Scientific, EUA)* e levado ao termociclador por 5 minutos a 95°C para desnaturação. A placa com as amostras foi novamente centrifugada a 700 g por 1 minuto e inserida no sequenciador *ABI Prism 3130 (Life Technologies)* para o processamento das amostras.

#### 4.5 Análise das sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sistema de sequenciamento, foram analisados com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (Isis Pharmaceuticals)*. As sequências obtidas foram alinhadas com o fragmento correspondente à sequência selvagem dos genes *GBA* e *CHCHD2*, acessando o banco de dados online, *Ensembl* (ENST00000368373.7 e ENST00000395422.3, respectivamente). Os indivíduos que apresentaram alteração em suas sequências tiveram o seu DNA novamente analisado, a partir de uma nova alíquota de DNA.

##### 4.5.1 Ferramentas eletrônicas

Com base na publicação “*Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*” (RICHARDS *et al.*, 2015), utilizou-se os critérios para classificação das variantes identificadas no presente estudo.

As ferramentas *in silico* comumente utilizadas para interpretação de variantes *missense* incluem três ferramentas (*PolyPhen-2*, *SIFT*, e *MutationTaster*) (RICHARDS *et al.*, 2015). Esses programas consideram alguns parâmetros para classificar as mutações como patogênicas ou neutras, prevendo o efeito na função e estrutura da proteína. Para avaliar o impacto das variantes intrônicas em sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA, utilizou-se a ferramenta eletrônica *Splicing finder*.

O programa *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) prevê o efeito do risco associado à substituição de aminoácidos, baseado em conservações evolutivas, diferenças físico-químicas e características estruturais de proteína. Compara a propriedade do alelo selvagem em relação às propriedades do mutado. Classifica essas alterações como patogênicas (alterações que afetam a estrutura e a função da proteína) ou neutras (alterações que não causam efeito perturbador na função ou na estrutura proteica) (ADZHUBEI *et al.*, 2010).

A ferramenta *SIFT* (*Intolerant Sorting From Tolerant* - <http://sift.jcvi.org/>) prediz se a substituição de um único aminoácido afeta a função proteica. Para tal, utiliza homologias de sequências e fornece um *score* que prediz se a mutação pode ser classificada como deletéria ou neutra. Uma substituição pode ser classificada como

neutra ou deletéria de acordo com *score* apresentado, sendo valores menores que 0,05 reconhecidas como alterações deletérias e acima previstas como neutras (NG E HENIKOFF, 2001).

O programa *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org/>) avalia as variantes da sequência de DNA quanto ao seu potencial causador de doenças. O algoritmo realiza diversos testes *in silico* para estimar o impacto da variante na função e estrutura da proteína e também avaliam a conservação evolucionária. Além disso, ele não está limitado a substituições de aminoácidos únicos, mas também pode manipular variantes sinônimas e intrônicas (SCHWARZ *et al.*, 2010).

A ferramenta *Splicing finder* (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>) prevê os efeitos de mutações nos sítios de *splicing* em qualquer sequência humana (DESMET *et al.*, 2009).

#### 4.6 Análise estatística

Após a análise molecular dos genes *GBA* e *CHCHD2*, a frequência de mutações identificadas nos pacientes com DP foi comparada com a frequência identificada na amostra controle de indivíduos saudáveis através Qui-Quadrado ( $X^2$ ) e feitas as estimativas do risco relativo através do cálculo dos *Odd-Ratios* (ORs). Todas as inferências estatísticas foram feitas ao nível de significância de 5%. Estas análises foram realizadas com o auxílio dos programas computacionais EXCEL e SPSS.v.22.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise descritiva do gene *GBA*

A triagem de mutações no gene *GBA* foi conduzida em 304 probandos, não aparentados, de ambos os sexos, com DP esporádica ou familiar. Dentre estes pacientes, o número de casos esporádicos (181) foi maior do que o número de casos com história familiar da doença (115), sendo a idade de manifestação média de 52,0 ± 12,5 anos (Tabela 11).

Tabela 11. Dados gerais sobre a amostra de pacientes com DP analisada para o gene *GBA*

Variáveis	Amostra
Número de casos	304
Faixa etária (anos)	15 a 96
Média das idades (anos)	60,0 ± 12,4 <sup>†</sup>
Idade de manifestação (anos)	15 a 79
Idade de manifestação média (anos)	52,0 ± 12,5 <sup>†</sup>
Número de casos com história familiar de DP (%)	115 (37,83)
Número de casos com DP esporádicos (%)	181 (59,54)
Número de casos não informados (%)	8 (2,63)

<sup>†</sup>Os valores representam média ± desvio padrão.

A Tabela 12 mostra a comparação realizada entre os gêneros, sendo observado um maior número de homens do que o de mulheres, tanto nos casos de DP familiar quanto entre os isolados. Em relação às idades média e à média de idades de manifestação, apesar delas serem menores entre os homens, essas diferenças não foram significativas.

Tabela 12. Dados relativos ao gênero entre os pacientes com doença de Parkinson

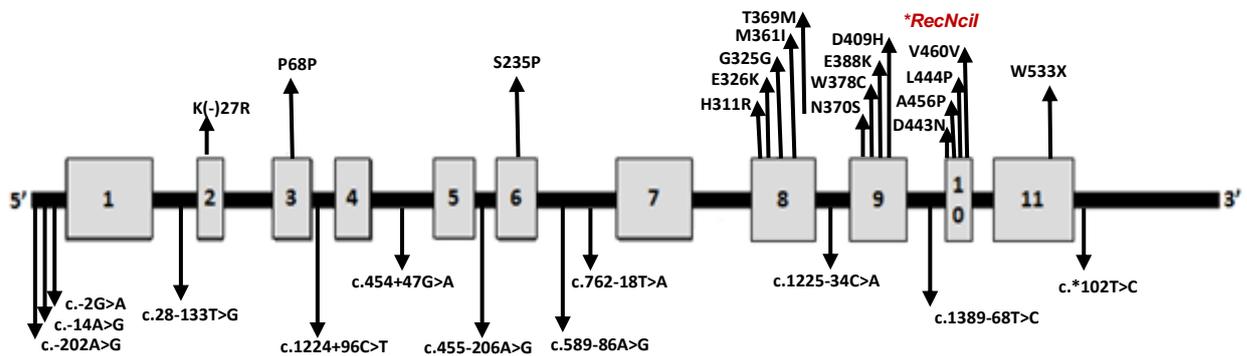
Variáveis	Masculino	Feminino	<i>P</i>
Número de casos (%)	187 (61,5)	117 (38,5)	0,000
Casos familiares (%)	73 (63,5)	42 (36,5)	0,040
Casos isolados (%)	109 (57,6)	72 (42,4)	0,045
Média de idades (anos)	59,4 ± 12,5 <sup>†</sup>	61,8 ± 12,1 <sup>†</sup>	0,483
Idade de manifestação média (anos)	51,6 ± 12,9 <sup>†</sup>	52,8 ± 13,3 <sup>†</sup>	0,573

<sup>†</sup>Os valores representam média ± desvio padrão. *P* = ≤ 0,05: diferenças estatísticas significantes.

## 5.2 Análise molecular do gene *GBA*

Realizamos a análise molecular dos 11 exons e de regiões de limite éxon/intron do gene *GBA* em 304 probandos com DP. Nesses pacientes, foram identificadas 29 alterações: 17 variantes exônicas, 8 variantes intrônicas, 3 na região 5' *UTR* e 1 na região 3' *UTR*. Não foram encontradas alterações nos exons 1, 4, 5 e 7, assim como nos introns 2, 7 e 10 (Figura 10).

Figura 9. Representação do gene *GBA* e as principais alterações identificadas nos pacientes com DP



As caixas com números no seu interior representam os exons e os espaços entre elas os introns. \*Alelo recombinante *RecNcil* (L444P+A456P+V460V). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.1 Alterações exônicas

Dentre as dezessete variantes exônicas identificadas (Tabela 13), treze foram de sentido trocado (*missense*), três sinônimas e uma variante sem sentido (*nonsense*), além de um alelo recombinante *RecNcil* (L444P+A456P+V460V).

Tabela 13. Variantes evidenciadas na análise molecular do gene *GBA* em pacientes com DP, de acordo com a localização, tipo de mutação, número de pacientes mutados e frequência das variantes em DP

Alteração na sequência			Localização (Exon)	Tipo de mutação	Número de pacientes mutados	Frequência da variante em DP (%)
dbSNP	Mutações <sup>1</sup>	ID/DNA				
rs150466109	K(-)27R	c.38A>G	2	<i>Missense</i>	5	1,6
rs1064644	S196P	c.703T>C	6	<i>Missense</i>	1	0,3
rs78198234	H311R	c.1049A>G	8	<i>Missense</i>	1	0,3
rs2230288	E326K	c.1093G>A	8	<i>Missense</i>	5	1,6
rs149487315	M361I	c.1200G>A	8	<i>Missense</i>	1	0,3
rs75548401	T369M	c.1223C>T	8	<i>Missense</i>	3	1,0
rs76763715	N370S	c.1226A>G	9	<i>Missense</i>	5	1,6
rs76014919	W378C	c.1251G>C	9	<i>Missense</i>	1	0,3
rs1064651	D409H	c.1342G>C	9	<i>Missense</i>	1	0,3
rs149171124	E388K	c.1401G>A	9	<i>Missense</i>	1	0,3
rs75671029	D443N	c.1444G>A	10	<i>Missense</i>	2	0,7
rs421016	L444P	c.1448T>C	10	<i>Missense</i>	5	1,6
rs368060	A456P	c.1483G>C	10	<i>Missense</i>	4	1,3
rs145888253	P68P	c.326G>A	3	Sinônima	2	0,7
rs143222798	G325G	c.1092G>A	8	Sinônima	2	0,7
rs1135675	V460V	c.1497G>C	10	Sinônima	3	1,0
-	W533X	c.1598G>A	11	<i>Nonsense</i>	1	0,3

<sup>1</sup> Mutações no gene *GBA* nomeadas de acordo com [www.hgvs.org/mutnome](http://www.hgvs.org/mutnome), excluindo os primeiros 39 aminoácidos da proteína GBA.

### 5.2.1.1 Variantes *missense* identificadas no gene *GBA*

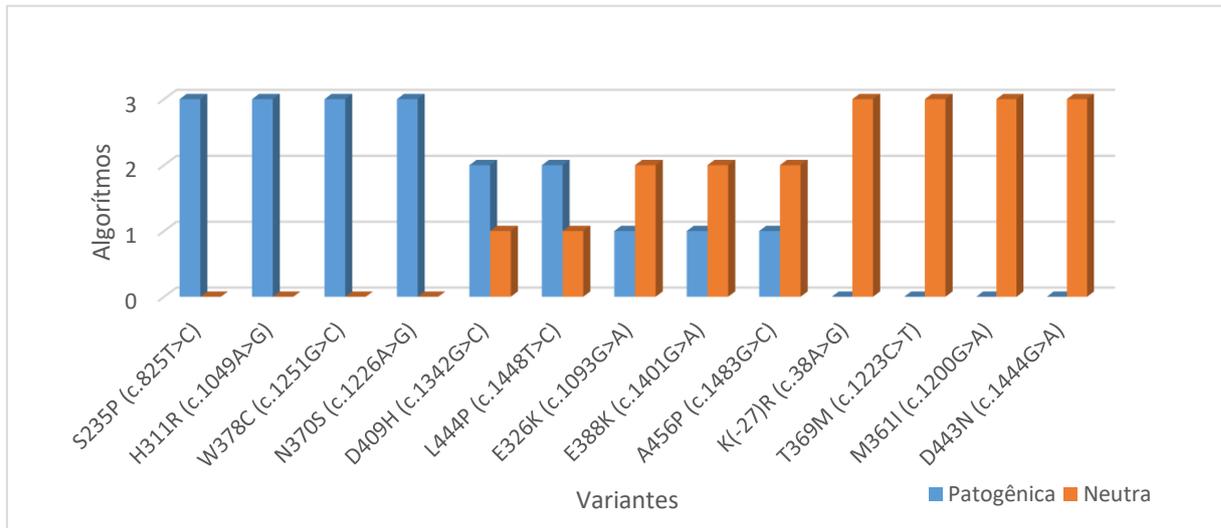
As análises de predição foram conduzidas para todas as treze variantes *missense*, através dos algoritmos *PolyPhen-2*, *SIFT* e *MutationTaster*, sendo identificadas em seis alterações patogênicas (L444P, N370S, D409H, W378C, H311R e S196P) e sete neutras (A456P, D443N, E388K, E326K, T369M, M361I e K(-)27R) (Tabela 14 e Gráfico 1).

Tabela 14. Análise de predição das alterações missense por meio dos programas *Polyphen-2*, *Sift* e *MutationTaster*

Alteração	Análise de predição		
	Proteína ID/DNA	<i>Polyphen-2</i> <sup>(a)</sup>	<i>Sift</i> <sup>(b)</sup>
<b>L444P</b> c.1448T>C	Patogênica	Patogênica	Patogênica
<b>N370S</b> c.1226A>G	Patogênica	Patogênica	Patogênica
<b>D409H</b> c.1342G>C	Patogênica	Neutra	Patogênica
<b>W378C</b> c.1251G>C	Patogênica	Patogênica	Patogênica
<b>H311R</b> c.1049A>G	Patogênica	Patogênica	Patogênica
<b>S196P</b> c.703T>C	Neutra	Patogênica	Patogênica
<b>A456P</b> c.1483G>C	Neutra	Neutra	Patogênica
<b>D443N</b> c.1444G>A	Neutra	Neutra	Neutra
<b>E388K</b> c.1401G>A	Neutra	Neutra	Patogênica
<b>E326K</b> c.1093G>A	Neutra	Neutra	Patogênica
<b>T369M</b> c.1223C>T	Neutra	Neutra	Neutra
<b>M361I</b> c.1200G>A	Neutra	Neutra	Neutra
<b>K(-)27R</b> c.38A>G	Neutra	Neutra	Neutra

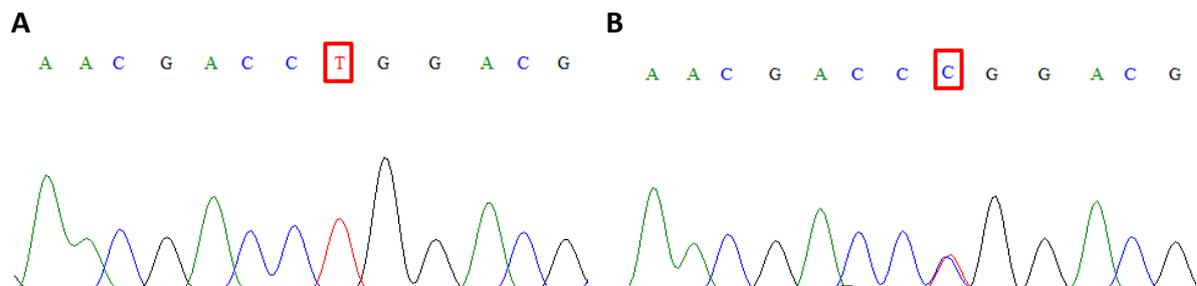
<sup>a</sup>A alteração é classificada como patogênica (*Output* maior que 0,5) ou neutra, com um intervalo de confiança variando de 0 (pouco confiável) a 9 (muito confiável). <sup>b</sup>A alteração é classificada como deletéria (*score* menor que 0,05) ou como tolerável (*score* maior que 0,05). <sup>c</sup> Utiliza o classificador Bayes, *score* é retirado de uma matriz de substituição de aminoácidos. Levando a substituições de *score* de acordo com o grau de diferença entre o original e o novo aminoácido, as pontuações podem variar de 0,0 a 215. Em cinza, as alterações preditas patogênicas em todos os programas.

Figura 10: Frequências das variantes patogênicas e neutras de acordo com os programas *PolyPhen-2*, *SIFT* e *MutationTaster*



No presente estudo, a mutação c.1448T>C (L444P) (Figura10), localizada no exon 10, foi identificada em heterozigose em cinco pacientes com DP (PAR3265, PAR4037, PAR4271, PAR4500/16 e PAR4583/18), sendo quatro casos familiares (Apêndice C). As análises *in silico*, realizadas através dos programas *PolyPhen-2*, *SIFT* e *MutationTaster* (Tabela 14), indicaram que esta alteração diminui a atividade residual da proteína GBA, classificando-a como patogênica. Além disso, essa mutação estava ausente em controles saudáveis (Tabela 17).

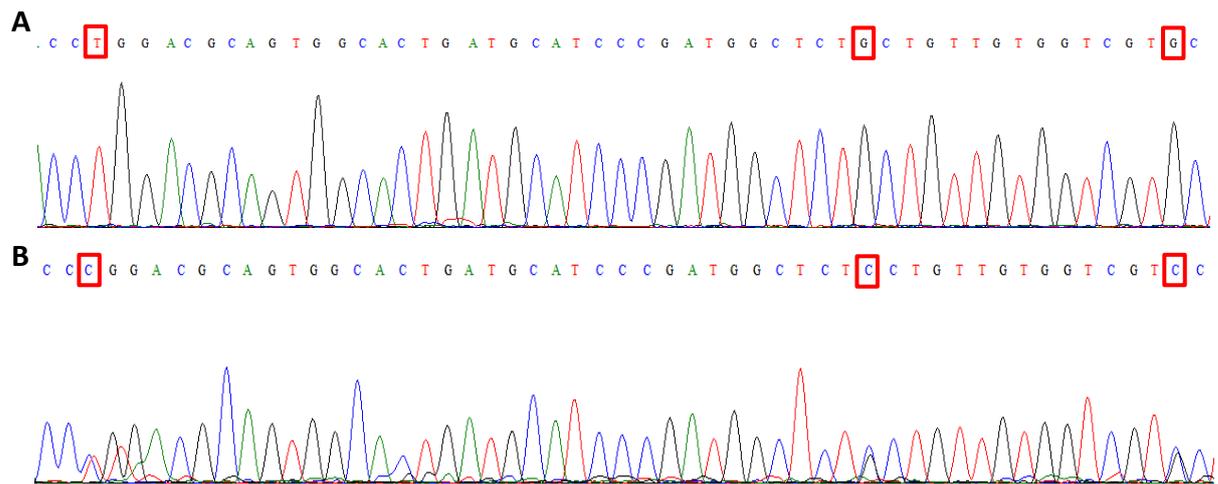
Figura 11. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1448T>C (L444P) no paciente PAR4583/18



**A.** Sequência selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1448T>C (L444P) em heterozigose no exon 10 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre os cinco pacientes que apresentaram a mutação L444P, três (PAR3265, PAR4037 e PAR4271) possuíam também as variantes c.1483G>C (A456P) e c.1497G>C (V460V) (Figura 11). A presença conjunta dessas alterações em um indivíduo constitui o alelo *RecNci*, resultante da recombinação entre o gene *GBA* e seu pseudogene (*GBAP*) (Apêndice C).

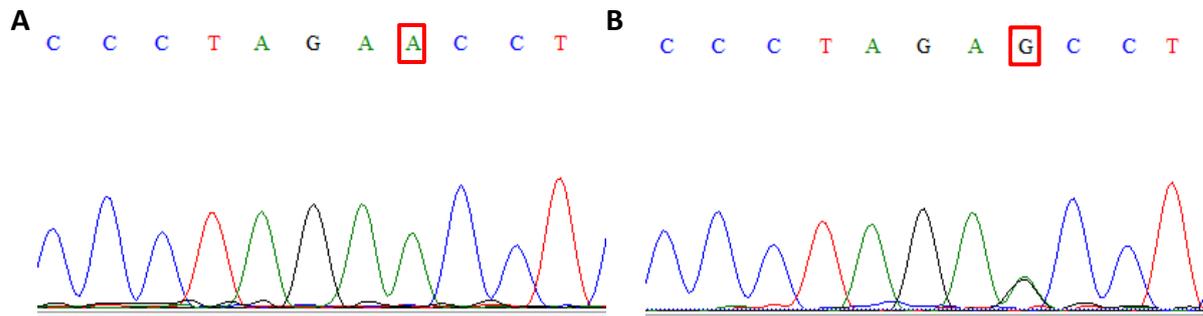
Figura 12. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR evidenciando o alelo *RecNci* no paciente PAR4271/14



**A.** Sequência selvagem do gene *GBA*. **B.** Alterações L444P (c.1448T>C), A456P (c.1483G>C) e V460V (c.1497G>C) – *RecNci* em heterozigose no exon 10 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A mutação c.1226A>G (N370S) (Figura 12), foi observada em cinco pacientes heterozigotos com DP (PAR4043/12, PAR4130/13, PAR4138, PAR4189/13, PAR4574/18). Dentre esses, quatro eram do sexo feminino e um do sexo masculino, e dois relataram possuir história familiar de DP (Apêndice C). Essa mutação estava ausente em indivíduos saudáveis avaliados nesse estudo e três ferramentas de predição a classificaram como patogênica (Tabela 14).

Figura 13. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1226A>G (N370S) no paciente PAR4574/18

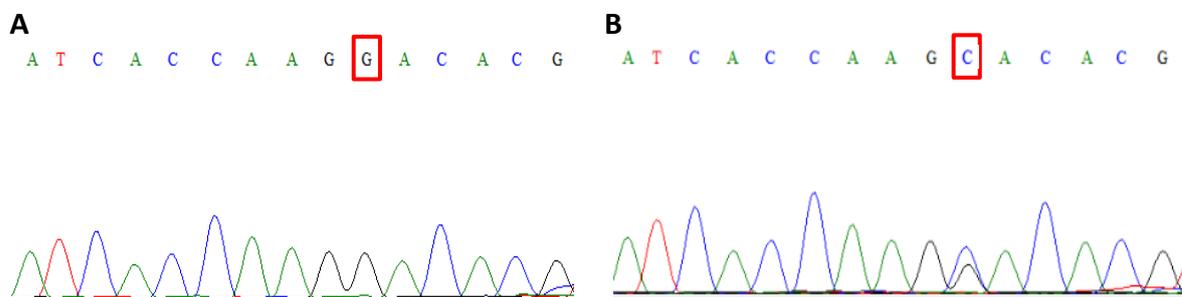


**A.** Sequência selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração N370S (c.1226A>G) em heterozigose no exon 9 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

Uma outra variante, c.1342G>C (D409H), presente no exon 10 (Figura 13), foi observada em um paciente do sexo feminino (PAR4522/17), que manifestou a doença aos 44 anos de idade (Apêndice C).

A análise realizada por três programas de predição apresentou divergência em relação à classificação (Tabela 14), sendo que os programas *Polyphen-2* e *MutationTaster* a classificaram como patogênica. Além disso, essa variante estava ausente em nossa amostra de indivíduos saudáveis (Tabela 17).

Figura 14. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1342G>C (D409H) no paciente PAR4522/17

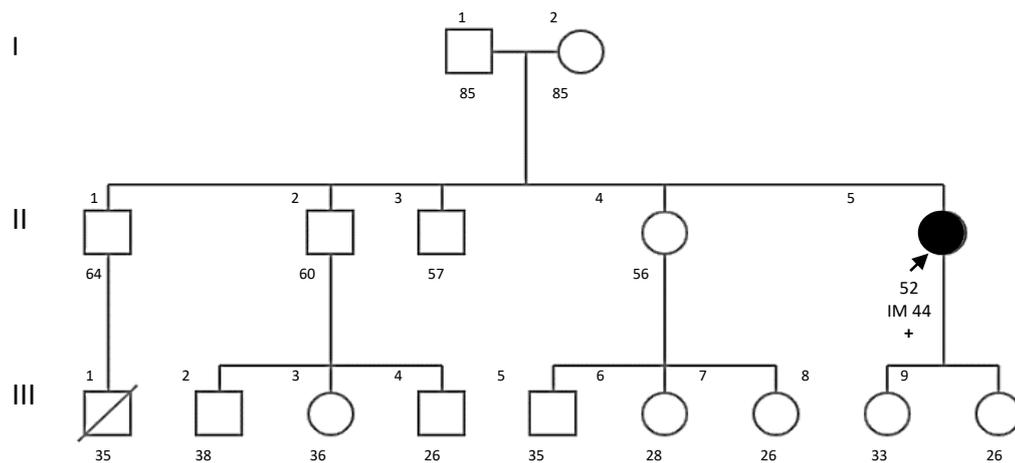


**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1342G>C (D409H) em heterozigose no exon 9 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

O probando (II.5) (Figura 14), heterozigoto para alteração c.1342G>C (D409H), natural do Rio de Janeiro, manifestou tremor em repouso aos 44 anos, quando

estabelecido o diagnóstico de DP. Foi o primeiro a desenvolver a DP em sua família e na sua última avaliação clínica em 2018, aos 52 anos foi observada a presença de tremor em repouso, bradicinesia, instabilidade postural, rigidez, grau acentuado de depressão associado à ansiedade, alteração de voz (hipofonia), congelamento da marcha (*freezing*), alterações do sono e disautonomia (constipação). Nenhuma queixa cognitiva ou alucinações foi relatada, além de distúrbios do olfato, discinesia, distonia e psicose.

Figura 15. Heredograma da família do probando PAR4522/18

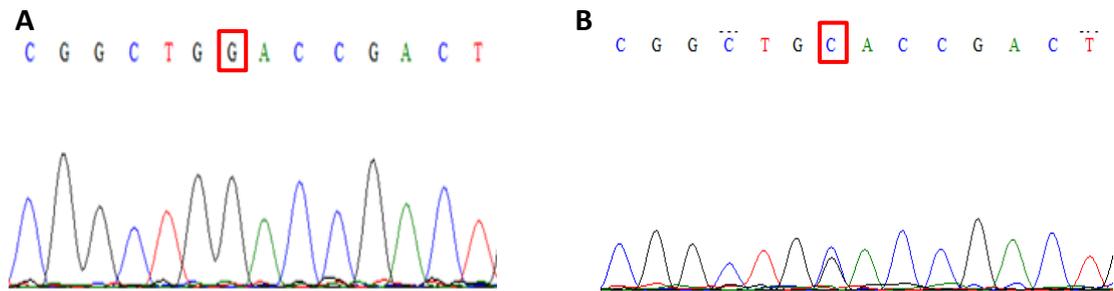


Símbolos pretos completos indicam os indivíduos afetados pela DP. Uma flecha evidencia a probanda. Os números abaixo dos símbolos indicam a idade atual ou a idade da morte (anos); IM = idade de manifestação (anos) da DP. (+) = portador da variante c.1342G>C (D409H). Fonte: elaborado pelo autor.

As variantes c.1251G>C (W378C) e a c.1049A>G (H311R), nunca descritas anteriormente em pacientes com DP, foram classificadas como patogênicas (Tabela 14) e não foram identificadas nos indivíduos saudáveis avaliados nesse estudo (Tabela 17).

A alteração c.1251G>C (W378C) (Figura 15) foi observada em heterozigose em um paciente (PAR2285/09) do sexo feminino, que manifestou DP aos 49 anos, sem história familiar da doença (Apêndice C). Nenhuma informação relativa à família ou a clínica do paciente foi obtida.

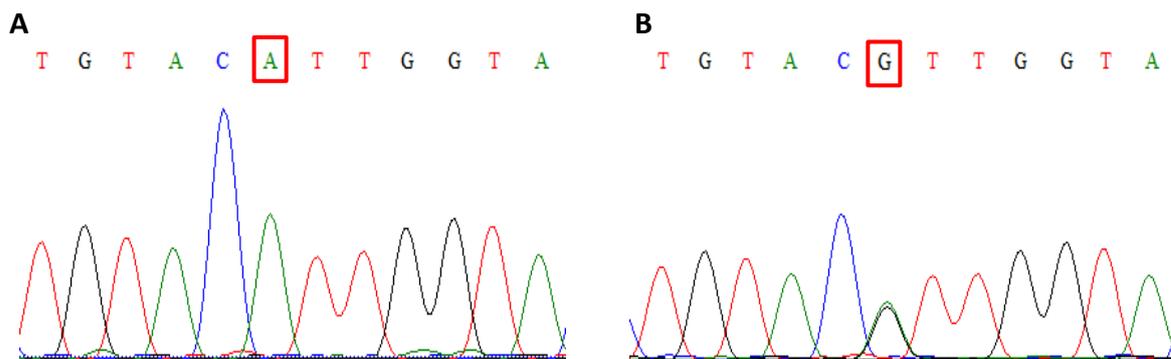
Figura 16. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1251G>C (W378C) no paciente PAR2285/09



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1251G>C (W378C) em heterozigose no exon 9 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

Outra mutação também classificada como patogênica c.1049A>G (H311R) (Figura 16), foi identificada em heterozigose em um paciente do sexo feminino (PAR4472/15), que manifestou a doença aos 40 anos de idade (Apêndice C).

Figura 17. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1049A>G (H311R) no paciente PAR4472/17



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1049A>G (H311R) em heterozigose no exon 8 do gene *GBA*. Fonte: Elaborado pelo autor.

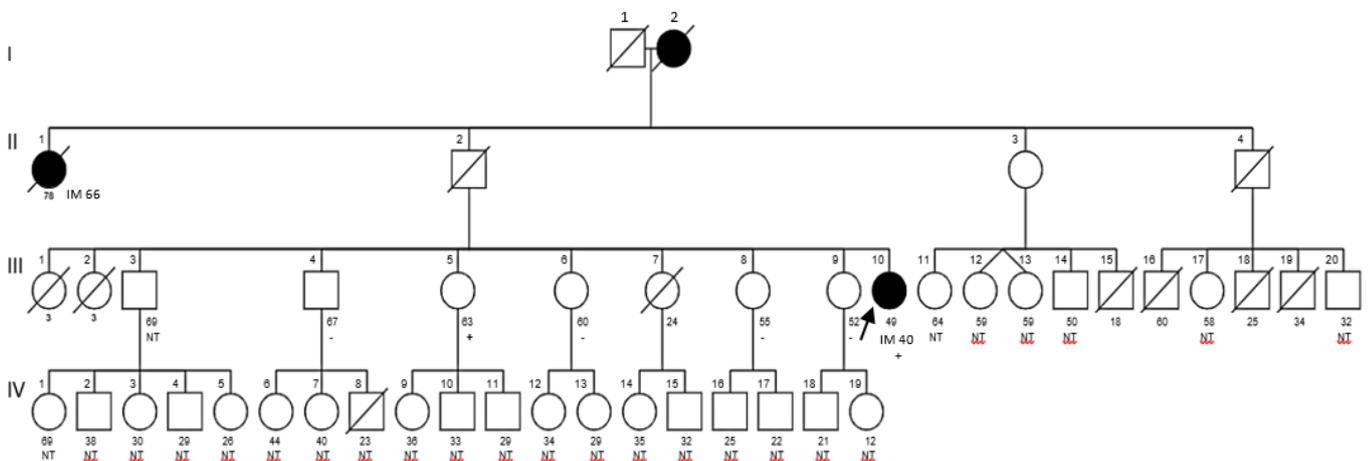
O probando PAR4472/15 (III.10) é natural do Rio de Janeiro, casado e possui história familiar de DP que abrange 3 gerações, consistente com herança autossômica dominante. Ele possui dois irmãos e quatro irmãs, e nenhum deles relatou sintomas de DP. Sua tia paterna (II.1) foi diagnosticada com DP aos 66 anos e foi a óbito aos 78 anos de idade. Segundo a família, sua avó paterna (I.2) apresentava tremor, mas não foi diagnosticada com DP (Figura 17).

Este probando foi inicialmente encaminhado para avaliação clínica em 2009, aos 40 anos, devido a tremor da mão esquerda, rigidez e bradicinesia, quando foi estabelecido o diagnóstico de DP e prescrito o uso de levodopa/benserazida, obtendo-se uma boa resposta à medicação. Antes dos sintomas motores, foram relatadas constipação, hiposmia e depressão.

Essas alterações clínicas, começaram após os 42 anos, quando desenvolveu traços de parkinsonismo no lado direito do corpo. Nos anos seguintes, apresentou distonia nos pés, congelamento da marcha e discinesia. Na última avaliação, aos 49 anos, o exame revelou instabilidade postural leve, tremor de repouso no lado esquerdo, bradicinesia bilateral e assimétrica e rigidez (pior à esquerda). O movimento discinético nos membros inferiores (semelhante à coréia) foi observado sem sinais piramidais ou cerebelares, além de alterações no sono. Nenhuma queixa cognitiva foi relatada.

Foi realizado o rastreamento da mutação c.1049A>G (H311R), em cinco outros membros de sua família (III.4, III.5, III.6, III.8 e III.9) (Figura 17), sendo esta encontrada em heterozigose no indivíduo III.5 (irmã da paciente). A partir dessa descoberta, o indivíduo III.5 foi clinicamente avaliado e seu exame neurológico revelou não possuir sintomas relacionados à DP, como tremor ou bradicinesia, disfunção olfativa, problemas de memória ou outro comprometimento cognitivo.

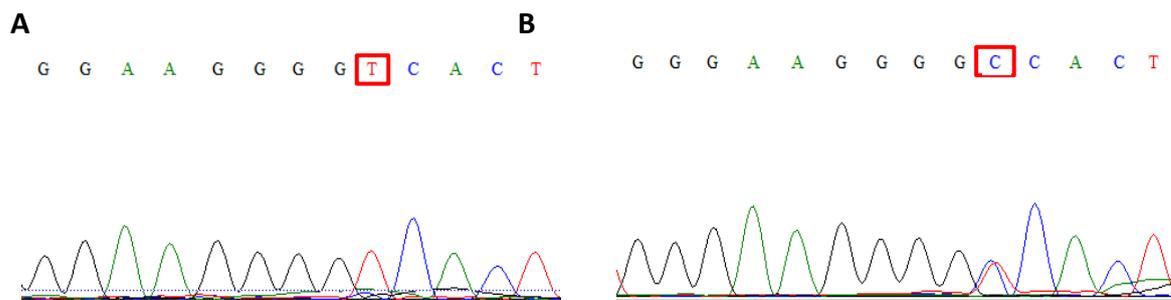
Figura 18. Heredograma da família do probando (PAR4472/15) a partir da segregação da mutação H311R no gene *GBA*



Símbolos pretos completos indicam os indivíduos afetados pela DP. Uma flecha evidencia a probanda. Os números abaixo dos símbolos indicam a idade atual ou a idade da morte (anos); IM = idade de manifestação (anos) da DP. (+) = portadores da mutação H311R; (-) = indivíduos sem a mutação H311R; NT = não testado. Fonte: elaborado pelo autor.

Outra variante patogênica c.703T>C (S196P) (Figura 18) foi observada em heterozigose em um paciente (PAR4099/13) que manifestou DP aos 47 anos e não possui história familiar da doença. A análise de predição, através de duas ferramentas de bioinformática, confirmou sua classificação e essa alteração não foi identificada em indivíduos saudáveis nesse estudo. Não foi possível obter maior detalhamento clínico desse paciente.

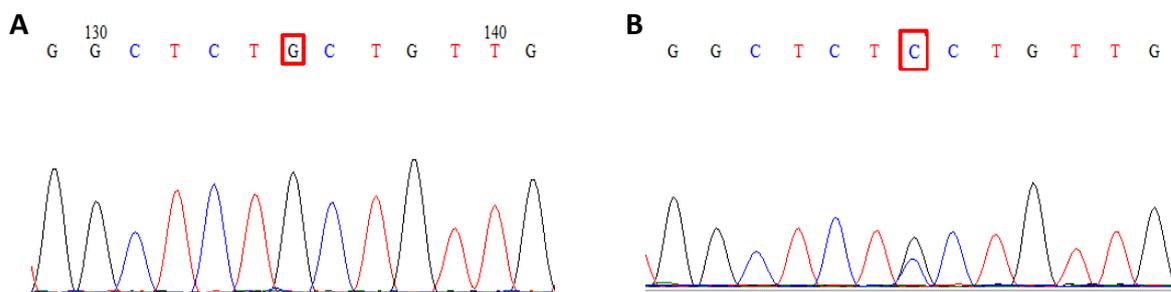
Figura 19. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 6, mostrando a alteração c.703T>C (S196P) no paciente PAR4099/13



A. Sequência Selvagem do gene GBA. B. Alteração c.703>C (S196P) em heterozigose no exon 6 do gene GBA. Fonte: elaborado pelo autor.

A variante neutra c.1483G>C (A456P) (Figura 19) foi observada isoladamente em heterozigose em um paciente do sexo masculino (PAR2374/10) que manifestou a doença aos 40 anos e relatou possuir história familiar de DP (Apêndice C). Essa variante não foi identificada na amostra controle (Tabela 17), porém, as análises *in silico*, através de dois programas (*Polyphen* e *Sift*) indicaram que essa alteração não prejudica a atividade da proteína.

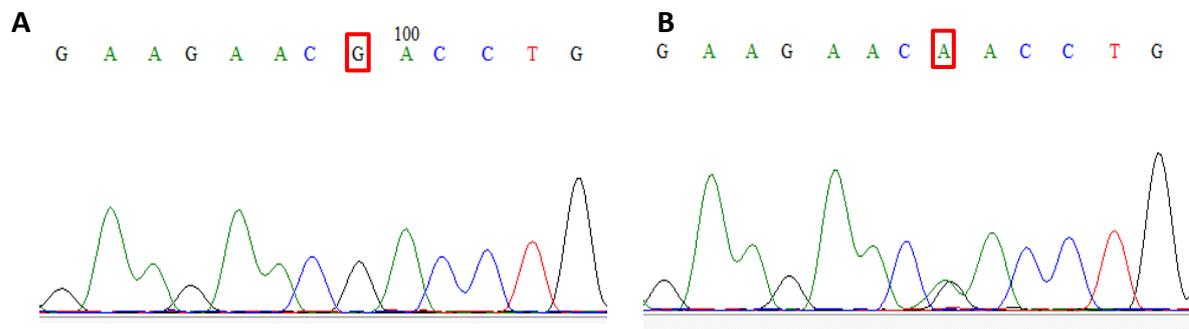
Figura 20. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1483G>C (A456P) no paciente PAR2374/10



A. Sequência Selvagem do gene GBA. B. Alteração c.1483G>C (A456P) em heterozigose no exon 10 do gene GBA. Fonte: elaborado pelo autor.

Outra alteração identificada em nossa casuística foi a c.1444G>A (D443N) (Figura 20), observada em dois pacientes (PAR4074/13 e PAR4435/15) um do sexo feminino e outro do sexo masculino, que manifestaram a doença aos 58 e 54 anos, respectivamente, e relataram não possuir história familiar (Apêndice C). Nas análises *in silico*, a D443N foi classificada como neutra pelos três programas de predição (Tabela 14), indicando que esta alteração não impede a atividade da glicocerebrosidase. Além disso, ao serem analisadas as amostras controle essa variante foi identificada em um indivíduo saudável (Tabela 17)

Figura 21. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 10, mostrando a alteração c.1444G>A (D443N) no paciente PAR4435/15.



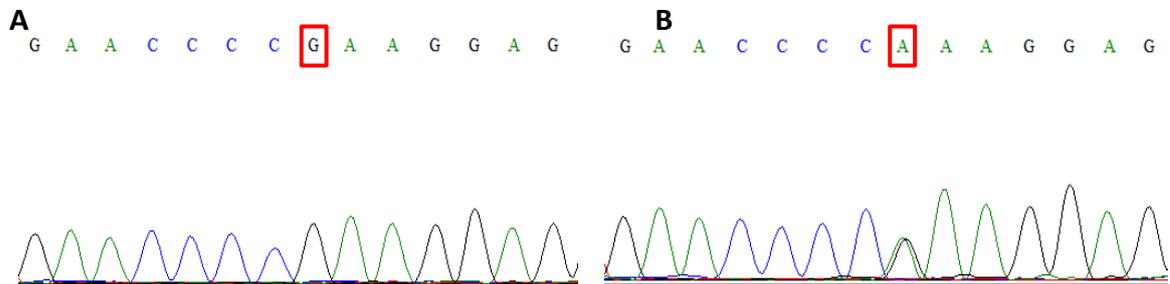
**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1444G>A (D443N) em heterozigose no exon 10 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

O probando PAR4435/15, natural do Rio de Janeiro, relatou possuir ascendência turca por parte da bisavó materna, e nenhum de seus familiares (pais e irmãos) apresenta sinais clínicos de DP. O paciente foi inicialmente encaminhado para a avaliação clínica aos 54 anos devido à dificuldade na marcha e bradicinesia, quando estabelecido o diagnóstico de DP. Na última avaliação clínica, aos 57 anos, foi observada a presença de discinesia, hipofonia e disautonomia (seborreia, constipação intestinal e disfunção sexual). Nenhuma queixa cognitiva, alucinações e depressão foram relatadas, além de instabilidade postural, distúrbios do olfato, alterações do sono e psicose.

A alteração de significado incerto, c.1401G>A (E388K) (Figura 21), foi encontrada em heterozigose em um paciente do sexo masculino (PAR4552/17), que manifestou DP aos 46 anos e não possui história familiar da doença (Apêndice C). Essa variante não foi observada na amostra controle (Tabela 17) e, além disso, as

análises *in silico* indicaram que ela possui um efeito neutro (Tabela 14), não afetando a atividade da proteína GBA.

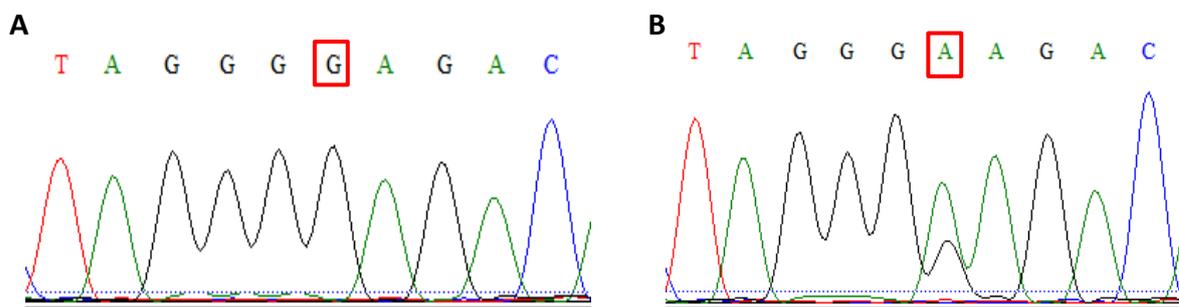
Figura 22. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 9, mostrando a alteração c.1401G>A (E388K) no paciente PAR4552/17



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1401G>A (E388K) em heterozigose no exon 9 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A alteração c.1093G>A (E326K) (Figura 22) foi identificada em heterozigose em cinco pacientes do sexo masculino (PAR1648/07, PAR2266/09, PAR4082/13, PAR4266/14, PAR4433/15). Dentre estes, quatro relatam possuir história familiar de DP (Apêndice C). A análise da amostra controle permitiu identificar 1 indivíduo saudável (Tabela 17) portador desta alteração e as análises *in silico* através de duas ferramentas (Tabela 14) indicaram que essa variante parece não afetar a atividade da proteína GBA.

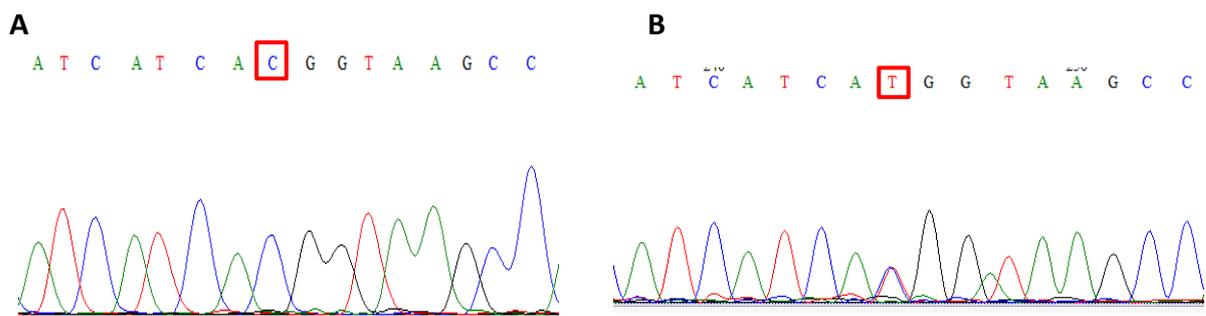
Figura 23. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1093G>A (E326K) no paciente PAR4433/15



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1093G>A (E326K) em heterozigose no exon 8 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A variante c.1223C>T (T369M) (Figura 23) foi identificada em heterozigose em três pacientes (PAR1164/06, PAR1224/06, PAR4470/15) do sexo masculino que relataram não possuir história familiar (Apêndice C). Entretanto, no presente estudo nos indivíduos saudáveis (Tabela 17) essa alteração não foi identificada e as análises *in silico*, a partir das três ferramentas de predição, classificaram esta variante como neutra (Tabela 14).

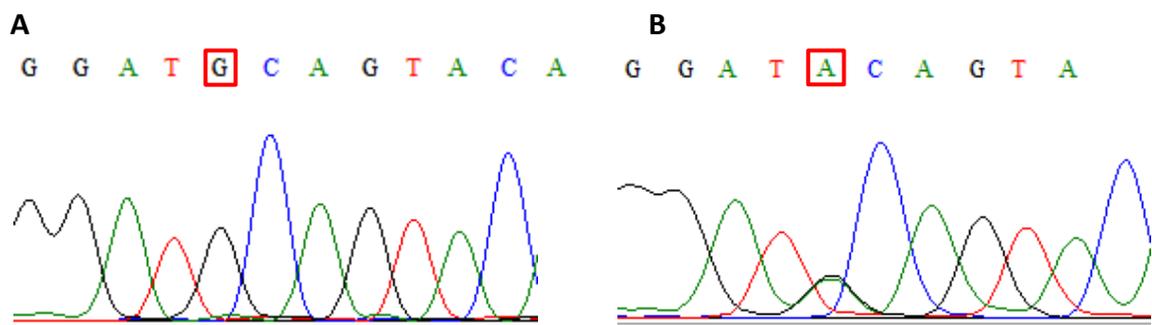
Figura 24. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1223C>T (T369M) no paciente PAR4470/15



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1223C>T (T369M) em heterozigose no exon 8 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A alteração c.1200G>A (M361I) (Figura 24), classificada por todos os programas de predição como neutra (Tabela 14), foi identificada em um paciente do sexo feminino (PAR4323/15) que manifestou DP aos 48 anos e possui história familiar da doença (Apêndice C). Essa variante não foi observada na amostra controle de indivíduos saudáveis (Tabela 17).

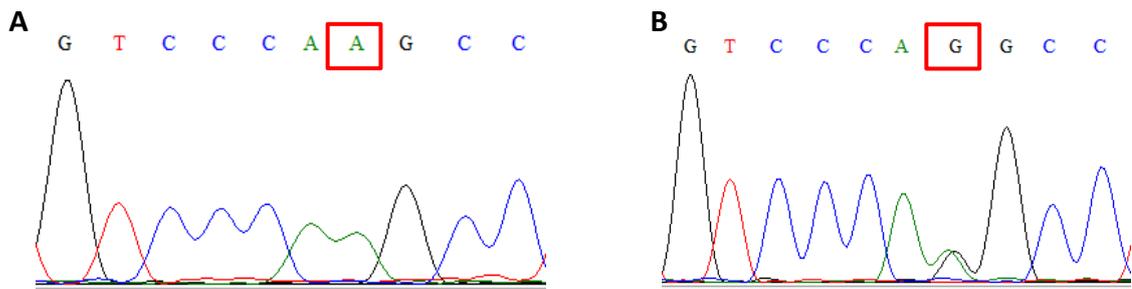
Figura 25. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1200G>A (M361I) no paciente PAR4323/15



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c. c.1200G>A (M361I) em heterozigose no exon 8 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A variante c.38A>G [(K(-)27R)] (Figura 25), localizada no exon 2, foi encontrada em cinco pacientes em heterozigose (PAR4162/13, PAR4241/14, PAR4302/14, PAR4422/15, PAR4463/15). Dentre esses, quatro eram do sexo masculino e um do sexo feminino e nenhum relatou possuir história familiar (Apêndice C). Além disso, foi avaliado o grupo controle e observado que três indivíduos possuíam essa variante (Tabela 17) e as análises *in silico* a classificaram como não patogênica (Tabela 14).

Figura 26. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 2, mostrando a alteração c.38A>G (K(-)27R) do paciente PAR4422/15



A. Sequência Selvagem do gene *GBA*. B. Alteração c.38A>G [K(-)27R] em heterozigose no exon 2 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

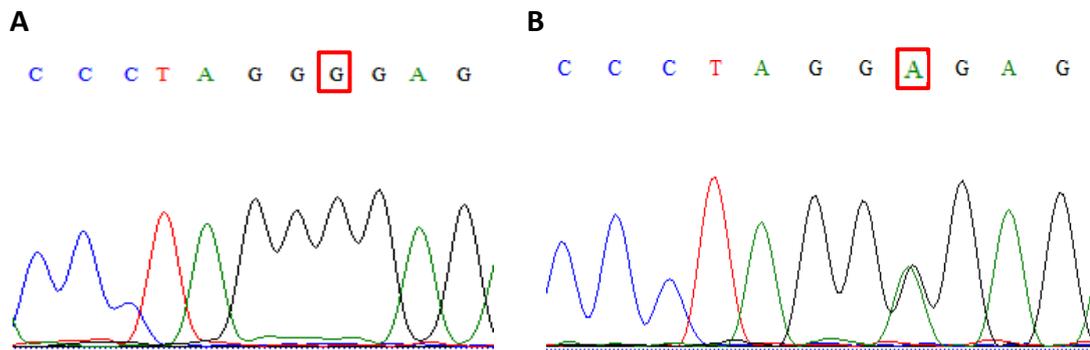
#### 5.2.1.2 Variantes sinônimas identificadas no gene *GBA*

Foram identificadas três variantes sinônimas [c.1497G>C (V460V), c.1479C>T (G493G) e c.326G>A (P68P)] e, ao serem analisadas pelo programa *MutationTaster*, foi verificado que a variante c.1497G>C (V460V) foi classificada como patogênica e as c.1479C>T (G493G) e c.326G>A (P68P) como neutras, sendo estas observadas na amostra controle (Tabela 17).

A alteração silenciosa **V460V** foi identificada no exon 10 em três pacientes (PAR3265, PAR4037, PAR e PAR4271) como parte do alelo recombinante *RecNciI* (L444P, A456Pe V460V), que leva a uma proteína com atividade residual quase nula (Figura 11; ver item 5.1.4.1), não sendo encontrada isoladamente nas amostras deste estudo.

A alteração c.1092G>A (G325G) (Figura 26), localizada no exon 8, foi identificada em heterozigose em dois pacientes (PAR1359 e PAR4368), do sexo masculino sem história familiar da doença (Apêndice C).

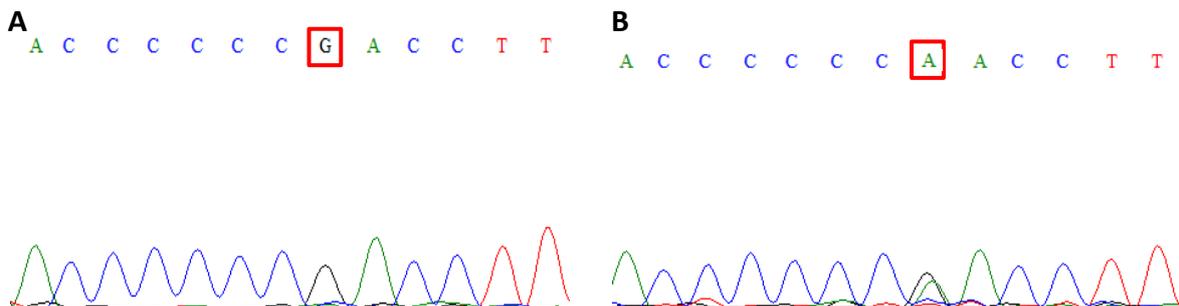
Figura 27. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 8, mostrando a alteração c.1092G>A (G325G) no paciente PAR4368/15



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1092G>A (G325G) em heterozigose no exon 8 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

A alteração c.326G>A (P68P) (Figura 27), localizada no exon 3, foi observada em dois pacientes do sexo masculino (PAR4261/14 e PAR4425/15). Destes, um (PAR4425/15) relatou possuir história familiar de DP (Apêndice C).

Figura 28. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 3, mostrando a alteração c.326G>A (P68P) no paciente PAR4425/15



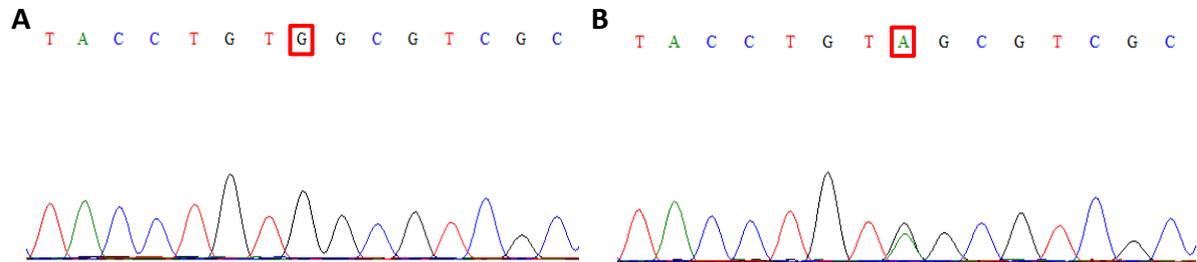
**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração P68P (c.326G>A) em heterozigose no exon 3 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.2.1.3 Variante *nonsense* identificada no gene *GBA*

Após a análise, utilizando a ferramenta *MutationTaster*, a variante c.1598G>A (W533X) foi classificada como patogênica. Em nossa casuística, ela foi identificada em um paciente do sexo masculino (PAR4042/12), que manifestou DP aos 47 anos e relatou não possuir história familiar da doença (Apêndice C).

O probando é natural de Manaus, o que dificultou a obtenção de informações mais detalhadas que permitissem a elaboração do heredograma.

Figura 29. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do produto da PCR do exon 3, mostrando a alteração c.1598G>A (W533X) no paciente PAR4042/12



**A.** Sequência selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.1598G>A (W533X) em heterozigose no exon 11 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.2.2 Alterações identificadas na região intrônica e 5' UTR e 3' UTR

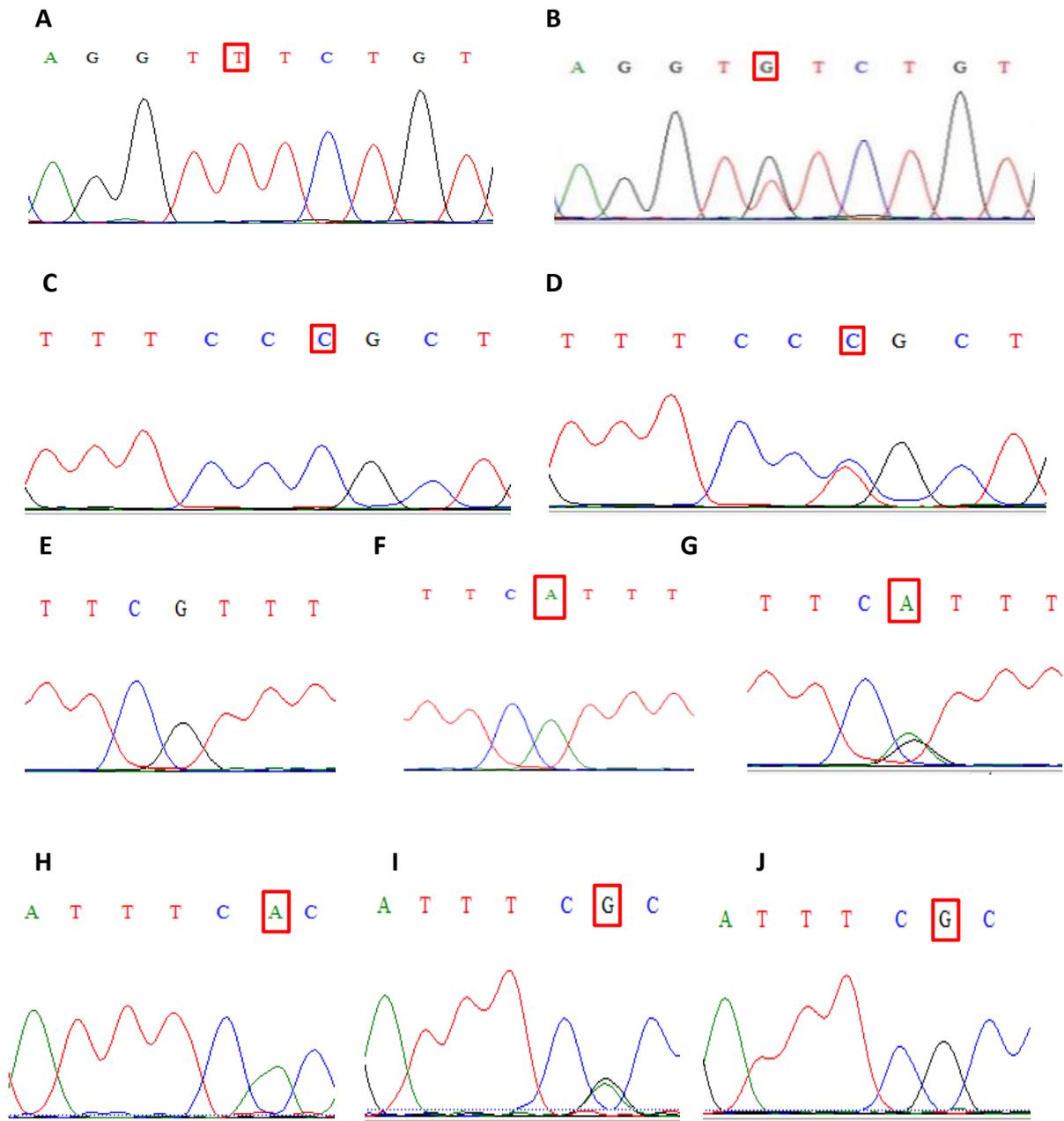
Foram identificadas 8 alterações intrônicas, evidenciadas na Tabela 15, e, dentre essas, a mais incidente foi a c.454+47G>A (rs3115534), encontrada em 169 probandos, seguida da c.454+47G>A (rs2075569), c.455-206A>G (rs7416991) c.589-86A>G (rs2974923) e rs2070679 (c.28-133T>G). As demais foram identificadas em frequência inferior a 5%. O programa *Splicing Finder* foi utilizado para avaliar se essas alterações intrônicas podem alterar os sítios doadores e receptores do encadeamento do RNA, e foi demonstrado que estas não são patogênicas.

Tabela 15. Principais variantes encontradas nos introns do gene *GBA*, de acordo com a localização, número de pacientes com DP e frequência da variante em DP

dbSNP	ID/DNA	Localização	Número de pacientes com DP	Frequência da variante em DP (%)
rs3115534	c.1225-34C>A	8	169	55,6
rs2075569	c.454+47G>A	4	114	37,5
rs7416991	c.455-206A>G	5	51	16,7
rs2974923	c.589-86A>G	6	40	13,1
rs2070679	c.28-133T>G	1	16	5,2
rs2974924	c.1389-68T>C	9	11	3,6
rs976829552	c.1224+96C>T	3	2	0,6
rs140335079	c.762-18T>A	6	2	0,6

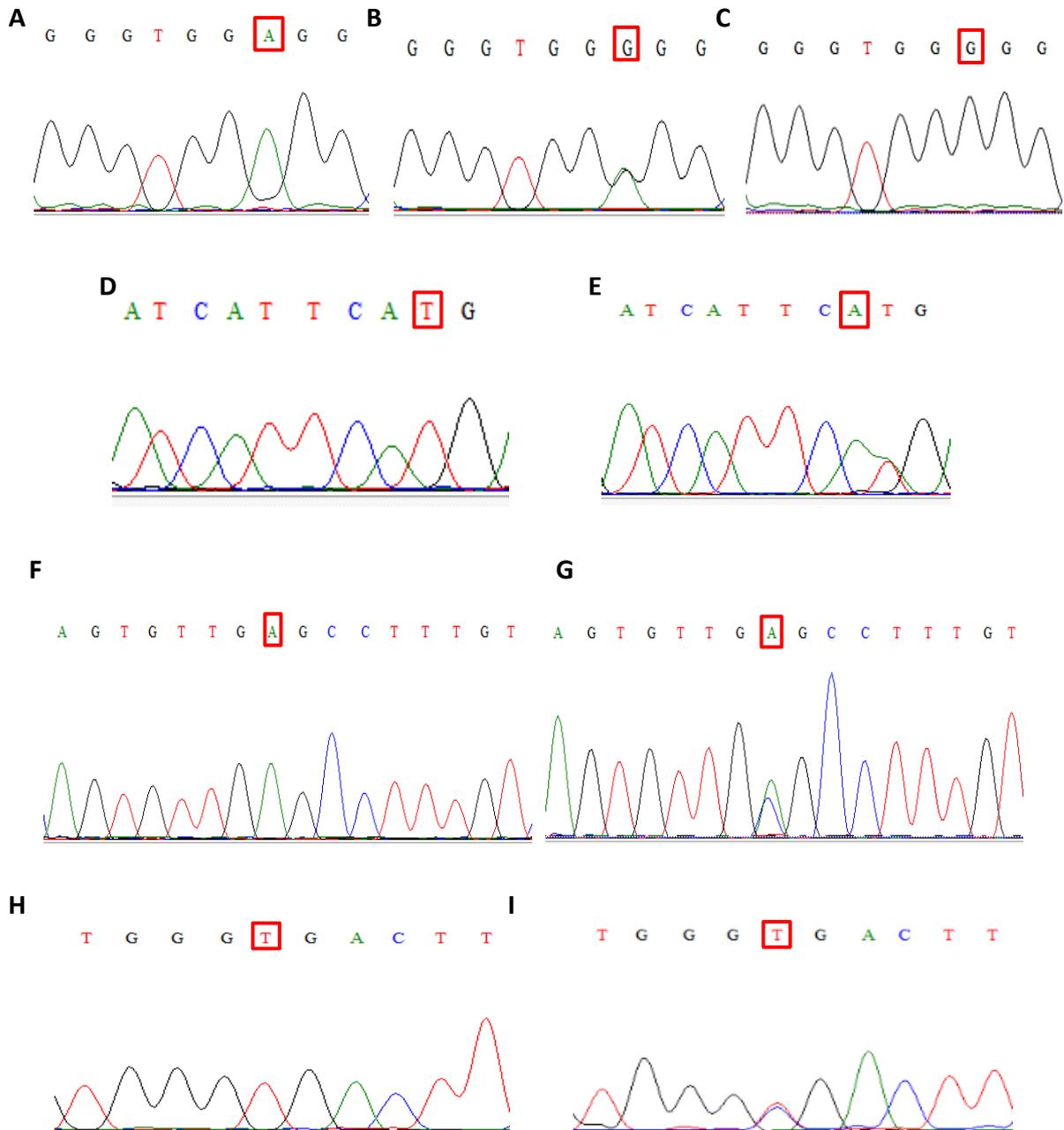
Os eletroferogramas abaixo (Figura 30 e 31) representam todas as variantes intrônicas identificadas no grupo de pacientes com DP (Apêndice D).

Figura 30. Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR das variantes c.28-133T>G (rs2070679), c.1224+96C>T (rs976829552), rs2075569 (c.454+47G>A) e rs7416991 (c.455-206A>G)



**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.28-133T>G (rs2070679) em heterozigose no intron 1 do gene *GBA*. **C.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **D.** Alteração c.1224+96C>T (rs976829552) em heterozigose no intron 3 do gene *GBA*. **E.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **F.** Alteração c.454+47G>A (rs2075569) em homozigose no intron 4 do gene *GBA*. **G.** Alteração c.454+47G>A (rs2075569) em heterozigose no intron 4 do gene *GBA*. **H.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **I.** Alteração 455-206A>G (rs7416991) em heterozigose intron 5 do gene *GBA*. **J.** Alteração 455-206A>G (rs7416991) em homozigose no intron 5 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 31. Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR das alterações rs2974923 (c.589-86A>G), rs140335079 (c.762-18T>A), rs3115534 (c.1225-34C>A) e rs2974924 (c.1389-68T>C)



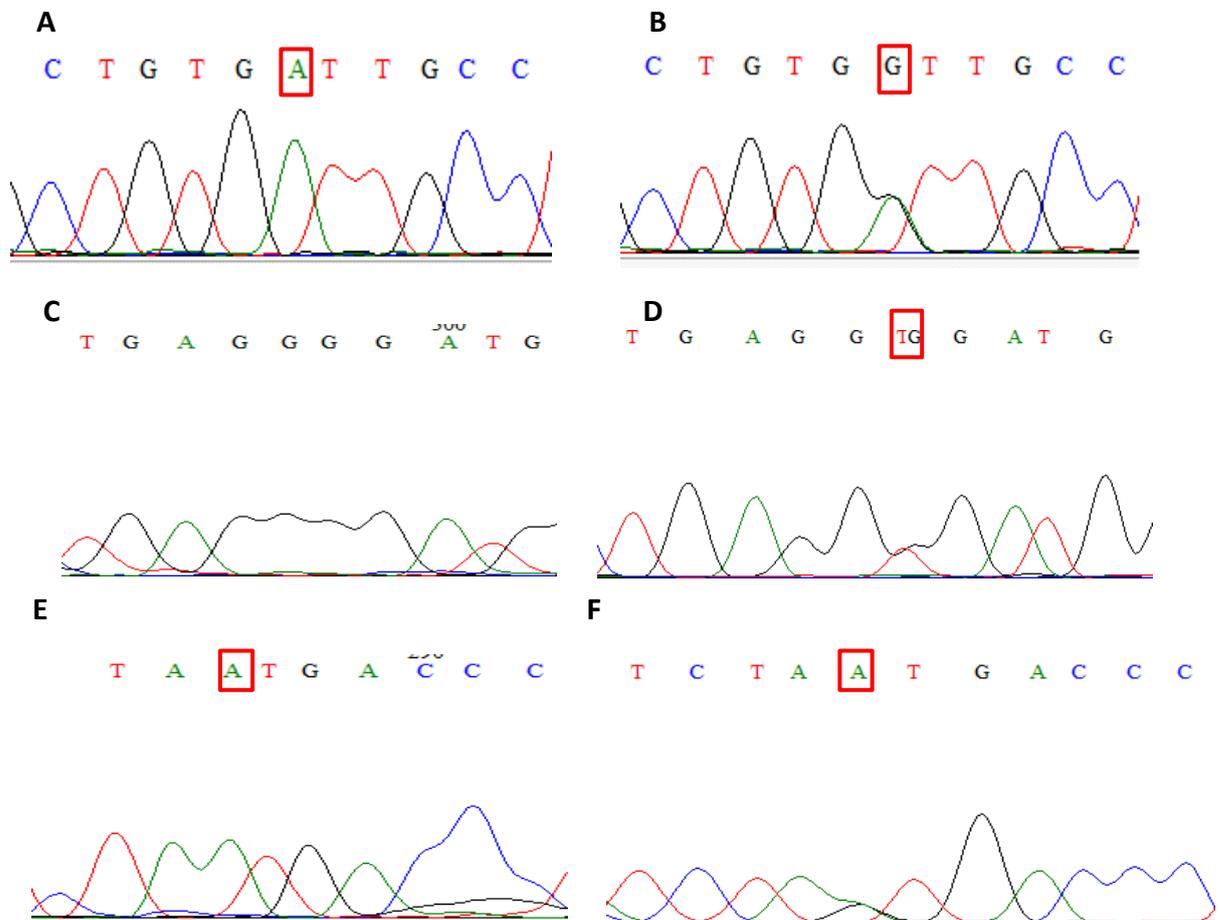
**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração rs2974923 (c.589-86A>G) em heterozigose no intron 6 do gene *GBA*. **C.** Alteração rs2974923 (c.589-86A>G) em homozigose no intron 6 do gene *GBA*. **D.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **E.** Alteração rs140335079 (c.762-18T>A) em heterozigose intron 6 do gene *GBA*. **F.** Alteração c.1225-34C>A (rs3115534). **G.** Alteração c.1225-34C>A em homozigose no intron 8 do gene *GBA*. **H.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **I.** Alteração c.1389-68T>C (rs2974924) homozigose no intron 9 do gene *GBA*. Fonte: elaborado pelo autor.

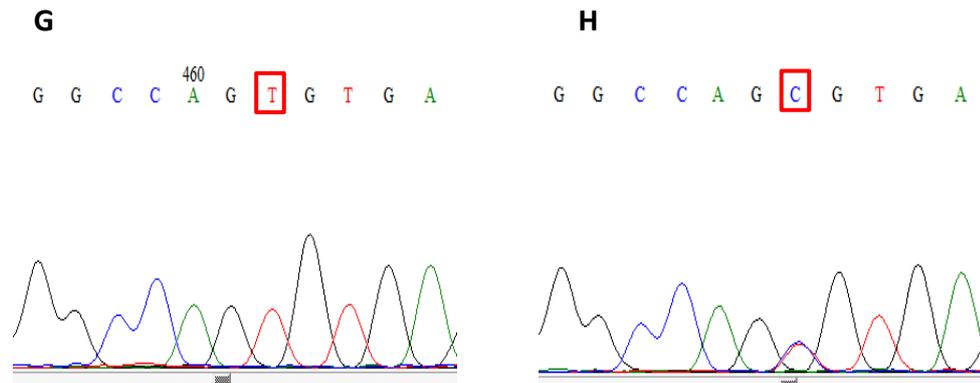
Além das alterações intrônicas, foram identificadas também quatro variantes nas regiões 5' UTR e 3' UTR (Tabela 16), representadas pelos eletroferogramas (Figura 31).

Tabela 16. Variantes identificadas nas regiões 5' UTR e 3' UTR do gene *GBA*

dbSNP	ID/DNA	Localização	Frequência da variante em DP – N (%)
rs188978150	c.-202A>G	5' UTR	1 (0,3)
rs1141801	c.-2G>A	5' UTR	1 (0,3)
rs1064640	c.-14A>G	5' UTR	1 (0,3)
rs368275143	c.*102T>C	3' UTR	2 (0,3)

Figura 32. Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do produto da PCR para a variantes c.-202A>G (rs188978150), c.-2G>A (rs1141801) e c.\*102T>C (rs368275143).





**A.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **B.** Alteração c.-202A>G (rs188978150) na região 5'UTR do gene *GBA*. **C.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **D.** Alteração c.-2G>A (rs1141801) em heterozigose no intron 1 do gene *GBA*. **E.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **F.** Alteração c.-14A>G(rs1064640) em heterozigose na região 5'UTR do gene *GBA*. **G.** Sequência Selvagem do gene *GBA*. **H.** Alteração c.\*102T>C (rs368275143) em heterozigose no região 3'UTR do gene *GBA*. Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.2.3 Pacientes com mutações no gene *GBA*

A frequência de mutações no gene *GBA* em pacientes com história familiar foi menor (29,7%) do que em pacientes de casos isolados (70,3%). Assim como a média de idades e a idade de manifestação (Tabela 17).

Tabela 17. Dados sobre a amostra estudada de pacientes com DP portadores de mutações *GBA* e não portadores

Variáveis	Presença de mutações no <i>GBA</i> (N = 37)	Ausência de mutações no <i>GBA</i> (N = 267)	P
Casos familiares (%)	11 (29,7)	101 (33,3)	0,300
Casos isolados (%)	26 (70,3)	159 (64,7)	
Média de idades (anos)	55,3 ± 10,9 <sup>†</sup>	62,2 ± 12,6 <sup>†</sup>	0,396
Idade de manifestação média (anos)	48,2 ± 10,7 <sup>†</sup>	54,5 ± 13,2 <sup>†</sup>	0,365

<sup>†</sup>Os valores representam média ± desvio padrão; P = ≤ 0,05: diferenças estatísticas significantes.

Os probandos que apresentavam mutações patogênicas em *GBA*, apresentaram idade de manifestação precoce e tremor em repouso, em sua maioria, como sintoma inicial, seguido de bradicinesia, instabilidade postural e resposta à levodopa. Além disso, sete pacientes apresentavam disautonomia e/ou depressão (Tabela 18).

Tabela 18. Dados clínicos de pacientes com DP portadores de mutações patogênicas no *GBA*

Manifestação clínica	PAR4500/16	PAR4583/18	PAR3265/11	PAR4037/12	PAR4271/14	PAR4043/12	PAR4130/13	PAR4138/13	PAR4189/13	PAR4574/18	PAR4522/17	PAR4472/15	PAR2285/09	PAR4099/13	PAR4042/12
Mutação	L444P	L444P	RecNCil (L444P+A45 6P+V460V)	RecNCil (L444P+A45 6P+V460V)	RecNCil (L444P+A456 P+V460V)	N370S	N370S	N370S	N370S	N370S	D409H	H311R	W378C	S196P	W533X
Gênero	F	F	M	M	M	F	F	F	F	M	F	F	M	M	M
Idade de manifestação	55	63	42	29	43	23	40	40	49	48	44	40	49	47	47
História Familiar	F	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Sintoma Inicial	Tremor	Tremor	Bradicinesia	Tremor	Tremor	Tremor	Bradicinesia	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor	Tremor		
Bradicinesia	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Rigidez	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
Tremor em repouso	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Instabilidade postural	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		
Flutuações Motoras			+	+		+	+	+	+		+	+			
Declínio Cognitivo			-	-	-	-	-	-	-		-	-			
Alucinações			-	+	-	+	+	+	-		-	-			
Depressão			+	-	+	-	+	+	+		+	+			
Disautonomia			+	+		+	+	+			+	+			
Distúrbios do olfato			-				+				-	+			
Discinesia			-	-	+	-	+	+	+		-	+			
Hipofonia (alteração da voz)			+	-	-	-	+	+	+		+	+			
Resposta a Levodopa	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			

+: presença do sintoma; -: ausência do sintoma; Em branco: não informado.

### 5.2.4 Análise da amostra controle para o gene *GBA*

Para fins comparativos, as mutações exônicas identificadas no grupo de pacientes foram rastreadas em uma amostra controle, composta por 100 indivíduos saudáveis, na faixa etária de 50 a 95 anos (média de idades: 65,8 anos  $\pm$  9,94) (Apêndice E). A análise desses 100 indivíduos revelou a presença de cinco alterações (K(-)27R, P68P, G325G, E326K e D443N) exônicas no gene *GBA* (Tabela 17).

Tabela 17. Principais variantes encontradas nos exons analisados do gene *GBA* na amostra controle, de acordo com a localização, tipo de mutação, número de alterações e frequência das variantes em controles

Alteração na sequência			Localização (Exon)	Tipo de mutação	Número de controles com alterações	Frequência da variante em controles (%)
dbSNP	Mutações <sup>1</sup>	ID/DNA				
rs150466109	K(-)27R	c.38A>G	2	Missense	3	3,0
rs145888253	P68P	c.326G>A	3	Silenciosa	1	1,0
rs143222798	G325G	c.1092G>A	8	Silenciosa	1	1,0
rs2230288	E326K	c.1093G>A	8	Missense	1	1,0
Rs75671029	D443N	c.1444G>A	8	Missense	1	1,0

### 5.3 Análise descritiva do gene *CHCHD2*

Em relação ao gene *CHCHD2*, analisamos 122 probandos com DP, todos com história familiar da doença. Destes, 41 são do sexo feminino e 81 do sexo masculino (faixa etária: 32-96 anos; média de idades: 60,5  $\pm$  11,1 anos; idade de manifestação média: 52,1  $\pm$  12,0 anos) (Tabela 18).

Tabela 18. Dados gerais sobre a amostra de pacientes com DP analisada para o gene *CHCHD2*

Variáveis	Amostra
Número de casos	122
Faixa etária (anos)	32 a 96
Média das idades (anos)	60,5 $\pm$ 11,1 <sup>†</sup>
Idade de manifestação (anos)	18 a 79
Idade de manifestação média (anos)	52,1 $\pm$ 12,0 <sup>†</sup>

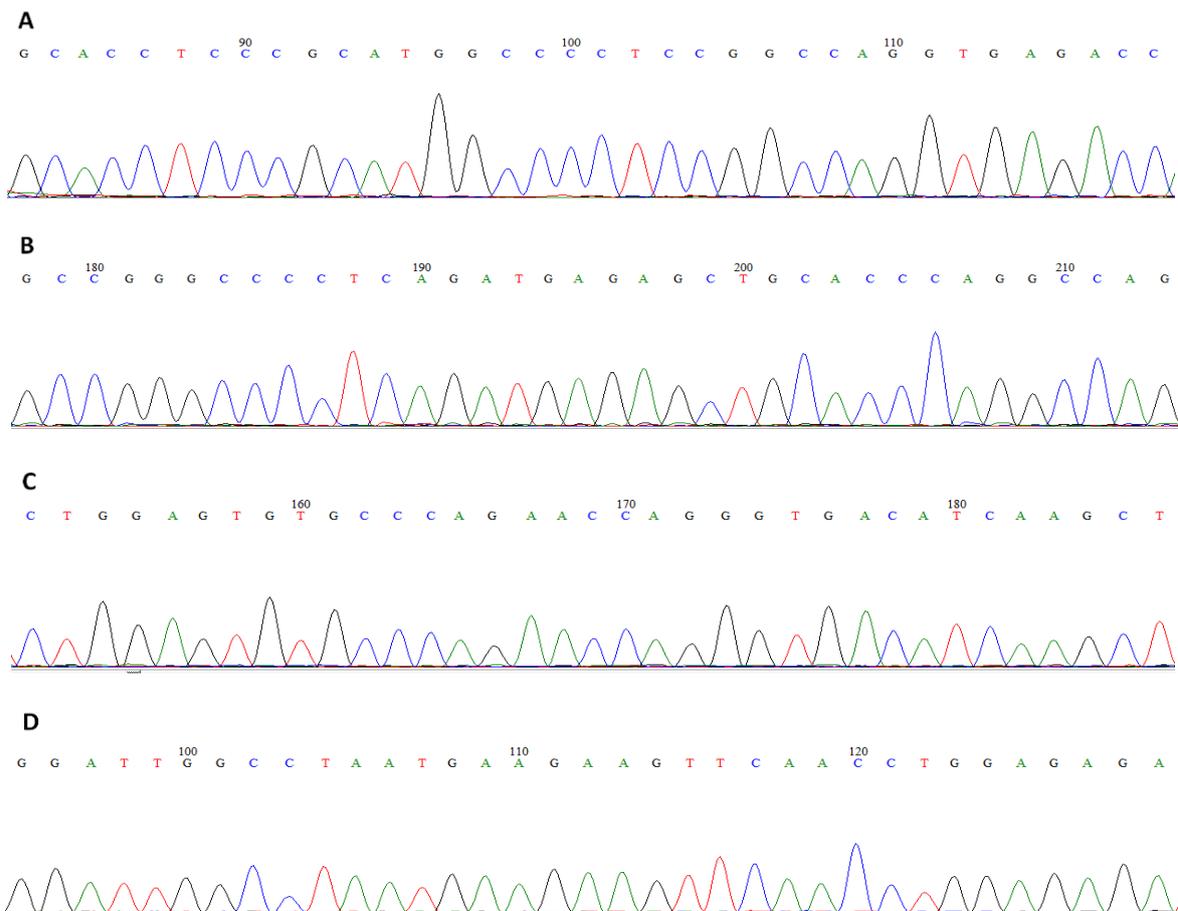
<sup>†</sup>Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão

### 5.3.1. Análise molecular do gene *CHCHD2*

A análise dos quatro exons do gene *CHCHD2*, não revelou a presença de variantes patogênicas ou de risco nos 122 probandos brasileiros pertencentes a famílias com história familiar de doença de Parkinson, compatível com herança autossômica dominante (Figura 32) (Apêndice F).

Nossos achados relativos ao gene *CHCHD2*, deram origem ao manuscrito intitulado “*CHCHD2 mutational screening in Brazilian patients with familial Parkinson's disease*”, publicado no periódico *Neurobiology of Aging*, 2019,74, 236e7 (Apêndice B).

Figura 32: Eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento do gene *CHCHD2* em 122 probandos com DP



(A) Sequência de DNA do exon 1, demonstrando um paciente com sequência normal. (B) Sequência de DNA do exon 2, demonstrando um paciente com sequência normal. (C) Sequência de DNA do exon 3, demonstrando um paciente com sequência normal. (D) Sequência de DNA do exon 4, demonstrando um paciente com sequência normal.

## 6 DISCUSSÃO

O estudo de mutações em toda extensão do gene *GBA* conduzido em 304 probandos com doença de Parkinson, levou à identificação de 17 alterações exônicas (Tabela 13) em 37 pacientes, o que corresponde a 12,1% do total de variantes exônicas identificadas no presente estudo. Vale ressaltar que, dentre estas, foram observadas três alterações patogênicas [c.1448T>C (L444P), c.1226A>G (N370S) e c.1342G>C (D409H)] comumente relatadas em pacientes com DP de diferentes grupos étnicos (AHARON-PERETZ *et al.*, 2004; GAN-OR *et al.*, 2008; MATA *et al.*, 2008; KALINDERI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2013; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Adicionalmente, neste mesmo gene, foi identificado três variantes patogênicas, c.1049A>G (H311R), c.1251G>C (W378C) e c.1598G>A (W533X), ainda não descritas em pacientes com DP.

Além disso, foram rastreadas mutações no gene *CHCHD2*, previamente associado à DP em um estudo conduzido em quatro famílias japonesas, portadoras da doença, com características de segregação autossômica dominante (FUNAYAMA *et al.*, 2015). No entanto, não foram identificadas variantes de risco ou patogênicas em *CHCHD2* nos 122 probandos pertencentes a famílias brasileiras com histórico familiar da doença. Pode-se inferir que alterações nesse gene são causas raras da DP ou restritas a populações específicas.

### 6.1 Gene *GBA*

Diversos estudos têm relatado uma frequência elevada de variantes no *GBA* em pacientes com a doença de Parkinson, o que reforça o papel deste gene como um importante fator de risco para o desenvolvimento dessa doença em diferentes populações (AHARON-PERETZ *et al.*, 2004; SIDRANSKY *et al.*, 2009; LESAGE *et al.*, 2010; NALLS *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*, 2018; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019).

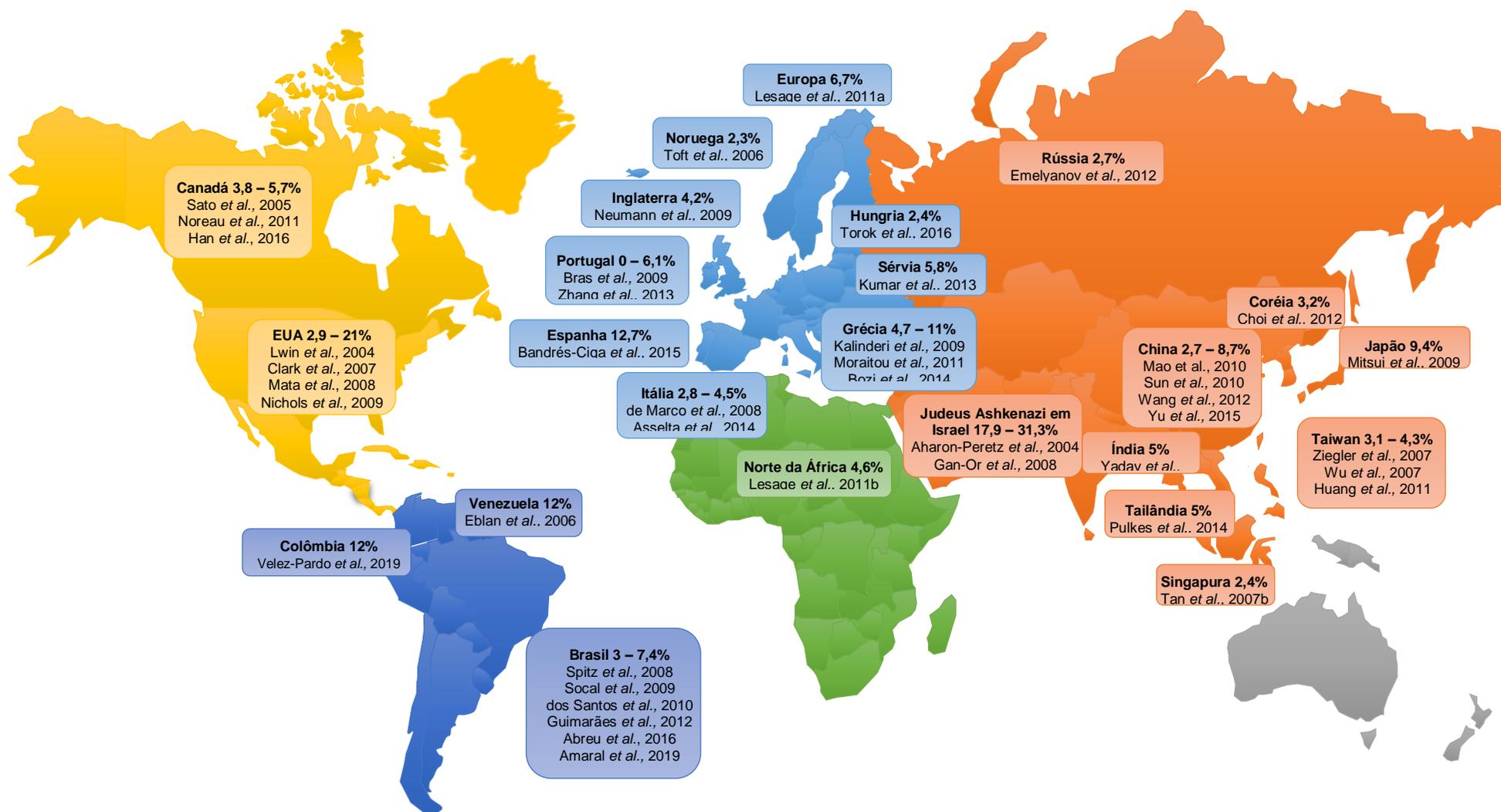
Neste estudo, foram comparados os resultados das dezessete alterações exônicas identificadas, não sendo observadas diferenças estatísticas significativas entre pacientes com DP e controles ( $P = 0,062$ ). Porém, oito dessas alterações (L444P, N370S, D409H, H311R, W378C, S196P, V460V e W533X) foram classificadas como patogênicas pelas ferramentas de predição utilizadas no presente estudo (*Polyphen*, *Sift* e *Mutation Taster*), sendo três dessas (L444P, N370S e D409H)

comumente relatadas em pacientes com DP de diferentes grupos étnicos. As análises estatísticas mostraram uma associação significativa ( $P=0,046$ ; OR: 8,12; IC95%: 1,04 – 63,33) quando as mutações L444P, N370S e D409H foram avaliadas em conjunto, indo ao encontro dos relatados na literatura (AHARON-PERETZ *et al.*, 2004; GAN-OR *et al.*, 2008; MATA *et al.*, 2008; KALINDERI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2013; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Além disso, considerando as variantes c.1049A>G (H311R), c.1251G>C (W378C), c.703T>C (S196P), c.1497G>C (V460V) e c.1598G>A (W355X), aqui classificadas como patogênicas, essa associação se mantém estatisticamente significativa ( $P = 0,012$ ; OR: 13,07; IC95%: 1,72 - 98,98), indicando que essas alterações aumentam o risco de desenvolvimento de DP.

Até o momento, levando em consideração diferentes grupos étnicos, diversas mutações patogênicas (L444P, N370S, IVS2+1G>A, D409H, R120W, entre outras), em heterozigose, foram identificadas no gene *GBA* e a distribuição de suas frequências varia de 0% (ZHANG *et al.*, 2013) a 31,3% (AHARON-PERETZ *et al.*, 2004), sendo a maior incidência observada em pacientes com DP de origem *Ashkenazi*, como mostrado na Figura 34.

Diversos estudos realizaram o sequenciamento completo do gene *GBA* em pacientes com DP e controles saudáveis a fim de estabelecer a frequência de alterações no *GBA* e constituir o papel delas na susceptibilidade à doença em diferentes grupos étnicos (LWIN *et al.*, 2004; EBLAN *et al.*, 2006; BRÁS *et al.*, 2007; ZIEGLER *et al.*, 2007; KALINDERI *et al.*, 2009; NEUMANN *et al.*, 2009; SETÓ-SALVIA *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012; DURAN *et al.*, 2013; PULKES *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016; CROSIERS *et al.*, 2016; JESÚS *et al.*, 2016; BERGE-SEIDL *et al.*, 2017; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Apesar da frequência e heterogeneidade na distribuição dessas variantes oscilar consideravelmente entre diferentes populações, estudos indicam que estes achados não são exclusivos de uma população. Por meio desses estudos, um total de 7.380 pacientes com DP foram analisados para o gene *GBA* e, aproximadamente, 123 diferentes variantes foram identificadas, dentre as quais, a L444P foi relatada em 95% dos trabalhos analisados, incluindo o presente estudo. Esses trabalhos estão sumarizados na Tabela 21, e após sua análise, foi comprovado que algumas variantes são comuns a diferentes etnias (LWIN *et al.*, 2004; EBLAN *et al.*, 2006; BRÁS *et al.*, 2007; CLARK *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2016), no entanto, outras, como por exemplo a Q497R, é específica de populações asiáticas (ZIEGLER *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2014; JESÚS *et al.*, 2016; BERGE-SEIDL *et al.*, 2017).

Figura 34. Frequência de variantes no gene *GBA* identificadas em pacientes com DP de diferentes grupos étnicos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 21. Síntese dos estudos que realizaram o rastreamento total do gene *GBA* em pacientes com DP em diferentes grupos étnicos

Grupo étnico	Probandos com DP	Probandos com mutações (%)	Variantes reportadas	Referência
Americanos	57	12 (21)	N370S, L444P, K198T, R329C, T369M e E326K	LWIN <i>et al.</i> , 2004
Venezuelanos	33	4 (12,1)	L444P, N370S e RecNcil	EBLAN <i>et al.</i> , 2006
Portugueses	230	19 (8,2)	K(-)27R, R2L, E326K, T369M, N370S, E388K, N396T, D409H e L444P	BRÁS <i>et al.</i> , 2007
Americanos (Judeus Ashkenazi)	278	38 (13,7)	84insGG, P175P, E326K, T369M, N370S, D409H, R496H, L444P e RecNcil	CLARK <i>et al.</i> , 2007
Taiwaneses	92	5 (5,4)	L174P, E326K, T369M, D409H, L444P, V460M e Q497R	ZIEGLER <i>et al.</i> , 2007
Gregos	172	11 (6,4)	H255Q, L268L, S271G, E326K, R329H, D409H, L445P, V460L e T482K	KALINDERI <i>et al.</i> , 2009
Japoneses	534	50 (9,4)	R120W, R131C, N188S, G193W, F213I, R329C, L444P, R496C, RecNcil, A456P, V460V, R120W, N188R, V191G, S196P e F213I	MITSUI <i>et al.</i> , 2009
Britânicos	790	33 (4,2)	K7E, R131C, G193E, R257Q, N370S, D380A, D409H, L444P, D443N, V458L, R463C, c.1263-1317 del55, RecA456P e RecNcil	NEUMANN <i>et al.</i> , 2009
Franceses	1391	76 (6,7)	K(-)27R, K79M, G80R, G113C, G113A, I119L, R120W, S125N, R131C, D140H, S173SfsX50, A190A, G202R, P246L, Y304C, Y313Y, T323I, E326K, R329C, S364N, T369M, N370S, G377S, E388K, D409H, L444P, P452L, R463C, R463H, A446A, RecNcil e RecA456P	LESAGE <i>et al.</i> , 2010a
Norte-africanos	194	13 (6,7)	K(-)27R, R131C, E326K, T369M, N370S, D443N, L444P e RecNcil	LESAGE <i>et al.</i> , 2011b
Espanhóis	225	22 (9,8)	M123T, L144V, G202R, I260T, T369M, N370S, W393R, D409H, L444P, S488T e RecNcil	SETÓ-SALVIA <i>et al.</i> , 2011
Coreanos	277	9 (3,2)	N188S, P201H, R257Q, S271G e L444P	CHOI <i>et al.</i> , 2012
Britânicos	185	48 (25,9)	E326K, N370S, L444P, RecNcil e R463C	DURAN <i>et al.</i> , 2013

				Continuação
Tailandeses	480	14 (12,8)	IVS2+1G>A, L444P, N386K, P428S e V398fsX404	PULKES <i>et al.</i> , 2014
Japoneses	147	27 (18,8)	I(-20)V, G64V, R120W, W393X, D409H, L444P, I489V e RecNcil	LI <i>et al.</i> , 2014
Chineses	184	16 (8,6)	R163Q, F213I, L264I, L314V, E326K, F347L, S364S, V375L, L444P, A456P, Q497R, RecNcil e 5-bp deletion (c.334_338delCAGAA)	YU <i>et al.</i> , 2014
Canadenses	225	25 (11,1)	5'UTR-A/G, S(-35)N, S13L, R120W, E326K, T369M, N370S, L444P, RecNcil (L444P+A456P+V460V) e RecTL(del55+D409H+RecNcil)	HAN <i>et al.</i> , 2016
Belgas	266	27 (10,1)	G(-1)R, D140H, Q256SfsX9, L324P, E326K, T369M, N379S, L444P, H490R e RecNcil	CROSIERS <i>et al.</i> , 2016
Espanhóis	532	43 (8,0)	116-8C>T, W312R, E326K, T369M, N370S, L444P e V457D	JESÚS <i>et al.</i> , 2016
Escandinavos	486	39 (8,0)	R463C, V457A, G377D, N370S, T369M, W357R, E326K e IVS3+1G>A	BERGE-SEIDL <i>et al.</i> , 2017
Peruanos <sup>a</sup> e colombianos <sup>b</sup>	602	95 (15,8)	R86X, R159W, R170C, G234W, K237E, N409S, L483P, L483P + RecG or p.L483P+ Rec6b (p.L483P, Rec1 (p.L483P, p.A495P, p.V499V) +92G>A), RecD, E, ou AZRecTL (p.L483P, p.A495P, p.V499V, +92G>A), D66H, R250K, R316H, M400I, E427K, D482N, I528V, R534H, K(-)27R, E326K e T369M	VELEZ-PARDO <i>et al.</i> , 2019
<b>Brasileiros</b>	<b>304</b>	<b>37 (12,1)</b>	<b>K(-)27R, S196P, c.1049A&gt;G (H311R), c.1093G&gt;A (E326K), c. M361I, T369M, N370S, W378C, D409H, E388K, D443N, L444P, A456P, P68P, G325G, V460V e W533X</b>	<b>Presente estudo</b>

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

Embora alguns estudos do gene *GBA* tenham sido conduzidos em pacientes com DP em populações latino-americanas, esses são escassos e em sua maioria avaliaram apenas mutações pontuais como causa da doença nessas populações (EBLAN *et al.*, 2006; SPITZ *et al.*, 2008; SOCAL *et al.*, 2009; dos SANTOS *et al.*, 2010; de CARVALHO GUIMARÃES *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2019; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019) (Figura 34).

Na população brasileira, altamente miscigenada (GIOLO *et al.*, 2012), as informações referentes à associação de mutações no gene *GBA* e DP são limitadas, sendo restritas a seis estudos prévios (SPITZ *et al.*, 2008; SOCAL *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2019), três dos quais foram conduzidos por nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2016). Ao compararmos as frequências de mutações patogênicas (L444P, N370S e D409H) descritas anteriormente em populações brasileiras com as do presente trabalho (3,6%), observa-se uma frequência semelhante (3,5% e 3,7%) à identificada por dos Santos e colaboradores (2010) e de Carvalho Guimarães e colaboradores (2012), respectivamente. Ao analisarmos as mutações N370S, L444P e D409H em conjunto, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ao compará-los aos controles saudáveis ( $P = 0,046$ ; OR = 8,12; IC 95% 1,04 – 63,33), corroborando os achados da literatura (SPITZ *et al.*, 2008; SOCAL *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2019).

### 6.1.2 Alterações *missense* identificadas no gene *GBA*

Nesta casuística, foram identificadas 6 alterações *missense* classificadas como patogênicas [(c.1448T>C (L444P), c.1226A>G (N370S), c.1342G>C (D409H), c.1251G>C (W378C), c.1049A>G (H311R) e c.703T>C (S190P)] e estas foram observadas em 14 dos pacientes com DP (4,6%) e não em controles saudáveis. Esses resultados mostram uma frequência significativamente maior de mutações no gene *GBA* em pacientes com DP, quando comparados aos controles ( $P = 0,025$ ; OR = 10,24; IC 95% 1,33 – 78,61), indicando que essas variantes são fatores de susceptibilidade genética para o desenvolvimento de doença de Parkinson na população brasileira.

Diferentes meta-análises (MAO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018) demonstraram que variantes do *GBA*, como c.1448T>C (L444P) e c.1226A>G (N370S), são fatores de risco para a DP e estas representam, aproximadamente, 50% de todas as alterações identificadas neste gene em pacientes não judeus (SIDRANSKY *et al.*, 2009). No presente estudo, estas mutações foram observadas com maior frequência em probandos em relação aos controles. A mutação L444P foi identificada em 5 pacientes heterozigotos, o que representa uma frequência de 1,6%, similar à observada em populações brasileiras (SOCAL *et al.*, 2009; dos SANTOS *et al.*, 2010), japoneses (MITSUI *et al.*, 2009), russos (EMELYNANOV *et al.*, 2012), canadenses (HAN *et al.*, 2016) e colombianos e peruanos (VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Essa alteração, identificada em diferentes grupos étnicos, apresenta uma frequência que varia de 0,5% entre sérvios (KUMAR *et al.*, 2013) a 31,3% em judeus *Ashkenazi* (GAN-OR *et al.*, 2008) (Tabela 22).

Tabela 22: Síntese dos estudos que avaliaram a presença da mutação L444P no gene *GBA* em pacientes com DP e controles saudáveis

Grupo étnico	Probandos com DP	Probandos com a variante L444P	Frequência (%)	Controles	Controles com a variante L444P	Referência
Noruegueses	308	3	0,9	473	1	TOFT <i>et al.</i> , 2006
Italianos	387	8	2,0	482	1	DE MARCO <i>et al.</i> , 2007
Cingapurianos	323	8	2,4	347	0	TAN <i>et al.</i> , 2007
Portugueses	227	3	1,3	430	0	BRÁS <i>et al.</i> , 2007
Brasileiros	63	2	3,1	267	0	SPITZ <i>et al.</i> , 2007
Taiwaneses	91	1	1,1	92	0	ZIEGLER <i>et al.</i> , 2007
Taiwaneses	505	13	2,5	337	2	WU <i>et al.</i> , 2007
Norte-americanos	711	10	1,4	553	1	MATA <i>et al.</i> , 2008
Chineses	180	4	2,2	91	1	GUTT <i>et al.</i> , 2008
Norte-americanos	441	9	2,0	359	0	NICHOLS <i>et al.</i> , 2008
Judeus Ashkenazi	418	2	31,3	4134	4	GAN-OR <i>et al.</i> , 2008
Britânicos	779	11	1,4	257	0	NEUMANN <i>et al.</i> , 2009
Japoneses	526	8	1,5	544	0	MITSUI <i>et al.</i> , 2009
Gregos	170	2	1,1	132	0	KALINDERI <i>et al.</i> , 2009
Brasileiros (RS)	62	1	1,6	-	-	SOCAL <i>et al.</i> , 2009
Brasileiros	108	2	1,8	155	0	dos SANTOS <i>et al.</i> , 2010
Chineses	596	20	3,3	410	1	MAO <i>et al.</i> , 2010
Chineses	940	27	2,9	779	1	HUANG <i>et al.</i> , 2011
Gregos	199	6	3,0	205	1	MORAITOU <i>et al.</i> , 2011
Espanhois	219	6	2,7	186	0	SÉTO-SALVIA <i>et al.</i> , 2011
Chineses	391	11	2,8	413	0	SUN <i>et al.</i> , 2011
Franceses	192	2	1,0	177	0	LESAGE <i>et al.</i> , 2011
Europeus	1372	18	1,3	391	0	LESAGE <i>et al.</i> , 2012
Russos	324	6	1,8	239	2	EMELYNANOV <i>et al.</i> , 2012
Brasileiros	231	6	2,5	186	0	GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2012
Coreanos	275	2	0,7	291	0	CHOI <i>et al.</i> , 2012
Sérvios	358	2	0,5	347	1	KUMAR <i>et al.</i> , 2012
Chineses	189	6	3,2	443	0	ZHANG <i>et al.</i> , 2012
Portugueses	200	7	3,5	297	1	BRÁS <i>et al.</i> , 2012
Europeus	148	3	2,0	1959	3	NALLS <i>et al.</i> , 2013
Britânicos	183	2	1,1	283	0	DURAN <i>et al.</i> , 2013
Italianos	2303	47	2,0	1108	3	ASSELTA <i>et al.</i> , 2014
Tailandeses	465	15	3,2	394	1	PULKES <i>et al.</i> , 2014
Japoneses	135	12	8,8	100	0	LI <i>et al.</i> , 2014
Canadenses	221	4	1,8	110	0	HAN <i>et al.</i> , 2015
Suecos	1554	35	2,3	1964	3	RAN <i>et al.</i> , 2016
Belgas	263	3	1,1	535	1	CROSSIER <i>et al.</i> , 2016
Hungaros	121	3	2,5	122	0	TOROK <i>et al.</i> , 2016
Espanhois	519	13	2,5	536	6	JESÚS <i>et al.</i> , 2016
Colombianos e Peruanos	602	10	1,6	319	0	Velez-Pardo <i>et al.</i> , 2019
<b>Brasileiros</b>	<b>304</b>	<b>5</b>	<b>1,6</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>Presente estudo</b>

-: Não possuem informação.

Dentre os cinco pacientes identificados com a mutação L444P, três deles também são portadores das variantes A456P e V460V, correspondentes à sequência do pseudogene, indicando a presença do alelo recombinante *RecNcil* (HRUSKA *et al.*, 2008). Inúmeros estudos em pacientes com DP de diferentes populações têm identificado a presença do alelo recombinante *RecNcil* (EBLAN *et al.*, 2005; EBLAN *et al.*, 2006; CLARK *et al.*, 2007; MITSUI *et al.*, 2009; SETÓ-SALVIA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012; DURAN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015; MATA *et al.*, 2018). Nesta casuística, a frequência deste alelo foi de 0,9%, semelhante às aquelas observadas em populações brasileiras (0,9%; dos SANTOS *et al.*, 2010), peruanas (0,8%; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019), taiwanesas e japonesas (0,7%; HUANG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014).

A variante patogênica c.1226A>G (N370S) também foi identificada em cinco pacientes com DP correspondendo à frequência de 1,6%, igual àquela observada no estudo brasileiro realizado em pacientes do sul do Brasil (SOCAL *et al.*, 2009) e semelhante à identificada em portugueses (BRÁS *et al.*, 2009) e colombianos (VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Em estudos conduzidos nas populações judaicas, a ocorrência dessa variante foi muito maior (31,5%), o que corrobora a interferência de fatores intrínsecos a esta população, como o endocruzamento (AHARON-PERETZ *et al.*, 2004; GAN-OR *et al.*, 2008) (Tabela 23).

Tabela 23: Síntese dos estudos que avaliaram a presença do alelo N370S no gene *GBA* em pacientes com DP e controles saudáveis

Grupo étnico	Probandos com DP	Probandos com a variante N370S	Frequência (%)	Controles	Controles com a variante N370S	Referência
Judeus Azkenazi	73	23	31,5	1451	92	AHARON-PERETZ <i>et al.</i> , 2004
Norte-americanos	143	15	10,4	88	4	CLARK <i>et al.</i> , 2005
Portugueses	225	5	2,2	427	3	BRÁS <i>et al.</i> , 2007
Italianos	392	3	0,8	483	0	de MARCO <i>et al.</i> , 2007
Norte-americanos	444	6	1,4	356	3	NICHOLS <i>et al.</i> , 2008
Judeus Azkenazi	420	52	12,3	3805	235	GAN-OR <i>et al.</i> , 2008
Europeus	782	8	1,0	256	1	NEUMANN <i>et al.</i> , 2009
Japoneses	534	0	0,0	544	0	MITSUI <i>et al.</i> , 2009
Gregos	172	0	0,0	132	0	Kalinderi <i>et al.</i> , 2009
Brasileiros	62	1	1,6			SOCAL <i>et al.</i> , 2009
Brasileiros	108	1	0,9	155	0	dos SANTOS <i>et al.</i> , 2010
Chineses	322	6	1,8	298	2	HU <i>et al.</i> , 2010
Africanos	394	1	0,3	369	3	NISHIOKA <i>et al.</i> , 2010
Gregos	199	6	3,0	202	4	MORAITOU <i>et al.</i> , 2011
Espanhois	220	4	1,8	186	0	SÉTO-SALVIA <i>et al.</i> , 2011
Franceses	1346	42	3,1	389	2	LESAGE <i>et al.</i> , 2011a
Norte-africanos	192	2	1,0	177	0	LESAGE <i>et al.</i> , 2011b
Russos	327	2	0,6	240	0	EMEL'YANOV <i>et al.</i> , 2012
Brasileiros	234	3	1,3	186	0	de CARVALHO GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2012
Coreano	277	0	0,0	291	0	CHOI <i>et al.</i> , 2012
Sérvios	351	8	2,3	348	0	KUMAR <i>et al.</i> , 2012
Chineses	208	0	0,0	298	0	WANG <i>et al.</i> , 2012
Mexicanos	128	0	0,0	252	0	GONZALEZ-DEL-RINCÓN <i>et al.</i> , 2013
Britânicos	180	4	2,2	282	1	DURAN <i>et al.</i> , 2013
Europeus	151	0	0,0	1962	0	NALLS <i>et al.</i> , 2013
Tailandeses	480	0	0,0	395	0	PULKES <i>et al.</i> , 2014
Japoneses	147	0	0,0	100	0	LI <i>et al.</i> , 2014
Chineses	184	0	0,0	130	0	YU <i>et al.</i> , 2014
Canadenses	223	2	0,9	110	0	HAN <i>et al.</i> , 2015
Suecos	1566	10	0,6	1920	2	RAN <i>et al.</i> , 2016
Espanhois	527	5	0,9	542	0	JESÚS <i>et al.</i> , 2016
Hungaros	124	0	0,0	122	0	TÖRÖK <i>et al.</i> , 2016
Americanos	1.424	16	1,3	62	0	MATA <i>et al.</i> , 2016
Africanos	104	1	1,0	40	0	BARKHUIZEN <i>et al.</i> , 2017
Americanos	105	1	1,0	282	1	BARBER <i>et al.</i> , 2017
Colombianos e Peruanos	602	5	0,8	319	0	VELEZ-PARDO <i>et al.</i> , 2019
<b>Brasileiros</b>	<b>304</b>	<b>5</b>	<b>1,6</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>Presente estudo</b>

-: Não possui informação.

A frequência de ambas as mutações (L444P e N370S) (3,6%) observada nesta casuística de DP é comparável com os achados de Socal e colaboradores (2009) em amostra de pacientes brasileiros do Sul do Brasil (3,5%) e a de um grande estudo colaborativo, compreendendo 5691 indivíduos com DP (780 judeus *Ashkenazi* e 4911 não-*Ashkenazi*) em três continentes (América, Europa e Ásia) que identificaram essas mutações em 3% dos pacientes (SIDRANSKY *et al.*, 2009). Outros estudos em diferentes grupos étnicos mostram, excetuando os *Ashkenazi*, que as frequências dessas mutações se apresentam bem diversificadas: 2,9% em norte-americanos

(MATA *et al.*, 2016), 4,4% e 5,7% em canadenses (NOREAU *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2005), 4,5% em italianos (ASSELTA *et al.*, 2014) e 4,2% em ingleses (NEUMANN *et al.*, 2009).

Deve-se mencionar que as mutações L444P e N370S, descritas nesse estudo, foram somadas às identificadas anteriormente por nosso grupo (dos SANTOS *et al.*, 2010; de CARVALHO GUIMARÃES *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2016) e deram origem ao manuscrito intitulado “*Clinical profiles associated with LRRK2 and GBA mutations in Brazilians with Parkinson's disease*” (Apêndice A).

Inúmeros estudos conduzidos em diferentes populações com doença de Parkinson, apresentam frequências da mutação c.1342G>C (D409H) que variam de 0% (LESAGE *et al.*, 2011a; HAN *et al.*, 2016; CROSIERS *et al.*, 2016; JÉSUS *et al.*, 2016) a 17,6% (KUMAR *et al.*, 2012). No presente estudo, esta variante foi identificada em heterozigose apenas em um probando (0,3%) mas não em controles saudáveis, semelhante aos dados da literatura [(0,4%) BRÁS *et al.*, 2007; (0,5%) GUTTI *et al.*, 2008; (0,5%) GAN-OR *et al.*, 2008; (0,5%) KALINDERI *et al.*, 2009; (0,2%) HUANG *et al.*, 2011)], porém, diferente dos observados em sérvios (17,6%; KUMAR *et al.*, 2012), gregos (3,5%; MORAITOU *et al.*, 2011) e japoneses (2,8; LI *et al.*, 2014). Em contraste, estudos conduzidos em populações francesas (LESAGE *et al.*, 2011<sup>a</sup>), canadenses (HAN *et al.*, 2016), belgas (CROSIERS *et al.*, 2016) e espanholas (JÉSUS *et al.*, 2016) não identificaram essa variante em pacientes com a DP. Em uma recente meta-análise, Zhang e colaboradores (2018) mostrou que a variante (c.1342G>C) D409H aumenta o risco de desenvolvimento desta doença em diferentes populações, principalmente em europeus (ZHANG *et al.*, 2018).

As alterações c.1251G>A (W378C) e c.1049A>G (H311R), nunca antes associadas à DP, foram descritas em um estudo realizado nas regiões norte e nordeste do Brasil, através do rastreamento de mutações no gene *GBA* em 48 pacientes brasileiros, não relacionados, com a doença de Gaucher. Nesse estudo, os autores identificaram a variante 1251G>A (W378C) em homozigose em seis pacientes com a DG do tipo 1 (12,5%) (SIEBERT *et al.*, 2012). Diferentemente de Siebert e colaboradores (2012) no presente estudo, essa alteração foi identificada em homozigose em um paciente portador da doença de Parkinson (0,3%).

Até o momento, inexistem relatos na literatura sobre a presença dessa alteração associada à DP e estudos de expressão demonstram que o resíduo W378 localiza-se próximo ao domínio III, onde encontra-se o sítio catalítico da glucocerebrosidase (SMITH *et al.*, 2017). Além disso, as análises *in silico* indicaram, através de três programas de predição (Tabela 14), que essa alteração apresenta um efeito deletério, gerando modificações na função e estrutura da proteína, que pode ser explicado pela ausência do triptofano, que é altamente conservado entre as espécies e indica um grau de relevância funcional e estrutural (SIEBERT *et al.*, 2012). Com base nesses achados, por mais que essa alteração ainda não tenha sido associada à DP, sua elegibilidade como possível fator de risco à doença se intensifica.

A mutação *missense* c.1049A>G (H311R) foi descrita por Stone e colaboradores em 1999 e associada, quando em homozigose, às formas perinatais e letais da doença de Gaucher (STONE *et al.*, 1999; 2000). Os autores relataram que um casal de Cabo Verde, com relação consanguínea, possuía a alteração H311R. Esse casal gerou um feto natimorto com 31 semanas e um nativo de 30 semanas, que faleceu logo após o parto. Ambos foram identificados com a alteração H311R em homozigose e foram diagnosticados com doença de Gaucher (STONE *et al.*, 1999; 2000). Em 2017, essa mesma alteração foi descrita em uma menina venezuelana com a doença de Gaucher de 4 anos de idade (GOMEZ *et al.*, 2017) e, no Brasil, identificaram um paciente com a DG, apresentando a variante c.1049A>G associada à mutação N370S (SIEBERT *et al.*, 2012). Estudos têm sugerido que essa variante apresenta um efeito negativo sobre a estabilidade e a atividade catalítica da glicocerebrosidase (DVIR *et al.*, 2003; BRUMSHTEIN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2017), explicando a manifestação de doença de Gaucher do tipo 2 (STONE *et al.*, 1999; GOMEZ *et al.*, 2017) e, possivelmente, da DP, visto que foi observada em um paciente nesta casuística.

Até o momento, inexistem dados na literatura sobre a presença dessa mutação (c.1049A>G) associada à DP. Entretanto, neste estudo, dos seis indivíduos analisados na família (III.4, III.5, III.6, III.8, III.9 e III.10) (Figura 17), somente dois do sexo feminino apresentaram esta variante e apenas uma delas desenvolveu a DP, reforçando o conceito de penetrância reduzida e variável para mutações no gene *GBA* (ANHEIM *et al.*, 2012).

A variação genética pode ser mascarada pela penetrância, podendo ocorrer pela influência do ambiente ou de outros fatores genéticos (TRINH *et al.*, 2014). Assim, estudos têm sugerido que modificadores genéticos podem modular a penetrância e/ou expressividade da doença (DOMINGOS E KLEIN, 2018).

As análises *in silico* através das três ferramentas antes mencionadas indicaram que esta alteração altera a atividade da proteína, classificando-a como patogênica, semelhante ao observado na L444P, embora o efeito fenotípico dessa alteração sofra a influência de outros fatores (genéticos e ambientais) que modulam seu efeito. Além disso, estudos de expressão mostram que o resíduo H311 localiza-se próximo ao domínio III da proteína, sugerindo que essa mutação pode apresentar um efeito negativo sobre a atividade catalítica da glicocerebrosidase, dessa forma, o que pode explicar a manifestação da DP (DVIR *et al.*, 2003; LIOU *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2017). Assim, a soma das evidências sinaliza que a variante proteica H311R pode representar um fator de risco ao desenvolvimento da DP, com penetrância reduzida, embora, as análises funcionais sejam importantes para comprovar se esta alteração está realmente associada ao desenvolvimento da DP.

A variante rara c.703T>C (S196P), classificada como patogênica, foi previamente descrita na literatura associada à doença de Gaucher (HODAŇOVÁ *et al.*, 1999) e estudos subsequentes identificaram essa alteração em pacientes com DP (MITSUI *et al.*, 2009; MATA *et al.*, 2016; PARNETTI *et al.*, 2017). Mitsui e colaboradores (2009) rastreando mutações no gene *GBA* em 534 pacientes japoneses com DP, identificaram essa variante como parte de um alelo complexo (R120W-N188R-V191G-S196P-F213I) em um paciente (0,2%) com DP. De forma semelhante, em norte-americanos, Parnetti e colaboradores (2017) também observaram esta variante em probandos com DP, porém fazendo parte do alelo complexo (S196P-A456P). Em contrapartida, essa alteração foi identificada isoladamente em pacientes norte-americanos, de maneira similar aos nossos achados. Neste estudo, 0,3% dos pacientes possuíam essa alteração, frequência semelhante àquela identificada em pacientes norte-americanos (0,1%) (MATA *et al.*, 2016; ADLER *et al.*, 2017).

Além das variantes patogênicas *missense* relatadas acima, outras 7 (A456P, D443N, E388K, E326K, T369M, M361I e c.38A>G [K(-)27R]) foram identificadas e classificadas como neutras através dos programas de predição. Dentre elas, a alteração c.1483G>C (A456P) foi observada isoladamente em um paciente (0,3%),

mas não em controles saudáveis. As análises *in silico* apontaram que essa alteração não afeta a atividade da proteína GBA e aparenta não ter valor patogênico isoladamente. Porém, associada a outras mutações em alelo recombinante, como o *RecNcil*, passa a influenciar no desenvolvimento da DP, sendo considerada um fator de risco para o desenvolvimento da mesma (CROSSIER *et al.*, 2016; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019).

Em 2009, Neumann e colaboradores analisaram toda sequência do gene *GBA*, em 194 pacientes com DP de uma população norte-africana e 177 controles, detectando a variante c.1444G>A (D443N) em uma frequência igual a 0,1%, mas não em controles. Da mesma forma, essa variante foi identificada em europeus (0,03%, ASSELTA *et al.*, 2014), norte-americanos (0,07%, MATA *et al.*, 2016) e latino-americanos (0,2%, VELEZ-PARDO *et al.*, 2018). Em contrapartida, alguns estudos identificaram essa alteração em controles saudáveis, mas não em pacientes com DP (LESAGE *et al.*, 2011; NALLS *et al.*, 2013). Neste estudo, a variante c.1444G>A (D443N) foi identificada em dois pacientes com DP (frequência = 0,7%) e em um controle saudável (1%) e as análises *in silico* indicaram que esta alteração não prejudica a atividade da proteína GBA. Esses dados são apoiados por uma recente meta-análise, incluindo 50 estudos em diferentes grupos étnicos, e apontaram que essa variante parece não representar um fator de risco para o desenvolvimento da DP (ZHANG *et al.*, 2018).

Neste estudo, a alteração de significado incerto c.1401G>A (E388K) foi identificada em uma frequência igual a 0,3%, semelhante à observada em populações com descendência europeia (0,2%; BENITEZ *et al.*, 2016) e inglesa (0,5%; DURAN *et al.*, 2016). Ao realizarem o rastreamento completo do gene *GBA*, Lesage e colaboradores (2011) encontraram uma frequência reduzida (0,07%) da mutação E388K em pacientes com DP. Por outro lado, Brás e colaboradores (2009) identificaram essa variante em 2 controles (0,5%), e não em pacientes com DP, da mesma forma como observado em colombianos (VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Ao realizarem uma meta-análise, Zhang e colaboradores (2018), mostraram que esta alteração não apresenta risco para o desenvolvimento da DP, tendo em vista que vários trabalhos haviam reportado a inexistência dessa alteração em diferentes populações europeias (NEUMANN *et al.*, 2009; KALINDERI *et al.*, 2009; JÉSUS *et al.*, 2016), asiáticas (ZIEGLER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2014) e norte-americanas (HAN *et*

*al.*, 2015). Além disso, essa alteração tem sido classificada como rara e o significado clínico associado à DP permanece desconhecido (ASSELTA *et al.*, 2014; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019).

Diferentes estudos consideram as variantes c.1093G>A (E326K) e c.1223C>T (T369M) como polimorfismos neutros (MATA *et al.*, 2016; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019). Porém, evidências crescentes mostram que a variante c.1093G>A (E326K) tem sido considerada um fator de risco para a DP, visto que estudos relacionando a expressão da glucocerebrosidase sugerem uma redução da atividade enzimática (MALINI *et al.*, 2014). Além disso, tem-se observado um fenótipo agravado com declínio cognitivo em pacientes com DP, quando associado às mutações severas, como L444P (HOROWITZ *et al.*, 2011; DURAN *et al.*, 2013; MATA *et al.*, 2015) e também uma progressão mais rápida da disfunção cognitiva e dos sintomas motores (DAVIS *et al.*, 2016).

A frequência desse polimorfismo no presente estudo (1,6%) foi semelhante àquelas identificadas em uma população brasileira (SPITZ *et al.*, 2008) e conforme a Tabela 24, verifica-se uma frequência variada entre os pacientes com DP portadores dessa alteração e controles saudáveis em diferentes populações.

Berge-Seidl e colaboradores (2017) em um estudo caso-controle em uma população escandinava, confirmaram que a c.1093G>A (E326K) em heterozigose, aumenta o risco de desenvolvimento da DP, e esses achados podem ser evidenciados por meio de recentes meta-análises, mostrando que essa variante elevou o risco de desenvolvimento de DP em diferentes populações (HUANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, a análise de subgrupos étnicos apresentou uma prevalência acentuada dessa variante em populações europeias e asiáticas em contraste com as demais populações analisadas (africanos, hispânicos, asiáticos orientais e uma população miscigenada) (ZHANG *et al.*, 2018).

Tabela 24: Síntese dos estudos que avaliaram a presença do polimorfismo E326K no gene *GBA* em pacientes com DP e controles saudáveis

Grupo étnico	Probandos			Controles			Referência
	Probandos com DP	com a variante E326K	Frequência (%)	Controles	com a variante E326K	Frequência (%)	
Portugueses	228	2	0,9	427	3	0,7	BRÁS <i>et al.</i> , 2007
Brasileiros	64	1	1,5	267	0	0	SPITZ <i>et al.</i> , 2007
Taiwaneses	422	28	6,2	348	11	3,1	ZIEGLER <i>et al.</i> , 2007
Europeus	790	0	0	257	0	0	NEUMANN <i>et al.</i> , 2009
Gregos	171	1	0,8	131	1	0,7	KALINDERI <i>et al.</i> , 2009
Espanhóis	225	0	0	186	0	0	SETÓ-SALVIA <i>et al.</i> , 2011
Europeus	1342	43	3,2	383	8	2,0	LESAGE <i>et al.</i> , 2011
Coreanos	277	0	0	100	0	0	CHOI <i>et al.</i> , 2012
Britânicos	185	0	0	283	0	0	DURAN <i>et al.</i> , 2013
Canadenses	1450	90	2,2	1872	65	3,5	RAN <i>et al.</i> , 2016
Belgas	254	12	4,7	521	15	2,9	CROSIERS <i>et al.</i> , 2016
Espanhóis	516	16	3,1	529	13	0,4	JÉSUS <i>et al.</i> , 2016
Peruanos e colombianos	602	8	1,1	319	1	0,3	VELEZ-PARDO <i>et al.</i> , 2019
<b>Brasileiros</b>	<b>304</b>	<b>5</b>	<b>1,6</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>	<b>Presente estudo</b>

No presente estudo, o polimorfismo c.1223C>T (T369M) foi identificado em três pacientes com DP. Esta alteração é conhecida por gerar uma pequena redução na atividade enzimática da *GBA* e estudos sugerem que esta pode aumentar o risco de desenvolvimento da DP, porém, com um efeito reduzido, semelhante aos das variantes genéticas comuns identificadas em estudos de associação ampla do genoma (MALLET *et al.*, 2016; EMELYANOV *et al.*, 2018). Entretanto, diferentes estudos relatam que pacientes com DP e controles saudáveis apresentam frequências semelhantes dessa alteração em diferentes etnias (BRÁS *et al.*, 2006, CLARK *et al.*, 2007; NICHOLS *et al.*, 2009; LESAGE *et al.*, 2011b; HAN *et al.*, 2016; JESÚS *et al.*, 2016; BARKHUIZEN *et al.*, 2017; SENKEVICH *et al.*, 2018). Sendo a frequência observada em nosso estudo (1%) idêntica à de pacientes europeus e não em controles saudáveis, corroborando dados da literatura (SETÓ-SALVIA *et al.*, 2011; LESAGE *et al.*, 2011b).

A variante c.1200G>A (M361I) foi primeiramente descrita em um paciente italiano com doença de Gaucher (FILOCAMO *et al.*, 2002). Um estudo conduzido por Velez-Pardo e colaboradores (2019) analisou toda sequência do gene *GBA* em 602 pacientes com a doença de Parkinson (131 colombianos e 471 peruanos) e 319 controles (164 colombianos e 155 peruanos) da população latino-americana e detectaram essa variante de significado incerto em um controle peruano. Em

contrapartida, essa variante foi identificada em heterozigose em nossa casuística com uma frequência igual a 0,3% em probandos com DP, e não em controles. As análises *in silico* indicaram que esta alteração não prejudica a atividade da proteína, classificando-a como neutra. Com base nesses achados, sugerimos que esta alteração parece não representar um fator de risco para o desenvolvimento da DP em nossa casuística. Porém, outros estudos devem ser realizados a fim de testar a real associação desta variante com a DP.

O polimorfismo c.38A>G [K(-)27R] foi descrito por Rosemberg e colaboradores (2006) em um estudo realizado em 40 pacientes brasileiros com a doença de Gaucher. Porém, em nossa casuística, foi identificado em cinco pacientes com DP e em três indivíduos saudáveis, concordando com estudos em populações latino-americanas (VELEZ-PARDO *et al.*, 2019) e norte-americanas (MATA *et al.*, 2017). Estudos mostram que essa alteração ocorre no peptídeo sinal composto por 39 resíduos o qual é removido da proteína madura durante o processamento pós-traducional. Assim, por alterar um aminoácido no peptídeo sinal, acredita-se que o transporte citoplasmático da proteína glucocerebrosidase seja afetado (ROZENBERG *et al.*, 2006). No entanto, as análises *in silico* classificam esta variante como neutra, indicando que ela aparentemente não afeta a estrutura do peptídeo sinal.

As análises do gene *GBA*, conduzidas por Nishioka e colaboradores (2010) em 33 probandos de DP familiar e 372 controles da população tunisiana, identificaram a variante c.38A>G em 14 pacientes (3,54%) e 16 controles (4,3%). Em contraste, Alcalay e colaboradores (2016) realizaram o rastreamento de mutações em toda a extensão do gene *GBA* em 517 probandos e 252 controles da população norte-americana e identificaram uma frequência reduzida (0,4%) dessa variante em pacientes com DP. Da mesma forma como àquela observada (0,09%) em uma triagem em larga escala do gene *GBA* em pacientes de uma coorte europeia (LESAGE *et al.*, 2011a). Subsequentemente, esse mesmo grupo de pesquisadores, analisando 194 indivíduos com DP e 177 controles da população norte africana, encontrou uma frequência de 1,03%, semelhante àquela observada em pacientes de nosso estudo (1,6%).

Com base nesses achados, devido à alta frequência identificada tanto em pacientes com a DP e controles saudáveis, sugere-se que essa variante seja um provável polimorfismo neutro, corroborando estudos de Nishioka e colaboradores (2010).

### 6.1.3 Alterações sinônimas identificadas no gene *GBA*

Foram identificadas três variantes sinônimas [c.326G>A (P68P); c.1092G>A (G325G) e c.1497C>T (V460V)] em uma frequência igual a 1,6%, 0,7% e 1,0%, em pacientes com DP, respectivamente. Dentre essas, as variantes c.326G>A (P68P) e c.1092G>A (G325G) foram relatadas no banco de dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (dbSNP), porém não apresentaram relação com a DP. Em contrapartida, a c.1497C>T (V460V) que faz parte do alelo recombinante RecNcil (EYAL *et al.*, 1990; TAYEBI *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2015; VELEZ-PARDO *et al.*, 2019) não foi identificada isoladamente neste estudo.

As análises *in silico* utilizando a ferramenta *MutationTaster*, classificaram as variantes c.326G>A (P68P) e c.1092G>A (G325G) como neutra e a c.1497C>T (V460V) como patogênica. Apesar das variantes sinônimas serem reconhecidas como silenciosas, evidências sugerem que estas podem induzir erros no processo de *splicing*, impactando o fenótipo da doença (SAUNA E KIMCHI-SARFATY, 2011).

### 6.1.4 Alteração sem sentido (*nonsense*) identificada no gene *GBA*

A variante c. 1598G>A (W533X), localizada no exon 11, nunca descrita na literatura, nem mesmo na versão mais atualizada do dbSNP (NCBI dbSNP Build 2018) (Janeiro de 2019), foi observada apenas em um paciente (0,3%) e ausente no grupo de indivíduos saudáveis. A análise *in silico*, utilizando a ferramenta *MutationTaster*, sugere que esta variante altera a atividade da proteína, gerando um códon de parada, levando à formação de uma proteína não funcional.

O probando, identificado portador dessa variante, é natural de Manaus (e manifestou a doença precocemente, aos 47 anos, não apresentando histórico familiar da DP. Após inúmeros contatos com o médico, não foi possível reunir informações clínicas do paciente. Ressalta-se que enviamos ao *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, uma solicitação para registrar essa variante como sendo identificada em um probando da população brasileira.

### 6.1.5 Alterações identificadas nos introns e na região promotora 5' UTR e 3'UTR

Nós identificamos oito alterações intrônicas, dentre essas, três (rs2075569; rs2974923, rs140335079) já haviam sido descritas na literatura e identificadas em pacientes com DP, porém, estudos não observaram nenhuma associação patogênica entre essas alterações e a DP (MITSUI *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2017). Cinco dessas alterações (rs976829552; rs3115534; rs7416991; rs2070679 e rs2974924) foram descritas no banco de dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (dbSNP), porém, ainda não foram relacionadas a nenhum tipo de doença.

Dentre as quatro variantes identificadas na região promotora 5' UTR e 3' UTR (rs2070679; rs188978150, rs1141801 e rs368275143), a variante rs188978150 (c.-202A>G), descrita pela primeira vez em um estudo realizado em 51 pacientes espanhóis com a doença de Gaucher (ALFONSO *et al.*, 2001) que identificaram uma paciente com DG tipo 1, portando tal variante em conjunto com as mutações N370S e IVS4-2A>G. Subsequentemente, o mesmo grupo, sugeriu que a c.-202A>G poderia atuar na regulação do gene, diminuindo a sua expressão gênica (ALFONSO *et al.*, 2011). Em nossa casuística, observamos uma frequência igual a 0.3% em pacientes com DP e não observamos essa variante no grupo de indivíduos saudáveis. Até o momento, essa variante nunca foi descrita como associada à DP. A análise *in silico*, através do programa *Splicing Finder*, revelou que essa variante parece não afetar o reconhecimento dos sítios de encadeamento, porém, de acordo com o *Human Gene Mutation Database*, variantes como esta devem ser sempre vistas com cautela pelo fato de estarem em uma região regulatória (HGMD, 2017).

### 6.1.6. A influência de mutações no gene *GBA* no fenótipo da Doença de Parkinson

Dentre os quinze probandos identificados com as mutações patogênicas (L444P, N370S, D409H, H311R, W378C, S196P, V460V e W533X) no gene *GBA*, treze manifestaram a doença antes dos 50 anos de idade (Tabela 17).

Segundo Bonifati (2014), os pacientes com mutações patogênicas no gene *GBA* tendem a manifestar os sintomas iniciais de DP precocemente, antes dos 50 anos. De fato, vários estudos conduzidos em pacientes com esta doença mostraram que a idade de início dos sintomas mostra-se mais precocemente em portadores de mutações quando comparados aos não portadores. Assim, nossos dados corroboram

os estudos anteriores em pacientes com a DP (CLARK *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2007; NICHOLS *et al.*, 2009; SIDRANSKY E LOPEZ, 2012; RAN *et al.*, 2016; MALEK *et al.*, 2018).

Neste estudo a frequência de mutações em pacientes com história familiar foi menor (29,7%) do que em pacientes de casos isolados (70,3%) (Tabela 18), não sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,300$ ) indo ao encontro das observações de NEUMANN *et al.*, 2009; SCHAPIRA, 2015 e MULLIN *et al.*, 2018.

Em relação à clínica, verifica-se que os probandos com mutações patogênicas no gene *GBA* apresentam tremor, e em sua maioria, este foi o sintoma inicial, corroborando as observações de outros pacientes portadores de mutações no gene *GBA* (WU *et al.*, 2007; ZIEGLER *et al.*, 2007; GOKER-ALPAN *et al.*, 2008; MATA *et al.*, 2008; NEUMANN *et al.*, 2009). Apesar de alguns estudos relatarem nesses pacientes uma maior incidência de declínio cognitivo (GOKER-ALPAN *et al.*, 2008; NEUMANN *et al.*, 2009; SIDRANSKY *et al.*, 2009; ALCALAY *et al.*, 2012; SETO-SALVIA *et al.*, 2012; WINDER-RHODES *et al.*, 2013), em nossa casuística, nenhum dos portadores, disponível para comparação, apresentou esse sintoma (Tabela 18). Além disso, sete pacientes apresentavam disautonomia, tal como os observados por Brockmann e colaboradores (2011) em pacientes alemãs com DP, sugerindo que aqueles com mutações no *GBA* são mais propensos a desenvolver disfunção autonômica em relação aos não mutados.

### 6.3 Gene *CHCHD2*

Dentre as recentes descobertas relativas a causas genéticas associadas à DP, destaca-se o relato de mutações no gene *CHCHD2*, segregando de forma autossômica dominante em famílias japonesas (FUNAYAMA *et al.*, 2015). No estudo desses pesquisadores, foram identificadas três variantes gênicas [c.182C>T (T61I), c.434G>A (R145Q) e 300+5G>A] associadas à DP. A partir desses achados, estudos do gene *CHCHD2* foram realizados em pacientes com DP de diferentes populações a fim de identificar a presença de variantes patogênicas ou de risco. Assim, nove variantes foram identificadas de acordo com a literatura (FUNAYAMA *et al.*, 2015; FOO *et al.*, 2015; JANSEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; KOSCHMIDDER *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

Shi e colaboradores (2016), através de uma análise do gene *CHCHD2*, conduzida em probandos da população chinesa, identificaram a variante patogênica c.182C>T (T61I) em três pacientes com DP, além de cinco variantes já descritas (c.-11G>A, c.-9T>G1, c.5C>T, c.51-127G>A, c.456+125G>A). Porém, a mutação c.182C>T (T61I), foi a única confirmada como provável causa da DP. A variante c.5C>T (P2L) foi considerada pelos autores como um fator de risco para DP esporádica em populações chinesas por apresentar uma frequência maior entre os pacientes com DP esporádica em comparação ao grupo controle ( $P = 0,03$ ) (SHI *et al.*, 2016). Esse achado foi confirmado por uma meta-análise, realizada em uma população asiática ( $P = 0,0002$ ) (LI *et al.*, 2016).

A fim de verificar o efeito patogênico das mutações encontradas, um estudo funcional em modelo transgênico de *Drosophila* foi desenvolvido e confirmou como patogênicas as variantes c.182C>T (T61I) e c.434G>A (R145Q) (TIO *et al.*, 2017). Além disso, a variante c.5C>T (P2L), localizada no exon 1, foi considerada com um possível fator de risco para a DP esporádica (TIO *et al.*, 2017).

Estudos realizados em populações caucasianas com DP identificaram variantes de significado incerto que poderiam estar associadas à DP. Jansen e colaboradores (2015), na população europeia, descobriram três variantes no exon 2 [c.94G>A (A32T), c.101C>T (P34L) e c.238A>G (I80V)] em quatro pacientes com DP. Em contrapartida, em alemães identificaram uma variante *nonsense* no exon 3 c.376C>T (Q126X) em um paciente com DP esporádica (KOSCHMIDDER *et al.*, 2016). Nesses estudos, nenhuma variante considerada patogênica foi identificada, além disso, a frequência dessas variantes foi inferior a 1%.

Os resultados aqui apresentados representam as primeiras descobertas relativas ao gene *CHCHD2* em pacientes com DP familiar de origem latino-americana, cuja etnia é representada por uma complexa miscigenação, sendo nossos achados consistentes com resultados de estudos anteriores, em diferentes grupos étnicos, que também falharam na detecção de mutações *CHCHD2* em pacientes com DP (LIU *et al.*, 2015; OGAKI *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2016; GAGLIARDI *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2016; TEJERA-PARRADO *et al.*, 2016; RUBINO *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2017).

Podemos concluir que a ausência de variantes patogênicas ou de risco no gene *CHCHD2* em nossas amostras revela que as mutações *CHCHD2* podem não ser uma causa comum de DP familiar no Brasil.

Considerando a escassez de estudos, bem como, o fato das variantes identificadas em *CHCHD2* parecem se restringir a populações específicas, torna-se evidente a necessidade de maiores investigações sobre a contribuição etiológica de mutações no gene *CHCHD2* em pacientes com DP a nível mundial e, principalmente, em populações de intensa miscigenação étnica como as latino-americanas.

## 7 CONCLUSÃO

- A análise do gene *GBA*, conduzida em 304 probandos brasileiros com DP, identificou a presença de dezessete variantes exônicas, sendo 13 *missense*, 3 sinônimas e 1 *nonsense* em 37 pacientes (12,1%).
- A partir das análises *in silico*, foram classificadas como patogênicas seis alterações *missense* (L444P, N370S, D409H, H311R, W378C, S196P), uma sinônima (V460V) e uma *nonsense* (W533X).
- Foram identificadas no gene *GBA* três variantes c.1049A>G (H311R) e c.1251G>C (W378C) e c.1598G>A (W533X), nunca descritas anteriormente em pacientes com DP.
- Ao compararmos os resultados de portadores de mutações patogênicas no gene *GBA* (L444P, N370S, D409H, H311R, W378C, S196P, V460V e W533X) e controles brasileiros saudáveis observamos que as diferenças são estatisticamente significativas ( $P = 0,012$ ; OR: 13,07; IC95%: 1,72 - 98-98).
- A partir da análise molecular do gene *CHCHD2* em 122 probandos com DP familiar, compatível com herança autossômica dominante (AD), não evidenciamos variantes gênicas. A ausência dessas variantes em nossas amostras revela que mutações no *CHCHD2* podem não ser uma causa comum de DP familiar no Brasil, sugerindo que são causas raras da DP em pacientes brasileiros e possivelmente específicas de populações asiáticas.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, G. D. M., Valença, D. C. T., Júnior, M. C., da Silva, C. P., Pereira, J. S., Leite, M. A. A., ... & Della Coletta, M. V. (2016). Autosomal dominant Parkinson's disease: Incidence of mutations in LRRK2, SNCA, VPS35 and GBA genes in Brazil. *Neuroscience letters*, 635, 67-70.
- Adler, C. H., Beach, T. G., Shill, H. A., Caviness, J. N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M. N., ... & Davis, K. (2017). GBA mutations in Parkinson disease: earlier death but similar neuropathological features. *European Journal of Neurology*, 24(11), 1363-1368.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248.
- Aharon-Peretz, J., Rosenbaum, H., & Gershoni-Baruch, R. (2004). Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*, 351(19), 1972-1977.
- Alcalay RN , Levy OA , Waters CC , Fahn S , Ford B , Kuo SH , Mazzoni P , Pauciulo MW , Nichols WC , Gan-Or Z , Rouleau GA , Chung WK , Wolf P , Oliva P , Keutzer J , Marder K , & Zhang X (2015) Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*, 138, 2648–2658.
- Alcalay, R. N., Dinur, T., Quinn, T., Sakanaka, K., Levy, O., Waters, C., ... & Nichols, W. (2014). Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. *JAMA neurology*, 71(6), 752-757.
- Alfonso, P., Pampín, S., García-Rodríguez, B., Tejedor, T., Domínguez, C., Rodríguez-Rey, J. C., ... & Pocoví, M. (2011). Characterization of the c.(-203) A> G variant in the glucocerebrosidase gene and its association with phenotype in Gaucher disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(3-4), 365-369.
- Amaral, C. E. D. M., Lopes, P. F., Ferreira, J. C. C., Alves, E. A. C., Montenegro, M. V. B., Costa, E. T. D., ... & Santana-da-Silva, L. C. (2019). GBA mutations p. N370S and p. L444P are associated with Parkinson's disease in patients from Northern Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 77(2), 73-79.
- Anheim, M., Elbaz, A., Lesage, S., Durr, A., Condroyer, C., Viallet, F., ... & Brice, A. (2012). Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology*, 78(6), 417-420.
- Aras, S., Bai, M., Lee, I., Springett, R., Hüttemann, M., & Grossman, L. I. (2015). MNRR1 (formerly *CHCHD2*) is a bi-organellar regulator of mitochondrial metabolism. *Mitochondrion*, 20, 43-51.
- Asselta, R., Rimoldi, V., Siri, C., Cilia, R., Guella, I., Tesei, S., ... & Goldwurm, S. (2014). Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(11), 1215-1220.
- Bandrés-Ciga, S., Price, T. R., Barrero, F. J., Escamilla-Sevilla, F., Pelegrina, J., Arepalli, S., ... & Rivera, A. (2016). Genome-wide assessment of Parkinson's disease in a Southern Spanish population. *Neurobiology of Aging*, 45, 213-e3.
- Barber, T. R., Lawton, M., Rolinski, M., Evetts, S., Baig, F., Ruffmann, C., ... & Bandmann, O. (2017). Prodromal parkinsonism and neurodegenerative risk stratification in REM sleep behavior disorder. *Sleep*, 40(8).
- Barkhuizen, M., Anderson, D. G., van der Westhuizen, F. H., & Grobler, A. F. (2017). A molecular analysis of the GBA gene in Caucasian South Africans with Parkinson's disease. *Molecular genetics & Genomic Medicine*, 5(2), 147-156.

- Barneveld, R. A., Keizer, W., Tegelaers, F. P. W., Ginns, E. I., van Kessel, A. G., Brady, R. O., ... & Reuser, A. J. J. (1983). Assignment of the gene coding for human  $\beta$ -glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Human Genetics*, *64*(3), 227-231.
- Bendor, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, *79*(6), 1044-1066.
- Benitez, B. A., Davis, A. A., Jin, S. C., Ibanez, L., Ortega-Cubero, S., Pastor, P., ... & Cruchaga, C. (2016). Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 29.
- Berganzo, K., Tijero, B., Gonzalez-Eizaguirre, A., Somme, J., Lezcano, E., Gabilondo, I., ... & Gómez-Esteban, J. C. (2016). Motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease and their impact on quality of life and on different clinical subgroups. *Neurología (English Edition)*, *31*(9), 585-591.
- Berge-Seidl, V., Pihlstrøm, L., Maple-Grødem, J., Forsgren, L., Linder, J., Larsen, J. P., ... & Toft, M. (2017). The GBA variant E326K is associated with Parkinson's disease and explains a genome-wide association signal. *Neuroscience Letters*, *658*, 48-52.
- Beutler, E., Gelbart, T., Balicki, D., Demina, A., Adusumalli, J., Grinzaid, K. A., ... & Liou, B. B. (1996). Gaucher disease: four families with previously undescribed mutations. *Proceedings of the Association of American Physicians*, *108*(3), 179-184.
- Bohlhalter, S., & Kägi, G. (2011). Parkinsonism: heterogeneity of a common neurological syndrome. *Swiss Med Wkly*, *141*(11), w13293.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., Swieten, J. V., ... & Heutink, P. (2003). DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological Sciences*, *24*(3), 159-160.
- Bose, A., Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal Neurochem*, *139* (1), 216-231.
- Bozi, M., Papadimitriou, D., Antonellou, R., Moraitou, M., Maniati, M., Vassilatis, D. K., ... & Theofilopoulos, D. (2014). Genetic assessment of familial and early-onset Parkinson's disease in a Greek population. *European Journal of Neurology*, *21*(7), 963-968.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Steur, E. N. J., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197-211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 121-134.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., Bradley, R. M., & Shapiro, D. (1966). Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase-cleaving enzyme in Gaucher's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *45*(7), 1112-1115.
- Bras, J., Paisan-Ruiz, C., Guerreiro, R., Ribeiro, M. H., Morgadinho, A., Januario, C., ... & Singleton, A. (2009). Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiology of Aging*, *30*(9), 1515-1517.
- Breckenridge, C. B., Berry, C., Chang, E. T., Sielken Jr, R. L., & Mandel, J. S. (2016). Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS one*, *11*(4), e0151841.
- Brockmann, K., Srujijes, K., Hauser, A. K., Schulte, C., Csoti, I., Gasser, T., & Berg, D. (2011). GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology*, *77*(3), 276-280.

- Brumshtein, B., Wormald, M. R., Silman, I., Futerman, A. H., & Sussman, J. L. (2006). Structural comparison of differently glycosylated forms of acid- $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(12), 1458-1465.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010).  $\alpha$ -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329(5999), 1663-1667.
- Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S. J., Leprêtre, F., Hulihan, M. M., ... & Le Rhun, E. (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *The American Journal of Human Genetics*, 89(3), 398-406.
- Chen, J., Li, W., Zhang, T., Wang, Y. J., Jiang, X. J., & Xu, Z. Q. (2014). Glucocerebrosidase gene mutations associated with Parkinson's disease: a meta-analysis in a Chinese population. *PLoS One*, 9(12), e115747.
- Choi, J. M., Kim, W. C., Lyoo, C. H., Kang, S. Y., Lee, P. H., Baik, J. S., ... & Kim, Y. J. (2012). Association of mutations in the glucocerebrosidase gene with Parkinson disease in a Korean population. *Neuroscience Letters*, 514(1), 12-15.
- Clark, L. N., Ross, B. M., Wang, Y., Mejia-Santana, H., Harris, J., Louis, E. D., ... & Ford, B. (2007). Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 69(12), 1270-1277.
- Crosiers, D., Verstraeten, A., Wauters, E., Engelborghs, S., Peeters, K., Mattheijssens, M., ... & Cras, P. (2016). Mutations in glucocerebrosidase are a major genetic risk factor for Parkinson's disease and increase susceptibility to dementia in a Flanders-Belgian cohort. *Neuroscience Letters*, 629, 160-164.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant  $\alpha$ -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305(5688), 1292-1295.
- da Silva, C. P., Abreu, G. D. M., Acero, P. H. C., Júnior, M. C., Pereira, J. S., Sarah, R. D. A., ... & Vasconcellos, L. F. R. (2017). Clinical profiles associated with LRRK2 and GBA mutations in Brazilians with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 381, 160-164.
- Davis, M. Y., Johnson, C. O., Leverenz, J. B., Weintraub, D., Trojanowski, J. Q., Chen-Plotkin, A., ... & Davis, M., Trinh, K., Thomas, R., Whittley, B., Montine, T., & Pallanck, L. (2015). Using a *Drosophila* GBA deficiency model to understand the role of GBA in Parkinson's disease (P2. 146).
- de Carvalho Guimarães, B., Pereira, A. C. V., da Costa Rodrigues, F., dos Santos, A. V., Júnior, M. C., dos Santos, J. M., ... & da Silva, D. J. (2012). Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients. *Parkinsonism & related disorders*, 18(5), 688-689.
- De Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525-535.
- De Marco, E. V., Annesi, G., Tarantino, P., Rocca, F. E., Provenzano, G., Civitelli, D., ... & Nicoletti, G. (2008). Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(3), 460-463.
- De Rijk, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M. B., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., ... & Trenkwalder, C. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of. *Neurology*, 54(5), S21-S23.
- Delamarre, A., & Meissner, W. G. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *La Presse Médicale*.
- Deng, H. X., Shi, Y., Yang, Y., Ahmeti, K. B., Miller, N., Huang, C., ... & Corbett, N. J. (2016). Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. *Nature genetics*, 48(7), 733.

- Deng, H., Gao, K., & Jankovic, J. (2013). The VPS35 gene and Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(5), 569-575.
- DePaolo, J., Goker-Alpan, O., Samaddar, T., Lopez, G., & Sidransky, E. (2009). The association between mutations in the lysosomal protein glucocerebrosidase and parkinsonism. *Movement Disorders*, 24(11), 1571-1578.
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., & Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), e67-e67.
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C. J., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Guedes, L. C., ... & de Graaff, E. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72(3), 240-245.
- Dinur, T., Osiecki, K. M., Legler, G., Gatt, S., Desnick, R. J., & Grabowski, G. A. (1986). Human acid beta-glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(6), 1660-1664.
- Domingo, A., & Klein, C. (2018). Genetics of Parkinson disease. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 147, pp. 211-227). Elsevier.
- Dorsey, E., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., & Tanner, C. M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384-386.
- Dorsey, E., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's disease*, 8(s1), S3-S8.
- dos Santos, A. V., Pestana, C. P., da Silva Diniz, K. R., Campos, M., Abdalla-Carvalho, C. B., de Rosso, A. L. Z., ... & Santos-Rebouças, C. B. (2010). Mutational analysis of GIGYF2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 485(2), 121-124.
- Duran, R., Mencacci, N. E., Angeli, A. V., Shoai, M., Deas, E., Houlden, H., ... & Schapira, A. H. (2013). The glucocerebrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. *Movement Disorders*, 28(2), 232-236.
- Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A. A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A. H., & Sussman, J. L. (2003). X-ray structure of human acid- $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO reports*, 4(7), 704-709.
- Eblan, M. J., Nguyen, J., Ziegler, S. G., Lwin, A., Hanson, M., Gallardo, M., ... & Sidransky, E. (2006). Glucocerebrosidase mutations are also found in subjects with early-onset parkinsonism from Venezuela. *Movement disorders*, 21(2), 282-283.
- Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y. I., Zenvirt, S., ... & Kaestner, K. H. (2012). A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One*, 7(5), e36458.
- Emamzadeh, F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 21.
- Emelyanov, A., Boukina, T., Yakimovskii, A., Usenko, T., Drosdova, A., Zakharchuk, A., ... & Pchelina, S. (2012). Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia. *Movement Disorders*, 27(1), 158-159.
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a033118.

Evans, A. H., Lawrence, A. D., Potts, J., MacGregor, L., Katzenschlager, R., Shaw, K., ... & Lees, A. J. (2006). Relationship between impulsive sensation seeking traits, smoking, alcohol and caffeine intake, and Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *77*(3), 317-321.

Eyal, N., Wilder, S., & Horowitz, M. (1990). Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene*, *96*(2), 277-283.

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *991*(1), 1-14.

Fan, T. S., Lin, H. I., Lin, C. H., & Wu, R. M. (2016). Lack of CHCHD2 mutations in Parkinson's disease in a Taiwanese population. *Neurobiology of aging*, *38*, 218-e1.

Farrer, M. J. (2006). Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature Reviews Genetics*, *7*(4), 306-318.

Filocamo, M., Mazzotti, R., Stroppiano, M., Seri, M., Giona, F., Parenti, G., ... & Gatti, R. (2002). Analysis of the glucocerebrosidase gene and mutation profile in 144 Italian Gaucher patients. *Human mutation*, *20*(3), 234-235.

Fishbein, I., Kuo, Y. M., Giasson, B. I., & Nussbaum, R. L. (2014). Augmentation of phenotype in a transgenic Parkinson mouse heterozygous for a Gaucher mutation. *Brain*, *137*(12), 3235-3247.

Foo, J. N., Liu, J., & Tan, E. K. (2015). CHCHD2 and Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(7), 681-682.

Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., & Tomiyama, H. (2015). 0 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *The Lancet Neurology*, *14*(3), 274-282

Gagliardi, M., Iannello, G., Colica, C., Annesi, G., & Quattrone, A. (2017). Analysis of CHCHD2 gene in familial Parkinson's disease from Calabria. *Neurobiology of aging*, *50*, 169-e5.

Gan-Or, Z., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2015). Genetic perspective on the role of the autophagy-lysosome pathway in Parkinson disease. *Autophagy*, *11*(9), 1443-1457.

Gan-Or, Z., Giladi, N., Rozovski, U., Shifrin, C., Rosner, S., Gurevich, T., ... & Orr-Urtreger, A. (2008). Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology*, *70*(24), 2277-2283.

Gao, C., Chen, Y. M., Sun, Q., He, Y. C., Huang, P., Wang, T., ... & Chen, S. D. (2017). Mutation analysis of CHCHD2 gene in Chinese Han familial essential tremor patients and familial Parkinson's disease patients. *Neurobiology of aging*, *49*, 218-e9.

Gasser, T. (2015). Usefulness of genetic testing in PD and PD trials: a balanced review. *Journal of Parkinson's disease*, *5*(2), 209-215.

Giolo, S. R., Soler, J. M., Greenway, S. C., Almeida, M. A., De Andrade, M., Seidman, J. G., ... & Pereira, A. C. (2012). Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European Journal of Human Genetics*, *20*(1), 111.

Goker-Alpan, O., Lopez, G., Vithayathil, J., Davis, J., Hallett, M., & Sidransky, E. (2008). The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Archives of neurology*, *65*(10), 1353-1357.

Goker-Alpan, O., Schiffmann, R., LaMarca, M. E., Nussbaum, R. L., McInerney-Leo, A., & Sidransky, E. (2004). Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *Journal of medical genetics*, *41*(12), 937-940.

- Gómez, G., Arias, S., Cárdenas, L., Zoghbi, D., & Paradisi, I. (2017). GBA mutations in Gaucher type I Venezuelan patients: ethnic origins and frequencies. *Journal of genetics*, 96(4), 583-589.
- González-del Rincón, M. D. L., Monroy Jaramillo, N., Suárez Martínez, A. I., Yescas Gómez, P., Boll Woehrlen, M. C., López López, M., & Alonso Vilatela, M. E. (2013). The L444P GBA mutation is associated with early-onset Parkinson's disease in Mexican Mestizos. *Clinical genetics*, 84(4), 386-387.
- Grabowski, G. A. (2008). Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *The Lancet*, 372(9645), 1263-1271.
- Guggenbuhl, P., Grosbois, B., & Chalès, G. (2008). Gaucher disease. *Joint Bone Spine*, 75(2), 116-124.
- Gutti, U., Fung, H. C., Hruska, K. S., LaMarca, M. E., Chen, C. M., Wu, Y. R., & Sidransky, E. (2008). The need for appropriate genotyping strategies for glucocerebrosidase mutations in cohorts with Parkinson disease. *Archives of neurology*, 65(6), 849-852.
- Han, F., Grimes, D. A., Li, F., Wang, T., Yu, Z., Song, N., ... & Bulman, D. E. (2016). Mutations in the glucocerebrosidase gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada. *International Journal of Neuroscience*, 126(5), 415-421.
- Hancock, D. B., Martin, E. R., Stajich, J. M., Jewett, R., Stacy, M. A., Scott, B. L., ... & Scott, W. K. (2007). Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. *Archives of neurology*, 64(4), 576-580.
- Hashimoto, M., Takeda, A., Hsu, L. J., Takenouchi, T., & Masliah, E. (1999). Role of cytochrome c as a stimulator of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Lewy body disease. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28849-28852.
- Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., & Gestal-Otero, J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 52(3), 276-284.
- Hodaňová, K., Hřebíček, M., Červenková, M., Mrázová, L., Vepřeková, L., & Zeman, J. (1999). Analysis of the  $\beta$ -glucocerebrosidase gene in Czech and Slovak Gaucher patients: mutation profile and description of six novel mutant alleles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 25(5), 287-298.
- Horowitz, M., Pasmanik-Chor, M., Ron, I., & Kolodny, E. H. (2011). The enigma of the E326K mutation in acid  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Molecular genetics and metabolism*, 104(1-2), 35-38.
- Horowitz, M., Wilder, S., Horowitz, Z., Reiner, O., Gelbart, T., & Beutler, E. (1989). The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics*, 4(1), 87-96.
- Hruska, K. S., LaMarca, M. E., Scott, C. R., & Sidransky, E. (2008). Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human mutation*, 29(5), 567-583.
- Hu, F. Y., Xi, J., Guo, J., Yu, L. H., Liu, L., He, X. H., ... & Xu, Y. M. (2010). Association of the glucocerebrosidase N370S allele with Parkinson's disease in two separate Chinese Han populations of mainland China. *European journal of neurology*, 17(12), 1476-1478.
- Huang, C. L., Wu-Chou, Y. H., Lai, S. C., Chang, H. C., Yeh, T. H., Weng, Y. H., ... & Lu, C. S. (2011). Contribution of glucocerebrosidase mutation in a large cohort of sporadic Parkinson's disease in Taiwan. *European journal of neurology*, 18(10), 1227-1232.
- Huang, Y., Deng, L., Zhong, Y., & Yi, M. (2018). The Association between E326K of GBA and the Risk of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2018.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 79(4), 368-376.

Jansen, I. E., Bras, J. M., Lesage, S., Schulte, C., Gibbs, J. R., Nalls, M. A., ... & Singleton, A. B. (2015). CHCHD2 and Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(7), 678-679.

Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Paisan-Ruiz, C., Katsarou, Z., Hardy, J., & Fidani, L. (2009). Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neuroscience letters*, *452*(2), 87-89.

Kiebertz, K., & Wunderle, K. B. (2013). Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Movement Disorders*, *28*(1), 8-13.

Kim, C., & Lee, S. J. (2008). Controlling the mass action of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *107*(2), 303-316.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., ... & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605-608.

Koschmidder, E., Weissbach, A., Brüggemann, N., Kasten, M., Klein, C., & Lohmann, K. (2016). A nonsense mutation in CHCHD2 in a patient with Parkinson disease. *Neurology*, *86*(6), 577-579.

Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., ... & De Camilli, P. (2013). The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Human mutation*, *34*(9), 1200-1207.

Kumar, K. R., Djarmati-Westenberger, A., & Grünewald, A. (2011, November). Genetics of Parkinson's disease. In *Seminars in neurology* (Vol. 31, No. 05, pp. 433-440). © Thieme Medical Publishers.

Kumar, K. R., Ramirez, A., Göbel, A., Kresojević, N., Svetel, M., Lohmann, K., ... & Krainc, D. (2013). Glucocerebrosidase mutations in a Serbian Parkinson's disease population. *European journal of neurology*, *20*(2), 402-405.

Larsen, S. B., Hanss, Z., & Krüger, R. (2018). The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell and tissue research*, *373*(1), 21-37.

Lee, R. E. (1968). The fine structure of the cerebroside occurring in Gaucher's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *61*(2), 484-489.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., ... & Dehejia, A. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, *395*(6701), 451-452.

Lesage, S., Anheim, M., Condroyer, C., Pollak, P., Durif, F., Dupuits, C., et al. (2011a). Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 202-210. doi: 10.1093/hmg/ddq454

Lesage, S., Anheim, M., Condroyer, C., Pollak, P., Durif, F., Dupuits, C., ... & Rivaud, S. (2011a). Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Human molecular genetics*, *20*(1), 202-210.

Lesage, S., Condroyer, C., Hecham, N., Anheim, M., Belarbi, S., Lohman, E., ... & Tazir, M. (2011b). Mutations in the glucocerebrosidase gene confer a risk for Parkinson disease in North Africa. *Neurology*, *76*(3), 301-303.

Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., ... & Erpapazoglou, Z. (2016). Loss of VPS13C function in autosomal-recessive Parkinsonism causes mitochondrial dysfunction and increases PINK1/Parkin-dependent mitophagy. *The American Journal of Human Genetics*, *98*(3), 500-513.

- Li, N. N., Wang, L., Tan, E. K., Cheng, L., Sun, X. Y., Lu, Z. J., ... & Peng, R. (2016). Genetic analysis of CHCHD2 gene in Chinese Parkinson's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 171(8), 1148-1152.
- Li, Y., Sekine, T., Funayama, M., Li, L., Yoshino, H., Nishioka, K., ... & Hattori, N. (2014). Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 935-e3.
- Lieberman, R. L., Wustman, B. A., Huertas, P., Powe Jr, A. C., Pine, C. W., Khanna, R., ... & Petsko, G. A. (2007). Structure of acid  $\beta$ -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nature chemical biology*, 3(2), 101.
- Liou, B., Kazimierczuk, A., Zhang, M., Scott, C. R., Hegde, R. S., & Grabowski, G. A. (2006). Analyses of variant acid  $\beta$ -glucosidases effects of Gaucher disease mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4242-4253.
- Liu, G., & Li, K. (2015). CHCHD2 and Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 14(7), 679-680.
- Liu, J. P., Li, J., Lu, Y., Wang, L., & Chen, G. (2016). Impulse control disorder, lysosomal malfunction and ATP13A2 insufficiency in Parkinsonism. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.
- Liu, Z., Guo, J., Li, K., Qin, L., Kang, J., Shu, L., ... & Sun, Q. (2015). Mutation analysis of CHCHD2 gene in Chinese familial Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 36(11), 3117-e7.
- Lotia, M., & Jankovic, J. (2016). New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 17(7), 895-909.
- Lu, Q., Deng, X., Song, Z., Guo, Y., Yang, Y., & Deng, H. (2016). Mutation analysis of the CHCHD2 gene in Chinese Han patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 29, 143-144.
- Lwin, A., Orvisky, E., Goker-Alpan, O., LaMarca, M. E., & Sidransky, E. (2004). Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Molecular genetics and metabolism*, 81(1), 70-73.
- MacDermot, K., Mehta, A., Pastores, G. M., & Pintos-Morell, G. (2013). Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Current Medical Literature*, 11(3), 91.
- Malini, E., Grossi, S., Deganuto, M., Rosano, C., Parini, R., Dominisini, S., ... & Dardis, A. (2014). Functional analysis of 11 novel GBA alleles. *European Journal of Human Genetics*, 22(4), 511.
- Mallett, V., Ross, J. P., Alcalay, R. N., Ambalavanan, A., Sidransky, E., Dion, P. A., ... & Gan-Or, Z. (2016). GBA p. T369M substitution in Parkinson disease: Polymorphism or association? A meta-analysis. *Neurology Genetics*, 2(5), e104.
- Manning-Boğ, A. B., Schüle, B., & Langston, J. W. (2009). Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology*, 30(6), 1127-1132.
- Mao, X. Y., Burgunder, J. M., Zhang, Z. J., An, X. K., Zhang, J. H., Yang, Y., ... & Peng, R. (2010). Association between GBA L444P mutation and sporadic Parkinson's disease from Mainland China. *Neuroscience letters*, 469(2), 256-259.
- Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B. P., Sue, C. M., Tabrizi, S. J., Bertram, L., ... & Assmann, B. (2016). Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement Disorders*, 31(4), 436-457.
- Mata, I. F., Leverenz, J. B., Weintraub, D., Trojanowski, J. Q., Chen-Plotkin, A., Van Deerlin, V. M., ... & Quinn, J. F. (2016). GBA Variants are associated with a distinct pattern of cognitive deficits in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 31(1), 95-102.

Mata, I. F., Samii, A., Schneer, S. H., Roberts, J. W., Griffith, A., Leis, B. C., ... & Tsuang, D. (2008). Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. *Archives of neurology*, 65(3), 379-382.

Melki, R. (2015). Role of different alpha-synuclein strains in synucleinopathies, similarities with other neurodegenerative diseases. *Journal of Parkinson's disease*, 5(2), 217-227.

Meng, H., Yamashita, C., Shiba-Fukushima, K., Inoshita, T., Funayama, M., Sato, S., ... & Imai, Y. (2017). Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nature communications*, 8, 15500.

Mistry, P. K., & Cox, T. M. (1993). The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of a lysosomal enzyme. *Journal of medical genetics*, 30(11), 889.

Mitsui, J., Fukuda, Y., Azuma, K., Tozaki, H., Ishiura, H., Takahashi, Y., ... & Tsuji, S. (2010). Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing using next-generation sequencer. *Journal of human genetics*, 55(7), 448.

Mitsui, J., Mizuta, I., Toyoda, A., Ashida, R., Takahashi, Y., Goto, J., ... & Hattori, N. (2009). Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Archives of neurology*, 66(5), 571-576.

Moors, T., Paciotti, S., Chiasserini, D., Calabresi, P., Parnetti, L., Beccari, T., & Berg, WD (2016). Disfunção Lisossomal e Agregação de  $\alpha$ -Sinucleína na Doença de Parkinson: Links de Diagnóstico. *Transtornos do Movimento*

Moraitou, M., Hadjigeorgiou, G., Monopolis, I., Dardiotis, E., Bozi, M., Vassilatis, D., ... & Michelakakis, H. (2011).  $\beta$ -Glucocerebrosidase gene mutations in two cohorts of Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Molecular genetics and metabolism*, 104(1-2), 149-152.

Nalls, M. A., Duran, R., Lopez, G., Kurzawa-Akanbi, M., McKeith, I. G., Chinnery, P. F., ... & Engelborghs, S. (2013). A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA neurology*, 70(6), 727-735.

Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., ... & Bras, J. (2018). Parkinson's disease genetics: identifying novel risk loci, providing causal insights and improving estimates of heritable risk.

Neumann, J., Bras, J., Deas, E., O'sullivan, S. S., Parkkinen, L., Lachmann, R. H., ... & Segarane, B. (2009). Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*, 132(7), 1783-1794.

Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research*, 11(5), 863-874.

Nichols, W. C., Pankratz, N., Marek, D. K., Pauciulo, M. W., Elsaesser, V. E., Halter, C. A., ... & Foroud, T. (2009). Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology*, 72(4), 310-316.

Nishioka, K., Vilariño-Güell, C., Cobb, S. A., Kachergus, J. M., Ross, O. A., Wider, C., ... & Farrer, M. J. (2010). Glucocerebrosidase mutations are not a common risk factor for Parkinson disease in North Africa. *Neuroscience letters*, 477(2), 57-60.

Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 19(8), 983-997.

Noreau, A., Rivière, J. B., Diab, S., Dion, P. A., Panisset, M., Soland, V., ... & Rouleau, G. A. (2011). Glucocerebrosidase mutations in a French-Canadian Parkinson's disease cohort. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 38(5), 772-773.

Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1356-1364.

O'Regan, G., deSouza, R. M., Balestrino, R., & Schapira, A. H. (2017). Glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 7(3), 411-422.

Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., ... & Lehericy, S. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264-1310.

Ogaki, K., Koga, S., Heckman, M. G., Fiesel, F. C., Ando, M., Labbé, C., ... & Strongosky, A. J. (2015). Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Lewy body disorders. *Neurology*, 85(23), 2016-2025.

Paisán-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., ... & Schneider, S. A. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Annals of Neurology*, 65(1), 19-23.

Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., Van Der Brug, M., ... & Johnson, J. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44(4), 595-600.

Parker Jr, W. D., Parks, J. K., & Swerdlow, R. H. (2008). Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Research*, 1189, 215-218.

Parkinson, J. (1817). An essay on the shaking palsy: London: Whittingham and Rowland for Sherwood. *Neely and Jones*.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-236.

Parnetti, L., Paciotti, S., Eusebi, P., Dardis, A., Zampieri, S., Chiasserini, D., ... & Beccari, T. (2017). Cerebrospinal fluid  $\beta$ -glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients. *Movement Disorders*, 32(10), 1423-1431.

Perier, C., Bove, J., Dehay, B., Jackson-Lewis, V., Rabinovitch, P. S., Przedborski, S., & Vila, M. (2010). Apoptosis-inducing factor deficiency sensitizes dopaminergic neurons to parkinsonian neurotoxins. *Annals of Neurology*, 68(2), 184-192.

Pezzoli, G., & Cereda, E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 80(22), 2035-2041.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013.

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... & Stenroos, E. S. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.

Pulkes, T., Choubtum, L., Chitphuk, S., Thakkinstian, A., Pongpakdee, S., Kulkantrakorn, K., ... & Boonkongchuen, P. (2014). Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(9), 986-991.

Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J., ... & Pappatà, S. (2013). Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Human Mutation*, 34(9), 1208-1215.

Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., ... & Al-Din, A. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics*, 38(10), 1184-1191.

Ran, C., Brodin, L., Forsgren, L., Westerlund, M., Ramezani, M., Gellhaar, S., ... & Puschmann, A. (2016). Strong association between glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease in Sweden. *Neurobiology of aging*, 45, 212-e5.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Voelkerding, K. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405.

Rosenthal, L. S. (2016). Association of GBA mutations and the E326K polymorphism with motor and cognitive progression in Parkinson disease. *JAMA Neurology*, 73(10), 1217-1224.

Rozenberg, R., Araujo, F. T., Fox, D. C., Aranda, P., Nonino, A., Micheletti, C., ... & Pereira, L. D. V. (2006). High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. *Brazilian journal of medical and biological research*, 39(9), 1171-1179.

Rubino, E., Brusa, L., Zhang, M., Boschi, S., Govone, F., Vacca, A., ... & Rainero, I. (2017). Genetic analysis of CHCHD2 and CHCHD10 in Italian patients with Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 53, 193-e7.

Sanchez-Martinez, A., Beavan, M., Gegg, M. E., Chau, K. Y., Whitworth, A. J., & Schapira, A. H. (2016). Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models. *Scientific reports*, 6, 31380.

Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., ... & Tomiyama, H. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41(12), 1303.

Sato, C., Morgan, A., Lang, A. E., Salehi-Rad, S., Kawarai, T., Meng, Y., ... & Rogaeva, E. (2005). Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Movement disorders*, 20(3), 367-370.

Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 683.

Schapira, A. H. (2015). Glucocerebrosidase and Parkinson disease: recent advances. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66, 37-42.

Schapira, A. H. V. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1261.

Schulte, C., & Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4, 67-80.

Schwarz, J. M., Rödelberger, C., Schuelke, M., & Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, 7(8), 575.

Setó-Salvia, N., Pagonabarraga, J., Houlden, H., Pascual-Sedano, B., Dols-Icardo, O., Tucci, A., ... & Muñoz, L. (2012). Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course. *Movement Disorders*, 27(3), 393-399.

Shafit-Zagardo, B. R. I. D. G. E. T., Devine, E. A., Smith, M., Arredondo-Vega, F., & Desnick, R. J. (1981). Assignment of the gene for acid beta-glucosidase to human chromosome 1. *American journal of human genetics*, 33(4), 564.

- Shi, C. H., Mao, C. Y., Zhang, S. Y., Yang, J., Song, B., Wu, P., ... & Wu, J. (2016). CHCHD2 gene mutations in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 38, 217-e9.
- Sidransky, E. (2004). Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Molecular genetics and metabolism*, 83(1), 6-15.
- Sidransky, E., & Hart, P. S. (2012). Penetrance of PD in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology*, 79(1), 106-107.
- Sidransky, E., & Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *The Lancet Neurology*, 11(11), 986-998.
- Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., ... & Chen, C. M. (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 361(17), 1651-1661.
- Siebert, M., Bock, H., Tirelli, K. M., Schwartz, I. V. D., Giugliani, R., & Pereira, M. L. S. (2012). Investigação abrangente do gene GBA para genotipagem de pacientes com doença de Gaucher. *Revista HCPA. Porto Alegre*.
- Smith, L., Mullin, S., & Schapira, A. H. (2017). Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Experimental neurology*, 298, 180-190.
- Socal, M. P., Bock, H., Michelin-Tirelli, K., Hilbig, A., Saraiva-Pereira, M. L., Rieder, C. R., & Jardim, L. B. (2009). Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians. *Parkinsonism & related disorders*, 15(1), 76-78.
- Spatola, M., & Wider, C. (2014). Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism & related disorders*, 20, S35-S38.
- Spitz, M., Rozenberg, R., da Veiga Pereira, L., & Barbosa, E. R. (2008). Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism & related disorders*, 14(1), 58-62.
- Stirnemann, J., Vigan, M., Hamroun, D., Heraoui, D., Rossi-Semerano, L., Berger, M. G., ... & Kaminsky, P. (2012). The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet journal of rare diseases*, 7(1), 77.
- Stone, D. L., Tayebi, N., Orvisky, E., Stubblefield, B., Madike, V., & Sidransky, E. (2000). Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Human mutation*, 15(2), 181-188.
- Stone, D. L., van Diggelen, O. P., de Klerk, J. B., Gaillard, J. L., Niermeijer, M. F., Willemsen, R., ... & Sidransky, E. (1999). Is the perinatal lethal form of Gaucher disease more common than classic type 2 Gaucher disease?. *European Journal of Human Genetics*, 7(4), 505.
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., ... & Wolburg, H. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human molecular genetics*, 14(15), 2099-2111.
- Sudhaman, S., Muthane, U. B., Behari, M., Govindappa, S. T., Juyal, R. C., & Thelma, B. K. (2016). Evidence of mutations in RIC3 acetylcholine receptor chaperone as a novel cause of autosomal-dominant Parkinson's disease with non-motor phenotypes. *Journal of medical genetics*, 53(8), 559-566.
- Sun, Q. Y., Guo, J. F., Wang, L., Yu, R. H., Zuo, X., Yao, L. Y., ... & Tang, B. S. (2010). Glucocerebrosidase gene L444P mutation is a risk factor for Parkinson's disease in Chinese population. *Movement disorders*, 25(8), 1005-1011.

- Swan, M., & Saunders-Pullman, R. (2013). The association between  $\beta$ -glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Current neurology and neuroscience reports*, 13(8).
- Tan, E. K., Tong, J., Fook-Chong, S., Yih, Y., Wong, M. C., Pavanni, R., & Zhao, Y. (2007b). Glucocerebrosidase mutations and risk of Parkinson disease in Chinese patients. *Archives of neurology*, 64(7), 1056-1058.
- Tan, S. Y., & Shigaki, D. (2007a). Jean-Martin Charcot (1825-1893): pathologist who shaped modern neurology. *Singapore medical journal*, 48(5), 383.
- Tanaka, K., & Matsuda, N. (2014). Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(1), 197-204.
- Tayebi, N., Stubblefield, B. K., Park, J. K., Orvisky, E., Walker, J. M., LaMarca, M. E., & Sidransky, E. (2003). Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *The American Journal of Human Genetics*, 72(3), 519-534.
- Tejera-Parrado, C., Jesús, S., Huertas-Fernández, I., Bernal-Bernal, I., Bonilla-Toribio, M., Córdoba-Tevar, I., ... & Carballo, M. (2017). Genetic analysis of CHCHD2 in a southern Spanish population. *Neurobiology of aging*, 50, 169-e1.
- Tio, M., Wen, R., Lim, Y. L., Zukifli, Z. H. B., Xie, S., Ho, P., ... & Tan, E. K. (2017). Varied pathological and therapeutic response effects associated with CHCHD2 mutant and risk variants. *Human mutation*, 38(8), 978-987.
- Thacker, E. L., Chen, H., Patel, A. V., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J., ... & Ascherio, A. (2008). Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease. *Movement disorders*, 23(1), 69-74.
- Toft, M., Pielsticker, L., Ross, O. A., Aasly, J. O., & Farrer, M. J. (2006). Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian population. *Neurology*, 66(3), 415-417.
- Tollis, D. (1996). Who was Charcot?. *Nursing times*, 92(8), 56-56.
- Török, R., Zádori, D., Török, N., Csily, É., Vécsei, L., & Klivényi, P. (2016). An assessment of the frequency of mutations in the GBA and VPS35 genes in Hungarian patients with sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 610, 135-138.
- Trinh, J., Guella, I., & Farrer, M. J. (2014). Disease penetrance of late-onset parkinsonism: a meta-analysis. *JAMA neurology*, 71(12), 1535-1539.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., ... & Albanese, A. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158-1160.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology*, 157(11), 1015-1022.
- Várkonyi, J., Rosenbaum, H., Baumann, N., MacKenzie, J. J., Simon, Z., Aharon-Peretz, J., ... & Sidransky, E. (2003). Gaucher disease associated with parkinsonism: four further case reports. *American journal of medical genetics Part A*, 116(4), 348-351.
- Velez-Pardo, C., Lorenzo-Betancor, O., Jimenez-Del-Rio, M., Moreno, S., Lopera, F., Cornejo-Olivas, M., ... & Yearout, D. (2019). The distribution and risk effect of GBA variants in a large cohort of PD patients from Colombia and Peru. *Parkinsonism & related disorders*.

- Voigt, D. D., Nascimento, C. M., de Souza, R. B., Acero, P. H. C., Júnior, M. C., da Silva, C. P., ... & Della Coletta, M. V. (2019). CHCHD2 mutational screening in Brazilian patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, *74*, 236-e7.
- Wafaei, J. R., & Choy, F. Y. (2005). Glucocerebrosidase recombinant allele: molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *35*(2), 277-285.
- Wang, Y., Liu, L., Xiong, J., Zhang, X., Chen, Z., Yu, L., ... & Lin, Z. (2012). Glucocerebrosidase L444P mutation confers genetic risk for Parkinson's disease in central China. *Behavioral and Brain Functions*, *8*(1), 57.
- Wilson, G. R., Sim, J. C., McLean, C., Giannandrea, M., Galea, C. A., Riseley, J. R., ... & Hogan, K. J. (2014). Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with  $\alpha$ -synuclein pathology. *The American Journal of Human Genetics*, *95*(6), 729-735.
- Winfield, S. L., Tayebi, N., Martin, B. M., Ginns, E. I., & Sidransky, E. (1997). Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. *Genome research*, *7*(10), 1020-1026.
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(12), a006734.
- Wu, H., Lu, X., Xie, F., Cen, Z., Zheng, X., & Luo, W. (2016). Genetic analysis of the CHCHD2 gene in a cohort of Chinese patients with Parkinson disease. *Neuroscience letters*, *629*, 116-118.
- Yadav, R., Kapoor, S., Madhukar, M., Naduthota, R. M., Kumar, A., & Pal, P. K. (2018). Genetic analysis of the glucocerebrosidase gene in South Indian patients with Parkinson's disease. *Neurology India*, *66*(6), 1649.
- Yang, X., Zhao, Q., An, R., Zheng, J., Tian, S., Chen, Y., & Xu, Y. (2016). Mutational scanning of the CHCHD2 gene in Han Chinese patients with Parkinson's disease and meta-analysis of the literature. *Parkinsonism & related disorders*, *29*, 42-46.
- Yu, Z., Wang, T., Xu, J., Wang, W., Wang, G., Chen, C., ... & Qu, H. (2015). Mutations in the glucocerebrosidase gene are responsible for Chinese patients with Parkinson's disease. *Journal of human genetics*, *60*(2), 85.
- Zafar, S., & Yaddanapudi, S. S. (2018). Parkinson Disease. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Zhang, L., Quadri, M., Guedes, L. C., Coelho, M., Valadas, A., Mestre, T., ... & Ferreira, J. J. (2013). Comprehensive LRRK2 and GBA screening in Portuguese patients with Parkinson's disease: identification of a new family with the LRRK2 p. Arg1441His mutation and novel missense variants. *Parkinsonism & related disorders*, *19*(10), 897-900.
- Zhang, M., Xi, Z., Fang, S., Ghani, M., Sato, C., Moreno, D., ... & Rogaeva, E. (2016). Mutation analysis of CHCHD2 in Canadian patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, *38*, 217-e7.
- Zhang, Y., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2000). Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *7*(4), 240-250.
- Zhang, Y., Shu, L., Sun, Q., Zhou, X., Pan, H., Guo, J., & Tang, B. (2018). Integrated Genetic Analysis of Racial Differences of Common GBA Variants in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*, 43.

Zhang, Y., Sun, Q. Y., Zhao, Y. W., Shu, L., Guo, J. F., Xu, Q., ... & Tang, B. S. (2015). Effect of GBA mutations on phenotype of Parkinson's disease: a study on Chinese population and a meta-analysis. *Parkinson's Disease*, 2015.

Zhao, F., Bi, L., Wang, W., Wu, X., Li, Y., Gong, F., ... & Wu, Y. (2016). Mutations of glucocerebrosidase gene and susceptibility to Parkinson's disease: An updated meta-analysis in a European population. *Neuroscience*, 320, 239-246.

Ziegler, S. G., Eblan, M. J., Gutti, U., Hruska, K. S., Stubblefield, B. K., Goker-Alpan, O., ... & Sidransky, E. (2007). Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Molecular genetics and metabolism*, 91(2), 195-200.

Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., ... & Rossle, S. C. (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *The American Journal of Human Genetics*, 89(1), 168-175.

Zimran, A., Sorge, J., Gross, E., Kubitz, M., West, C., & Beutler, E. (1990). A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder. *The Journal of clinical investigation*, 85(1), 219-222.

## ANEXO A - Termo de consentimento para pacientes com DP



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO

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

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisador responsável: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

**NOME DO PACIENTE:** \_\_\_\_\_ **DN:** \_\_\_\_\_

**REGISTRO:** \_\_\_\_\_ **PROCEDÊNCIA:** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações nestes genes em pacientes com doença de Parkinson e determinar se estas alterações são causa da doença.

Os resultados dessa pesquisa poderão abrir novas perspectivas para a identificação de causas genéticas, recentemente identificadas, associadas com esta patologia. Os indivíduos selecionados para participarem deste projeto são pacientes de ambos os sexos com doença de Parkinson de causa desconhecida.

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

Os exames para pesquisar defeitos nos genes acima citados serão gratuitos e serão realizados a partir de uma única amostra de 5 mL de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao paciente, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou hematomas. Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de Biólogos tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O DNA extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao paciente o direito de retirá-lo do banco de DNA, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

As condições de sigilo quanto às informações coletadas e aos resultados das análises, assim como, a identidade dos pacientes serão preservadas. Os resultados dos testes realizados somente serão revelados ao paciente que autorizou a realização dos

**ANEXO A - Termo de consentimento para pacientes com DP (continuação)**

exames e também serão utilizados com fins científicos, podendo vir a ser divulgados em revistas científicas, respeitando a privacidade e o anonimato dos participantes.

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

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:  
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 501F -  
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013  
Tel: (021) 2334.0039 - Fax (021) 2334.0309  
Email: pimentel@uerj.br  
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3018, bloco E, 3º andar, - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ.

E-mail: etica@uerj.br - Telefone: (021) 2334-2180

## ANEXO B - Termo de consentimento para controles



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO DA AMOSTRA CONTROLE

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

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisador responsável: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

NOME DO PARTICIPANTE: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_ PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "Relação entre múltiplas variantes genéticas e a Doença de Parkinson em casuística brasileira", realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa tem como objetivos: investigar mutações nestes genes em pacientes com doença de Parkinson e determinar se estas alterações são causa da doença.

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

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

Os exames para pesquisar defeitos nos genes acima citados serão gratuitos e serão realizados a partir de uma única amostra de 5 mL de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao paciente, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou hematomas. Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de Biólogos tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O DNA extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao participante o direito de retirá-lo do banco de DNA, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

**ANEXO B - Termo de consentimento para controles (continuação)**

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

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

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Endereço e telefone para contactar o coordenador do projeto:  
Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 501F -  
Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013  
Tel: (021) 2334.0039 - Fax (021) 2334.0309  
Email: pimentel@uerj.br  
Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3018, bloco E, 3º andar, - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ.  
E-mail: etica@uerj.br - Telefone: (021) 2334-2180

## ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em pesquisa da UERJ com a aprovação do projeto



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Sr2**

**Comissão de Ética em Pesquisa – COEP**

Rua São Francisco Xavier, 524, bloco E, 3º andar, sala 3018 - Maracanã  
CEP 20550-900 – Rio de Janeiro, RJ - email: [etica@uerj.br](mailto:etica@uerj.br) - Telefone: (21) 2334-2180

### PARECER DE APROVAÇÃO

Documento nº. 001/2016

Protocolo de pesquisa nº 032.2.2008

**Adendo ao Projeto de Pesquisa:** “Relações entre múltiplas variantes genética e a Doença de Parkinson em casuística brasileira”

**Pesquisador Responsável:** Profª. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

**Instituição Responsável:** IBRAG/UERJ

**Área do Conhecimento:** 2.00- Ciências Biológicas – 2.02- Genética

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, fatores genéticos, disfunção mitocondrial, sistema ubiquitina-proteossomo.

O adendo foi apresentado, explicitando, de forma satisfatória, a alteração pretendida: as novas variantes genéticas identificadas que deverão ser incorporadas aos presentes estudos, dando continuidade a linha de pesquisa e estendendo os objetivos iniciais do projeto. As investigações dos genes deste adendo serão estudadas em amostras previamente extraídas dos pacientes e armazenadas em banco de dados, sob a guarda da pesquisadora. O TCLE foi adequadamente alterado.

*A COEP aprovou o adendo apresentado na reunião de 18 de maio de 2016.*

Rio de Janeiro, 24 de maio de 2016.

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

## APÊNDICE A - Artigo publicado no periódico *Journal of the Neurological Sciences*.

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



Contents lists available at ScienceDirect

### Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jns](http://www.elsevier.com/locate/jns)



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



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

<sup>a</sup> Department of Genetics, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Human Genetics Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Genetics, School of Health Science, University of Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Movement Disorders Section, Neurology Service, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>f</sup> Movement Disorders Unit, Division of Neurology, Hospital Antônio Pedro, Fluminense Federal University, Brazil

<sup>g</sup> Institute of Neurology Deolindo Couto, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>h</sup> Federal Hospital of Servidores do Estado, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>i</sup> Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>j</sup> University Hospital Getúlio Vargas, Federal University of Amazonas, Amazonas, Brazil

<sup>k</sup> Neuroscience Core, Hospital Clínicas, Federal University of Goiás, Brazil

<sup>l</sup> Integrated Neurosciences Institute, Goiás, Brazil

<sup>m</sup> Laboratory of Clinical and Experimental Pathophysiology (CLINEX), Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Parkinson's disease  
Heterogeneity  
Genotype  
Phenotype  
*LRRK2*  
*GBA*

### ABSTRACT

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

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

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

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

### 1. Introduction

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

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

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

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

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

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

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

Available online 24 August 2017

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

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

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

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

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

## 2. Subjects and methods

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

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

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

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

## 3. Results

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

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

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

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

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

Characteristics	GBA-PD	LRRK2-PD	IPD	p-Value <sup>a</sup>
Sample size	22 (12 L444P, 1 IVS2 + 1G > A, 8 N370S)	17	93	–
AAO (range)	47.82 ± 11.30 (23–67)	46.76 ± 9.14 (29–60)	55.02 ± 12.36 (29–87)	<b>0.004<sup>d</sup></b>
Disease duration (range)	12.09 ± 6.02 (2–25)	12.71 ± 6.59 (4–17)	11.1 ± 6.7 (0–28)	–
Male/female	11/11	7/10	57/36	0.24
Familiar/sporadic case	7/15	9/8	15/78	<b>0.003<sup>d</sup></b>
<b>First symptom</b>				
Tremor (%)	13/22 (59.09)	9/17 (52.94)	66/90 (73.33)	0.15 <sup>b</sup>
Bradykinesia (%)	4/22 (18.18)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	–
Rigidity (%)	2/22 (9.09)	1/17 (5.88)	4/90 (4.44)	–
Rigidity + tremor (%)	0/22 (0.0)	0/17 (0.0)	4/90 (4.44)	–
Rigidity + bradykinesia (%)	2/22 (9.09)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	–
Tremor + bradykinesia (%)	0/22 (0.0)	2/17 (11.76)	1/90 (1.11)	–
Rigidity + tremor + bradykinesia (%)	0/22 (0.0)	0/17 (0.0)	1/90 (1.11)	–
Other(s) (%)	1/22 (4.55)	1/17 (5.88)	12/90 (13.33)	–
<b>Presenting symptoms</b>				
Bradykinesia (%)	22/22 (100.0)	17/17 (100.0)	93/93 (100.0)	–
Rigidity (%)	20/22 (90.91)	16/17 (94.12)	90/93 (96.77)	0.47
Resting tremor (%)	16/22 (72.73)	14/17 (82.35)	85/92 (92.39)	<b>0.03<sup>e</sup></b>
Postural instability (%)	17/21 (80.95)	10/17 (58.82)	54/92 (58.70)	0.16
Cognitive decline (%) <sup>g</sup>	8/21 (38.1)	5/16 (31.25)	13/82 (15.85)	<b>0.055<sup>f</sup></b>
Hallucinations (%)	11/22 (50.0)	3/17 (17.65)	39/90 (43.33)	0.09
Depressive symptoms (%)	18/22 (81.82)	13/17 (76.47)	51/90 (56.67)	<b>0.04<sup>e</sup></b>
Voice alteration (hypophonia) (%)	17/21 (80.95)	13/17 (76.47)	52/63 (82.54)	0.85
Gait freezing (%)	13/18 (72.22)	8/17 (47.06)	48/62 (77.42)	<b>0.0498<sup>e</sup></b>
Dyskinesia (%)	12/22 (54.55)	12/17 (70.59)	50/83 (60.24)	0.59
Motor fluctuation (%) <sup>h</sup>	17/22 (77.27)	15/17 (88.24)	51/59 (82.98)	0.54
Sleep disturbances (%) <sup>i</sup>	18/21 (85.71)	13/17 (76.47)	76/82 (92.68)	0.13
Dysautonomia (%) <sup>j</sup>	20/22 (90.91)	9/16 (56.25)	76/78 (97.44)	<b>0.000002<sup>e</sup></b>
Olfactory disturbances (%) <sup>k</sup>	8/14 (57.14)	11/13 (84.62)	21/39 (53.85)	0.14
Dopamine treatment response (%)	22/22 (100.0)	16/16 (100.0)	83/91 (91.21)	0.17

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

<sup>a</sup> Chi-square and ANOVA tests. The difference is significant at the 0.05 level. p-value is referent to the test with all groups.

<sup>b</sup> For tremor vs. all other initial symptoms.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$ .

<sup>d</sup>  $p < 0.01$ .

<sup>e</sup>  $p < 0.001$ .

<sup>f</sup> Borderline significance value.

<sup>g</sup> Cognitive decline was referred as forgetfulness complaints.

<sup>h</sup> Motor fluctuation consisted of wearing off, delayed on and off phenomenon.

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

<sup>j</sup> Dysautonomia included sialorrhoea, seborrhea, sweating, dysphagia, constipation, urinary incontinence, sexual dysfunction, lipothymy, and syncope.

<sup>k</sup> Olfactory disturbances were referred as presence of hyposmia or anosmia.

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

#### 4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

Although this genotype-phenotype comparative analysis revealed significant differences, results obtained should be interpreted with caution due to some limitations of our study that merit consideration. One such limitation was the small number of *LRRK2* and *GBA* mutation carriers in our sample, with a direct impact on *p*-values, which led us not to apply adjustments for multiple comparisons. Furthermore, no clinical tools to assess and monitor the disease evolution were used. Even though the aim of this research was to compare the presence and absence of clinical features, this precluded the assessment of variations caused by the mutations in the course of the disease. Finally, concerning the two case groups (*LRRK2*-PD and *GBA*-PD), it is important to highlight that there is a difference between the strength of the two genetic factors. *LRRK2* G2019S is a pathogenic dominant mutation responsible for disease development in most carriers [8], whereas *GBA* mutations are not considered disease-causing by themselves. Although *GBA* mutations represent important risk factors for PD (mean odds ratio: 5–6) [39], there are additional modulating factors in carriers of *GBA* mutations not examined in our study. Despite this, the frequency observed of mutations in *GBA* gene among Brazilian PD patients points the important role of this gene in the Parkinson's disease etiology in our population [22–24].

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

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

#### Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

#### Acknowledgements

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

#### Appendix A. Supplementary data

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

#### References

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

- mutations and parkinsonism, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13 (2013) 368, <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-013-0368-x>.
- [15] A. Angeli, N.E. Mencacci, R. Duran, I. Aviles-Olmos, Z. Kefalopoulou, J. Candelario, S. Rusbridge, J. Foley, P. Pradhan, M. Jahanshahi, L. Zrinzo, M. Hariz, N.W. Wood, J. Hardy, P. Limousin, T. Foltynie, Genotype and phenotype in Parkinson's disease: lessons in heterogeneity from deep brain stimulation, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1370–1375, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25535>.
- [16] Z. Gan-Or, A. Bar-Shira, A. Mirelman, T. Gurevich, M. Kedmi, N. Giladi, A. Orr-Urtreger, LRRK2 and GBA mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease, *Neurogenetics* 11 (2010) 121–125, <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-009-0198-9>.
- [17] T. Pulkas, L. Choubtum, S. Chitphuk, A. Thakkinstant, S. Pongpakdee, K. Kulkantrakorn, S. Hanchaiphiboolkul, S. Tiamkao, P. Boonkongchuen, Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 (2014) 986–991, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.06.007>.
- [18] E. Sidransky, M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.-M. Chen, L.N. Clark, C. Condroyer, E.V. de Marco, A. Dürr, M.J. Eblan, S. Fahn, M. Farrer, H.-C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A.E. Lang, G.-J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I.F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L.V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogava, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samadpour, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T.G. Wolfsberg, Y.-R. Wu, C.P. Zabetian, Y. Zhao, S.G. Ziegler, Multi-center analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 1651–1661, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0901281>.
- [19] N. Giladi, A. Mirelman, A. Thaler, A. Orr-Urtreger, A personalized approach to Parkinson's disease patients based on founder mutation analysis, *Front. Neurol.* 7 (2016) 71, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2016.00071>.
- [20] A.J. Espay, P. Brundin, A.E. Lang, Precision medicine for disease modification in Parkinson disease, *Nat. Rev. Neurol.* 13 (2017) 119–126, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.196>.
- [21] C.B. Abdalla-Carvalho, C.B. Santos-Rebouças, B.C. Guimarães, M. Campos Júnior, J.S. Pereira, A.L. de Rosso, D.H. Nicaretta, M. Marinho e Silva, J.M. dos Santos, M.M.G. Pimentel, Genetic analysis of LRRK2 functional domains in Brazilian patients with Parkinson's disease, *Eur. J. Neurol.* 17 (2010) 1479–1481, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03039.x>.
- [22] A.V. dos Santos, C.P. Pestana, K.R. da S. Diniz, M. Campos Júnior, C.B. Abdalla-Carvalho, A.L.Z. de Rosso, J.S. Pereira, D.H. Nicaretta, W.L. de Carvalho, J.M. dos Santos, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Mutational analysis of GIGYF2, ATP13A2 and GBA genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 485 (2010) 121–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.083>.
- [23] B. de C. Guimarães, A.C.V. Pereira, F. da C. Rodrigues, A.V. dos Santos, M. Campos Júnior, J.M. dos Santos, F.L. dos Santos, A.L.Z. de Rosso, D.H. Nicaretta, J.S. Pereira, D.J. da Silva, M.V. Della Coletta, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients, *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 (2012) 688–689, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.11.028>.
- [24] G. de M. Abreu, D.C.T. Valença, M. Campos Júnior, C.P. da Silva, J.S. Pereira, M.A. Araujo Leite, A.L. Rosso, D.H. Nicaretta, L.F.R. Vasconcellos, D.J. da Silva, M.V. Della Coletta, J.M. dos Santos, A.P. Gonçalves, C.B. Santos-Rebouças, M.M.G. Pimentel, Autosomal dominant Parkinson's disease: incidence of mutations in LRRK2, SNCA, VPS35 and GBA genes in Brazil, *Neurosci. Lett.* 635 (2016) 67–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.040>.
- [25] M.M.G. Pimentel, K.C.V. Moura, C.B. Abdalla, J.S. Pereira, A.L.Z. de Rosso, D.H. Nicaretta, M.C. Junior, R.M. de Almeida, J.M. dos Santos, I.C.C. Bastos, M.F.X. Mendes, H. Maultasch, F.H. de R. Costa, A.L. dos S. Werneck, C.B. Santos-Rebouças, A study of LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Brazil, *Neurosci. Lett.* 433 (2008) 17–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.033>.
- [26] M. Spitz, J.S. Pereira, D.H. Nicaretta, G. de M. Abreu, E.F. Bastos, T.L. Seixas, M.M.G. Pimentel, Association of LRRK2 and GBA mutations in a Brazilian family with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 825–826, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.03.029>.
- [27] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55 (1992) 181–184, <http://dx.doi.org/10.1136/jnmp.55.3.181>.
- [28] C. Marras, B. Schuele, R.P. Munhoz, E. Rogava, J.W. Langston, M. Kasten, C. Meaney, C. Klein, P.M. Wadia, S.-Y. Lim, R.S.-I. Chuang, C. Zadikof, T. Steeves, K.M. Prakash, R.M.A. de Bie, G. Adeli, T. Thomsen, K.K. Johansen, H.A. Teive, A. Asante, W. Reginold, A.E. Lang, Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers, *Neurology* 77 (2011) 325–333, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318227042d>.
- [29] Z. Gan-Or, N. Giladi, U. Rozovski, C. Shifrin, S. Rosner, T. Gurevich, A. Bar-Shira, A. Orr-Urtreger, Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset, *Neurology* 70 (2008) 2277–2283, <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000304039.11891.29>.
- [30] L.N. Clark, B.M. Ross, Y. Wang, H. Mejia-Santana, J. Harris, E.D. Louis, L.J. Cote, H. Andrews, S. Fahn, C. Waters, B. Ford, S. Frucht, R. Ottman, K. Marder, Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease, *Neurology* 69 (2007) 1270–1277, <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02>.
- [31] R.N. Alcalay, A. Mirelman, R. Saunders-pullman, M. Tang, H.M. Santana, D. Raymond, E. Roos, M. Orbe-reilly, T. Gurevich, A.B. Shira, M.G. Weisz, K. Yasinovsky, M. Zalis, A. Thaler, A. Deik, M.J. Barrett, J. Cabassa, M. Groves, A.L. Hunt, N. Lubarr, M.S. Luciano, J. Miravite, C. Palmese, R. Sachdev, H. Sarva, L. Severt, V. Shanker, M.C. Swan, J. Soto-Valencia, B. Johannes, R. Ortega, S. Fahn, L. Cote, C. Waters, P. Mazzoni, B. Ford, E. Louis, O. Levy, L. Rosado, D. Ruiz, T. Dorovski, M. Pauciuolo, W. Nichols, A. Orr-Urtreger, L. Ozelius, L. Clark, N. Giladi, S. Bressman, K.S. Marder, Parkinson Disease Phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25647>.
- [32] N. Kresojević, M. Janković, I. Petrović, K.R. Kumar, N. Dragašević, V. Dobričić, I. Novaković, M. Svetel, C. Klein, T. Pekmezović, V.S. Kostić, Presenting symptoms of GBA-related Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 804–807, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.04.028>.
- [33] A. Mirelman, T. Heman, K. Yasinovsky, A. Thaler, T. Gurevich, K. Marder, S. Bressman, A. Bar-Shira, A. Orr-Urtreger, N. Giladi, J.M. Hausdorff, Fall risk and gait in Parkinson's disease: the role of the LRRK2 G2019S mutation, *Mov. Disord.* 28 (2013) 1683–1690, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25587>.
- [34] S. Belarbi, N. Hecham, S. Lesage, M.I. Kediha, N. Smail, T. Benhassine, F. Ysmail-Dahlouk, E. Lohman, B. Benhabyles, T. Hamadouche, S. Assami, A. Brice, M. Tazir, LRRK2 G2019S mutation in Parkinson's disease: a neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Algerian cohort, *Parkinsonism Relat. Disord.* 16 (2010) 676–679, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.09.003>.
- [35] M. Swan, N. Doan, R.A. Ortega, M. Barrett, W. Nichols, L. Ozelius, J. Soto-Valencia, S. Boschung, A. Deik, H. Sarva, J. Cabassa, B. Johannes, D. Raymond, K. Marder, N. Giladi, J. Miravite, W. Severt, R. Sachdev, V. Shanker, S. Bressman, R. Saunders-Pullman, Neuropsychiatric characteristics of GBA-associated Parkinson disease, *J. Neurol. Sci.* 370 (2016) 63–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.08.059>.
- [36] K. Brockmann, K. Srulijes, A.K. Hauser, C. Schulte, I. Csoti, T. Gasser, D. Berg, GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics, *Neurology* 77 (2011) 276–280, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e318225ab77>.
- [37] R.N. Alcalay, H. Mejia-Santana, A. Mirelman, R. Saunders-Pullman, D. Raymond, C. Palmese, E. Caccappolo, L. Ozelius, A. Orr-Urtreger, L. Clark, N. Giladi, S. Bressman, K. Marder, Neuropsychological performance in LRRK2 G2019S carriers with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 106–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.09.033>.
- [38] J.H. Somme, A.M. Salazar, A. Gonzalez, B. Tjero, K. Berganzo, E. Lezcano, M.F. Martinez, J.J. Zarranz, J.C. Gómez-Esteban, Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene, *Parkinsonism Relat. Disord.* 21 (2015) 494–499, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.02.019>.
- [39] C. Koros, A. Simitsi, L. Stefanis, Genetics of Parkinson's disease: genotype-phenotype correlations, *Int. Rev. Neurobiol.* 132 (2017) 197–231, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2017.01.009>.

**Supplementary Table S1.** Statistical analysis results collection of age at onset for PD groups

<b>One-way ANOVA</b>	<b>Mean ± SD</b>	<b>F</b>	<b>p-value<sup>a</sup></b>
GBA-PD (n = 22)	47.82 ± 11.30		
LRRK2-PD (n = 17)	46.76 ± 9.14	5.80	0.004
IPD (n = 93)	55.02 ± 12.36		
<b>Tukey's HSD test</b>			<b>p-value<sup>a</sup></b>
GBA-PD vs. LRRK2-PD			0.96
GBA-PD vs. IPD			0.03
LRRK2-PD vs. IPD			0.03
<b>One-way ANOVA – GBA</b>	<b>Mean ± SD</b>	<b>F</b>	<b>p-value<sup>a</sup></b>
Severe mutations (n = 14)	46.36 ± 9.03		
Mild mutation (n = 8)	50.38 ± 14.82	3.38	0.04
IPD (n = 93)	55.02 ± 12.36		
<b>Tukey's HSD test – GBA</b>			<b>p-value<sup>a</sup></b>
Severe mutations vs. Mild mutation			0.74
Severe mutations vs. IPD			0.04
Mild mutation vs. IPD			0.56

IPD: idiopathic Parkinson's disease; LRRK2-PD: LRRK2 G2019S mutation carriers; GBA-PD: *GBA* mutation carriers; Mean ± SD: mean ± standard deviation.

<sup>a</sup>: The difference is significant at the 0.05 level.

**Supplementary Table S2.** Statistical analysis results collection of family history, gender distribution, first and presenting symptoms for PD groups.

<b>Chi-square</b>	<b>Chi-square value</b>	<b>p-value <sup>a</sup></b>
<b>Family history</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=93)	11.86	0.003
GBA-PD vs. IPD	2.83	0.09
LRRK2-PD vs. GBA-PD+IPD	9.42	0.002
<b>Gender distribution</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=93)	2.87	0.24
<b>First symptom <sup>b</sup></b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=90)	3.76	0.15
<b>Rigidity</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=93)	1.49	0.47
<b>Resting tremor</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=92)	6.94	0.031
LRRK2-PD vs. IPD	1.74	0.19
GBA-PD vs. LRRK2-PD+IPD	5.59	0.02
<b>Postural instability</b>		
GBA-PD (n=21), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=92)	3.71	0.16
<b>Cognitive decline</b>		
GBA-PD (n=21), LRRK2-PD (n=16), IPD (n=82)	5.80	0.055
<b>Hallucinations</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=90)	4.77	0.09
<b>Depressive symptoms</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=90)	6.24	0.04
GBA-PD vs. LRRK2-PD	0.17	0.68
GBA-PD+LRRK2-PD vs. IPD	6.12	0.013
<b>Voice alteration (hypophonia)</b>		
GBA-PD (n=21), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=63)	0.32	0.85

Continues

**Supplementary Table S2.** Statistical analysis results collection of family history, gender distribution, first and presenting symptoms for PD groups (continuation).

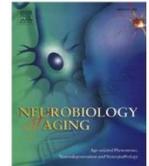
<b>Chi-square</b>	<b>Chi-square value</b>	<b>p-value <sup>a</sup></b>
<b>Gait freezing</b>		
GBA-PD (n=18), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=62)	6.00	0.0498
GBA-PD vs. IPD	0.21	0.65
LRRK2-PD vs. GBA-PD+IPD	5.82	0.02
<b>Dyskinesia</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=83)	1.05	0.59
<b>Motor fluctuation</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=59)	1.24	0.54
<b>Sleep disturbances</b>		
GBA-PD (n=21), LRRK2-PD (n=17), IPD (n=82)	4.15	0.13
<b>Dysautonomia</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=16), IPD (n=78)	26.24	< 0.0001
GBA-PD vs. IPD	1.90	0.17
LRRK2-PD vs. GBA-PD+IPD	25.39	< 0.0001
<b>Olfactory disturbances</b>		
GBA-PD (n=14), LRRK2-PD (n=13), IPD (n=39)	3.96	0.14
<b>Dopamine treatment response</b>		
GBA-PD (n=22), LRRK2-PD (n=16), IPD (n=91)	3.56	0.17

IPD: idiopathic Parkinson's disease; LRRK2-PD: LRRK2 G2019S mutation carriers; GBA-PD: *GBA* mutation carriers. <sup>a</sup>: The difference is significant at the 0.05 level. <sup>b</sup>: For Tremor vs. all other symptoms.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuaging](http://www.elsevier.com/locate/neuaging)

## Negative results

**CHCHD2** mutational screening in Brazilian patients with familial Parkinson's disease

Danielle D. Voigt<sup>a,b,1</sup>, Caroline M. Nascimento<sup>c,1</sup>, Ritiele B. de Souza<sup>a</sup>, Pedro H. Cabello Acero<sup>a,b,d</sup>, Mário Campos Júnior<sup>d</sup>, Camilla P. da Silva<sup>c</sup>, João S. Pereira<sup>e</sup>, Ana Lucia Rosso<sup>f</sup>, Marco A. Araujo Leite<sup>g</sup>, Luiz Felipe R. Vasconcelos<sup>h,i</sup>, Marcus V. Della Coletta<sup>j</sup>, Delson J. da Silva<sup>k,1</sup>, Denise H. Nicaretta<sup>m,n</sup>, Addressa P. Gonçalves<sup>c</sup>, Jussara M. dos Santos<sup>c</sup>, Veluma Calassara<sup>c</sup>, Cíntia B. Santos-Rebouças<sup>c</sup>, Márcia M.G. Pimentel<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Genetics, School of Health Science, University of Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil<sup>b</sup>Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil<sup>c</sup>Department of Genetics, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>d</sup>Human Genetics Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil<sup>e</sup>Movement Disorders Section, Neurology Service, Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>f</sup>University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>g</sup>Division of Neurology, Movement Disorders Unit, Hospital Antônio Pedro, Fluminense Federal University, Brazil<sup>h</sup>Institute of Neurology Deolindo Couto, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>i</sup>Federal Hospital of Servidores do Estado, Rio de Janeiro, Brazil<sup>j</sup>University Hospital Getúlio Vargas, Federal University of Amazonas, Amazonas, Brazil<sup>k</sup>Neuroscience Core, Hospital Clinics, Federal University of Goiás, Brazil<sup>l</sup>Integrated Neurosciences Institute, Goiás, Brazil<sup>m</sup>Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>n</sup>University Hospital Gaffrêe and Guinle, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 May 2018

Accepted 21 September 2018

## Keywords:

Parkinson's disease

CHCHD2

ADPD

Familial PD

Brazilian

## ABSTRACT

Robust evidence on the involvement of genetic factors in the etiology of Parkinson's disease (PD) expands our knowledge about monogenic causes that contribute for this important neurodegenerative disorder. Mutations in the *CHCHD2* gene have been linked to autosomal dominant forms of PD, although there is still lack of evidence for *CHCHD2* variants leading to the disease in mixed populations as those from South America. To assess the contribution of *CHCHD2* as a causal factor for familial PD in Brazil, one of the most heterogeneous populations in the world, we conducted the first molecular analysis of the *CHCHD2* gene in a cohort of 122 index cases from Brazilian families with autosomal dominant forms of PD. Genomic DNA was isolated from peripheral blood and the 4 exons of the *CHCHD2* gene, and their intron-exon boundaries were analyzed by bidirectional Sanger sequencing. No pathogenic or risk variants were found, suggesting that genetic variants of *CHCHD2* are not a common cause of familial PD in Brazilian patients.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Despite the obscure etiology of Parkinson's disease (PD, MIM 168600), the accumulated evidence supports an extensive genetic

contribution for this complex disorder, and novel PD-related genes have provided further insights into the pathophysiology of the disease (Deng et al., 2018). The coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing 2 gene (*CHCHD2*), located at 7q11.2, encodes a small mitochondrial protein involved in the biogenesis and regulation of the electron transport chain (Aras et al., 2015). The association between *CHCHD2* gene and PD was first observed in Japanese families (Funayama et al., 2015). Two missense mutations (182C>T, Thr61Ile, and 434G>A, Arg145Gln) and one splice-site mutation (300+5G>A) were found segregating with the disease

\* Corresponding author at: Department of Genetics, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524, PHLC Sala 501F, 20550-013, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 23340039; fax: +55 21 23340309.

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

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

in 4 Japanese genealogies with autosomal dominant forms of PD (ADPD). Important *in vivo* evidence of the pathological effects related to *CHCHD2* mutations came from functional analysis of *CHCHD2* using the transgenic *Drosophila* model (Tio et al., 2017). The researchers demonstrated that the variants Arg145Gln and Thr61Ile are pathogenic and cause protein dysfunction at different levels, promoting the deregulation of mitochondrial metabolism, which affects the survival and neuronal function. Also, was observed that *Drosophila* expressing mutant *CHCHD2* proteins displayed characteristics as seen in patients with PD such as locomotor dysfunction.

Through subsequent studies, pathogenic or risk variants in the *CHCHD2* gene were also identified in a few patients with PD, although several analyses have failed to find mutations in the *CHCHD2* gene in probands from different populations (Supplementary Table 4). Nonetheless, there is no report focusing on the association between *CHCHD2* variants and PD in Latin America populations. Here, we performed the molecular analysis of the *CHCHD2* gene in a cohort of Brazilian probands with ADPD, aimed to investigate the contribution of the *CHCHD2* mutations for PD in Brazil.

## 2. Methods

The screening for mutations in *CHCHD2* was accomplished in 122 unrelated Brazilian patients (**41 women and 81 men**; mean age  $60.5 \pm 11.1$  years; mean age at onset  $52.1 \pm 12.0$  years) with familial PD compatible with autosomal dominant inheritance pattern. PD was diagnosed according to clinical criteria of the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank. Mutations in genes *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, and *GBA* were previously excluded in these patients. The four exons and exon-intron boundaries of the *CHCHD2* gene were amplified through polymerase chain reaction, and purified amplicons were sequenced by the bidirectional Sanger method (Supplementary Tables 1, 2 and 3). The Institutional Ethics Committee approved the research, and informed consent was obtained from each participant.

## 3. Results

We did not find pathogenic or risk variants in the *CHCHD2* gene in 122 probands from Brazilian families with ADPD (Supplementary Fig. 1).

## 4. Discussion

The association of *CHCHD2* mutations/risk variants with PD, initially reported by Funayama et al (2015), was replicated in some data sets, but not in others (Supplementary Table 4), and in part, these controversial results may be due to ethnic differences. Overall, *CHCHD2* mutations appear to be rare and restricted to some genealogies, predominantly from Asian origin (Supplementary Table 4).

In the present survey, we analyzed the incidence of mutations in the *CHCHD2* gene in a representative cohort of probands with familial PD from Brazil, and pathogenic or risk variants were not found. To the best of our knowledge, our data represent the first findings in a South American population, whose ethnicity is represented by a complex miscegenation, and they are consistent with results from previous studies that also failed to detect *CHCHD2* mutations in patients with PD from other origins.

In conclusion, the absence of pathogenic or risk variants in the *CHCHD2* gene in our cohort reveals that *CHCHD2* mutations might not be a common cause of familial PD in Brazil, as also observed by us in relation to the *VPS35* gene (Abreu et al., 2016). Although the majority of the genetic component for PD still remains to be discovered, PD-susceptibility genes provide new insights into the etiology of the disease and should be further explored (Deng et al., 2018).

## Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

The authors thank the patients and their families for their cooperation and the PDTIS/FIOCRUZ for DNA sequencing. This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil) (Finance Code 305239/2017-1) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brazil) (Finance Code 001).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.09.026>.

## References

- Abreu, G. de M., Valença, D.C., Campos, M., da Silva, C.P., Pereira, J.S., Araujo Leite, M.A., Rosso, A.L., Nicaretta, D., Vasconcellos, L.F., da Silva, D.J., Della Coletta, M.V., dos Santos, J.M., Gonçalves, A.P., Santos-Rebouças, C.B., Pimentel, M.M.G., 2016. Autosomal dominant Parkinson's disease: incidence of mutations in LRRK2, SNCA, VPS35 and GBA genes in Brazil. *Neurosci. Lett.* 635, 67–70.
- Aras, S., Bai, M., Lee, I., Springett, R., Hüttemann, M., Grossman, L.I., 2015. MNRR1 (formerly CHCHD2) is a bi-organellar regulator of mitochondrial metabolism. *Mitochondrion* 20, 43–51.
- Deng, H., Wang, P., Jankovic, J., 2018. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res. Rev.* 42, 72–85.
- Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H., Tomiyama, H., Nishioka, K., Hasegawa, K., Saiki, H., Satake, W., Mogushi, K., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Toda, T., Mizuno, Y., Uchiyama, Y., Ohno, K., Hattori, N., 2015. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 14, 274–282.
- Tio, M., Wen, R., Lim, Y.L., Zukifli, Z.H.B., Xie, S., Ho, P., Zhou, Z., Koh, T.W., Zhao, Y., Tan, E.K., 2017. Varied pathological and therapeutic response effects associated with CHCHD2 mutant and risk variants. *Hum. Mutat.* 38, 978–987.

## Supplementary material for the web site

### Complete methods:

#### DNA sequencing

To evaluate the presence of variants in the *CHCHD2* gene, we amplified the DNA of the 122 probands for all four exons and intron-exon boundaries using the polymerase chain reaction (PCR) technique using 4 pairs of oligonucleotides (IDT-Integrated DNA Technologies), described by Funayama et al., 2015 (Table 1), followed by Sanger sequencing. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using standard procedures. The Table 2 shows the conditions used in the PCR and the Table 3, the denaturation, annealing and extension temperatures, for amplification of the fragments corresponding to the 4 exons of the *CHCHD2* gene. The PCR products were subjected to purification using the enzyme *ExoSAP-IT* (Thermo Scientific Inc. US), following the protocol described by the manufacturer. To verify the presence of mutations, bidirectional sequencing using the *Big Dye Terminator v3.1 Kit* (Life Technologies Inc. US) was conducted on an ABI 3130 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems Inc. US) and the sequences were analyzed by the software *BioEdit Sequence Alignment Editor* version v7.2.6.1 (Isis Pharmaceuticals) and the sequences obtained were aligned with the fragment corresponding to the wild sequence of the *CHCHD2* gene (Transcript: ENST00000395422.3), accessing the online database ensemble.

**Table 1.** Sequences of primers used in the *CHCHD2* mutational screening

Exon	Oligonucleotides	Amplicon (bp)	Reference
1	F 5' CCTCCCATCTTCCGGTCTCC 3' R 5' CCTCCCTCTGCGTCATTGC 3'	208	Funayama <i>et al.</i> , 2015
2	F 5' GGGCAACAAGAGCGAAGC 3' 5' TGCTGGCCTAAGGCAGTAAC 3'	598	
3	F 5' CATCTGGTGCTAGTTCCATTTTCC R 5' TCCGGCCCAGTTGTTAGGAG 3'	401	
4	F 5' GGCCTTTTGTGCTGCTTTC 3' R 5' CTGTCAGATCTGGGAGGATGC 3'	455	

F=Forward 5' → 3' and R=Reverse 3' → 5'

**Table 2.** Conditions used in the PCR to amplify the fragments corresponding to exons of the *CHCHD2* gene

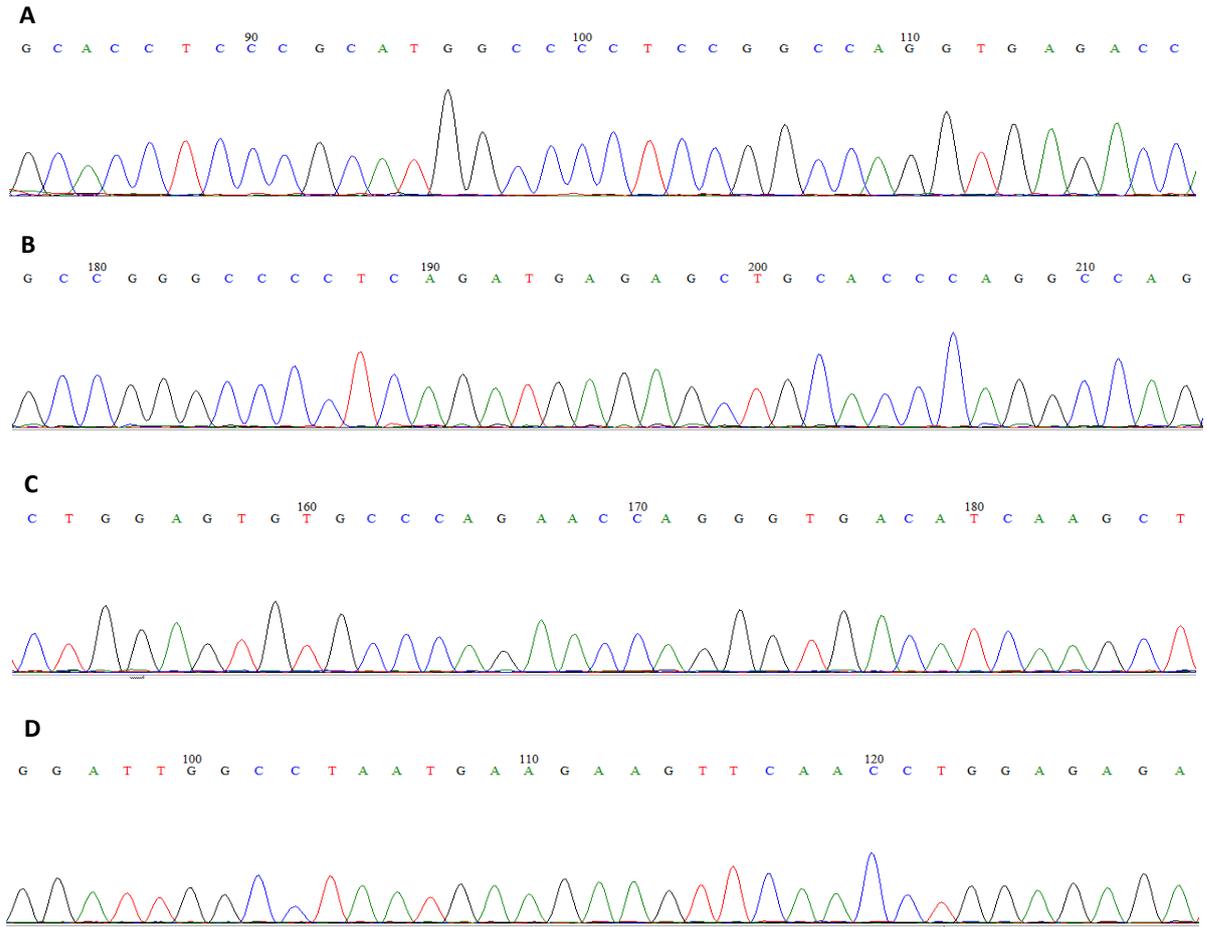
Reagents	Exons			
	1	2	3	4
Reaction Buffer (10X)	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
dNTP (5mM)	200 μM	200 μM	200 μM	200 μM
Oligonucleotide F (10mM)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Oligonucleotide R (10mM)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Platinum <sup>TM</sup> Taq DNA Polimerase (1U/μL)	1 U	1 U	1 U	1 U
ADN (50 ηg/μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Final Volume	25μL	25μL	25μL	25μL

\*10X Buffer, Mg free (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM).

**Table 3.** Cycling conditions used in the PCR for the mutational screening of the *CHCHD2* gene

Phases	Exons 1 to 4
Initial denaturation	95°C – 5 minutes
Denaturation	95°C – 1minute
Annealing	60°C – 1 minute
Extension	72°C – 1 minute
Final extension	72°C – 7 minutes

x = number of cycles



**Figure 1.** Sequence electropherograms of the *CHCHD2* gene. (A) DNA sequence of exon 1, demonstrating a patient with normal sequence. (B) DNA sequence of exon 2, demonstrating a patient with normal sequence. (C) DNA sequence of exon 3, demonstrating a patient with normal sequence. (D) DNA sequence of exon 4, demonstrating a patient with normal sequence.

**Table 4.** Molecular screenings of mutations in the *CHCHD2* gene in patients with Parkinson's disease

Ethnic background	PD probands	Controls	Number of probands with mutations	Pathogenic or risk variants found	Reference
Japanese	340 ADPD 517 SPD	559	4	c.182C>T (Thr61Ile) c.434G>A (Arg145Gln) 300+5G>A	Funayama et al., 2015
Chinese	23 ADPD 76SPD	99	5	c.5C>T Pro2Leu	Foo et al., 2015
European	1243 PD	472	4	c.94G>A (Ala32Thr) c.101C>T(Pro34Leu) c.238A>G (Ile80Val)	Jansen et al., 2015
Chinese	1058 ADPD/SPD	1095	6	c.5C>T (Pro2Leu)	Li et al., 2016
Chinese	92 ADPD	0	0	*	Liu et al., 2015
+US Caucasian Irish and Polish	1627 PD probands	1432	0	*	Ogaki et al., 2015
Taiwanese	86 ADPD 51 ARPD 586 SPD	710	0	*	Fan et al., 2016
Calabria	165 ADPD	200	0	*	Gagliardi et al., 2016
German	6ADPD 324SPD	181	1	c.376C>T (Gln126X)	Koschmidder et al., 2016
Han Chinese	110 ADPD 135 SPD	220	0	*	Lu et al., 2016
Southern Spanish	536 PD probands	518	0	*	Tejera-Parrado et al., 2016
Italian	119 ADPD and SPD	0	0	*	Rubino et al., 2017
Chinese	19 ADPD 364 SPD	500	3	c.182C>T(Thr61Ile)	Shi et al., 2016
Chinese	90 ADPD 72 SPD	90	0	*	Wu et al., 2016

Han Chinese	30 ADPD 554 SPD	594	6	c.5C>T (Pro2Leu) c.53G>A(Arg18Gln) c.434G>A (Arg145Gln)	Yang et al., 2016
Canadian	155 ADPD	0	0	*	Zhang et al., 2016
Han Chinese	171 TE 133 ADPD	221	0	*	Gao et al., 2017
<b>Brazilian</b>	<b>122 ADPD</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>*</b>	<b>Present study</b>

ADPD = Autosomal dominant Parkinson's disease; SPD = Sporadic Parkinson's disease; ARPD = Autosomal Recessive Parkinson's disease; \*= these studies did not observe mutations.

## References

- Fan, T.S., Lin, H.I., Lin, C.H., Wu, R.M., 2015. Lack of CHCHD2 mutations in Parkinson's disease in a Taiwanese population. *Neurobiol. Aging* 38, 218.e1-218.e2.
- Foo, J.N., Liu, J., Tan, E.K., 2015. CHCHD2 and Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 14, 681–682.
- Gagliardi, M., Iannello, G., Colica, C., Annesi, G., Quattrone, A., 2017. Analysis of CHCHD2 gene in familial Parkinson's disease from Calabria. *Neurobiol. Aging* 50, 169.e5-169.e6.
- Gao, C., Chen, Y.M., Sun, Q., He, Y.C., Huang, P., Wang, T., Li, D.H., Liang, L., Liu, J., Xiao, Q., Chen, S. Di, 2017. Mutation analysis of CHCHD2 gene in Chinese Han familial essential tremor patients and familial Parkinson's disease patients. *Neurobiol. Aging* 49, 218.
- Hughes, A.J., Ben-shlomo, Y., Daniel, S.E., Lees, A.J., 1992. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease : A clinicopathologic study. *Neurology* 42, 1142–46.
- Jansen, I.E., Bras, J.M., Lesage, S., Schulte, C., Gibbs, J.R., Nalls, M.A., Brice, A., Wood, N.W., Morris, H., Hardy, J.A., Singleton, A.B., Gasser, T., Heutink, P., Sharma, M., 2015. CHCHD2 and Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 14, 678–679.
- Koschmidder, E., Weissbach, A., Brüggemann, N., Kasten, M., Klein, C., Lohmann, K., 2016. A nonsense mutation in CHCHD2 in a patient with Parkinson disease. *Neurology* 86, 577e579.
- Li, N.-N., Wang, L., Tan, E.-K., Cheng, L., Sun, X.-Y., Lu, Z.-J., Li, J.-Y., Zhang, J.-H., Peng, R., 2016. Genetic analysis of CHCHD2 gene in Chinese Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 171, 1148–1152.
- Liu, Z., Guo, J., Li, K., Qin, L., Kang, J., Shu, L., Zhang, Y., Wei, Y., Yang, N., Luo, Y., Sun, Q., Xu, Q., Yan, X., Tang, B., 2015. Mutation analysis of CHCHD2 gene in Chinese familial Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 3117.e7-3117.e8.
- Lu, Q., Deng, X., Song, Z., Guo, Y., Yang, Y., Deng, H., 2016. Mutation analysis of the CHCHD2 gene in Chinese Han patients with Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 29, 143–144.

Ogaki K, Koga S, Heckman MG, Fiesel FC, Ando M, Labbé C, Lorenzo-Betancor O, Moussaoud-Lamodière EL, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Strongosky AJ, Uitti RJ, McCarthy A, Lynch T, Siuda J, Opala G, Rudzinska M, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M, Czyzewski K, Puschmann A, Nishioka K, Funayama M, Hattori N, Parisi JE, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Springer W, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA., 2015. Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Lewy body disorders. *Neurology*. 85, 2016-2025.

Shi, C. he, Mao, C. yuan, Zhang, S. yu, Yang, J., Song, B., Wu, P., Zuo, C. tao, Liu, Y. tao, Ji, Y., Yang, Z. hua, Wu, J., Zhuang, Z. ping, Xu, Y. ming, 2016. CHCHD2 gene mutations in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 38, 217.e9-217.e13.

Rubino, E., Brusa, L., Zhang, M., Boschi, S., Govone, F., Vacca, A., Gai, A., Pinessi, L., Lopiano, L., Rogaeva, E., Rainero, I., 2017. Genetic analysis of CHCHD2 and CHCHD10 in Italian patients with Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 53, 193.e7-193.e8.

Santiago, J.A., Bottero, V., Potashkin, J.A., 2017. Dissecting the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases through network biology. *Front. Aging Neurosci.* 9, 1–13.

Tejera-Parrado, C., Jesús, S., Huertas-Fernández, I., Bernal-Bernal, I., Bonilla-Toribio, M., Córdoba-Tevar, I., Abreu-Rodríguez, I., Carrillo, F., Bernal-Escudero, M., Vargas-González, L., Carballo, M., Gómez-Garre, P., Mir, P., 2017. Genetic analysis of CHCHD2 in a southern Spanish population. *Neurobiol. Aging* 50, 169.e1-169.e2.

Wu, H., Lu, X., Xie, F., Cen, Z., Zheng, X., Luo, W., 2016. Genetic analysis of the CHCHD2 gene in a cohort of Chinese patients with Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 629, 116–118.

Yang, X., Zhao, Q., An, R., Zheng, J.H., Tian, S., Chen, Y., Xu, Y., 2016. Mutational scanning of the CHCHD2 gene in Han Chinese patients with Parkinson's disease and meta-analysis of the literature. *Park. Relat. Disord.* 29, 42–46.

Zhang, M., X Fang, S., Ghani, M., Sato, C., Moreno, D., Liang, Y., Lang, A.E., Rogaeva, E., 2015. Mutation analysis of CHCHD2 in Canadian patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 38, 217.e7-217.e8.



Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/ I	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11
28	PAR2446/10	70	57	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	PAR2744/10	49	47	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	PAR2747/10	87	76	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31	PAR2893/10	76	73	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32	PAR3003/10	62	61	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
33	PAR3008/10	66	59	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
34	PAR3011/10	72	58	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	PAR3012/10	76	68	F	F	N	N	N	N	N	N	N	*	N	N	N
36	PAR3014/10	50	42	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
37	PAR3015/10	47	40	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
38	PAR3016/10	68	65	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
39	PAR3174/10	57	47	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	PAR 177/11	51	49	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	PAR3182/11	55	41	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
42	PAR3204/11	65	54	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
43	PAR3216/11	41	37	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
44	PAR3265/11	46	43	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	RecNcil	N
45	PAR3285/11	66	65	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
46	PAR3290/11	60	45	F	F	N	N	N	N	N	N	N	*	N	N	N
47	PAR3293/11	66	65	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
48	PAR3300/11	53	43	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
49	PAR3303/11	54	40	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	PAR3304/11	59	47	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
51	PAR3306/11	69	65	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52	PAR3326/11	66	59	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53	PAR3327/11	45	44	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	PAR3422/11	57	52	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
55	PAR3835/12	93	61	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
56	PAR4035/12	68	58	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57	PAR4037/12	32	29	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	RecNcil	N

Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/ I	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11
58	PAR4038/12	70	68	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
59	PAR4039/12	69	67	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	PAR4040/12	78	74	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
61	PAR4041/12	50	46	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
62	PAR4042/12	49	47	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	W533Y
63	PAR4043/12	32	23	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N370S	N	N
64	PAR4045/12	59	55	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
65	PAR4046/12	59	57	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
66	PAR4047/12	76	76	F	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
67	PAR4048/12	63	60	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
68	PAR4049/12	52	51	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
69	PAR4050/12	54	52	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
70	PAR4061/13	56	46	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
71	PAR4064/13	51	51	F	F	N	N	N	N	N	N	N	*	N	N	N
72	PAR4065/13	67	66	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
73	PAR4067/13	67	62	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
74	PAR4068/13	52	43	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
75	PAR4069/13	58	57	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
76	PAR4070/13	65	59	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77	PAR4073/13	62	60	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
78	PAR4074/13	61	58	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D443N	N
79	PAR4076/13	52	50	M	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
80	PAR4077/13	43	40	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
81	PAR4080/13	59	55	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
82	PAR4082/13	69	45	M	F	N	N	N	N	N	N	N	E326K	N	N	N
83	PAR4088/13	35	31	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
84	PAR4091/13	56	54	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
85	PAR4097/13	72	64	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
86	PAR4098/13	58	52	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
87	PAR4099/13	54	47	M	E	N	N	N	N	N	S235P	N	N	N	N	N















Nº	Registro	Idade	IM	Sexo	F/I	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11
298	PAR4573/18	66	48	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
299	PAR4574/18	49	48	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N370S	N	N
300	PAR4575/18	63	54	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
301	PAR4580/18	41	38	M	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
302	PAR4582/18	41	37	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
303	PAR4583/18	67	63	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L444P	N
304	PAR4586/18	61	54	F	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N = Normal; \* = Não foi possível analisar; \*\*=Não possui informação.



Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
12	PAR2098/09	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	PAR2119/09	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
14	PAR2120/09	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
15	PAR2126/09	N	N	N	N	c.455-206/c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
16	PAR2128/09	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
17	PAR2266/09	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
18	PAR2271/09	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G/c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
19	PAR2278/09	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
20	PAR2285/09	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
21	PAR2374/10	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
22	PAR2376/10	N	N	N	N	N	N	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
23	PAR2384/10	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
24	PAR2385/10	N	N	N	N	N	N	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N





Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
51	PAR3306/11	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52	PAR3326/11	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	c.1389- 68T>C (rs2974924)	N
53	PAR3327/11	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
54	PAR3422/11	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
55	PAR3835/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
56	PAR4035/12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57	PAR4037/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	N	N	N
58	PAR4038/12	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
59	PAR4039/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	N	N	N
60	PAR4040/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.762- 18T>A/c.762- 18T>A (rs140335079)	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
61	PAR4041/12	N	N	N	N	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N
62	PAR4042/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225- 34/c.1225- 34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
63	PAR4043/12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
64	PAR4045/12	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
65	PAR4046/12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
66	PAR4047/12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
67	PAR4048/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
68	PAR4049/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
69	PAR4050/12	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
70	PAR4061/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
71	PAR4064/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
72	PAR4065/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
73	PAR4067/13	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
74	PAR4068/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
75	PAR4069/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
76	PAR4070/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
77	PAR4073/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
78	PAR4074/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
79	PAR4076/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
80	PAR4077/13	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
81	PAR4080/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
82	PAR4082/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
83	PAR4088/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
84	PAR4091/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
85	PAR4097/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
86	PAR4098/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
87	PAR4099/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
88	PAR4100/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
89	PAR4125/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
90	PAR4126/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
91	PAR4127/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
92	PAR4129/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
93	PAR4130/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
94	PAR4134/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
95	PAR4135/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
96	PAR4136/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
97	PAR4137/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
98	PAR4138/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
99	PAR4139/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
100	PAR4140/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
101	PAR4141/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
102	PAR4142/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
103	PAR4143/13	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
104	PAR4144/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
105	PAR4145/13	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
106	PAR4152/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
107	PAR4153/13	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
108	PAR4160/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
109	PAR4161/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
110	PAR4162/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
111	PAR4163/13	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
112	PAR4164/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
113	PAR4165/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
114	PAR4166/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
115	PAR4167/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
116	PAR4168/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
117	PAR4175/13	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
118	PAR4176/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
119	PAR4177/13	N	N	N	N	N	N	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
120	PAR4178/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
121	PAR4179/13	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	N	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
122	PAR4180/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
123	PAR4189/13	N	N	N	N	N	N	N	N	N
124	PAR4190/14	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N



Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
138	PAR4239/14	N	N	N	N	N	N	N	N	N
139	PAR4240/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
140	PAR4241/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
141	PAR4242/14	N	N	N	N	N	N	N	N	N
142	PAR4243/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
143	PAR4247/14	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
144	PAR4248/14	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
145	PAR4249/14	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
146	PAR4249A/14	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
147	PAR4250/14	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
148	PAR4251/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
149	PAR4252/14	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
150	PAR4253/14	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
151	PAR4254/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
152	PAR4261/14	N	N	N	N	N	N	N	N	N
153	PAR4262/14	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
154	PAR4264/14	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
155	PAR4265/14	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
156	PAR4266/14	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
157	PAR4267/14	N	N	N	N	N	N	N	N	N
158	PAR4268/14	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
159	PAR4269/14	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
160	PAR4270/14	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
161	PAR4271/14	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
162	PAR4272/14	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N







Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
202	PAR4374/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
203	PAR4375/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
204	PAR4376/15	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
205	PAR4377/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	N	N	N	N	N
206	PAR4378/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
207	PAR4385/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
208	PAR4386/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
209	PAR4387/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
210	PAR4391/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
211	PAR4397/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	N	N	N	N	N
212	PAR4403/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
213	PAR4404/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
214	PAR4406/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
215	PAR4412/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
216	PAR4413/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
217	PAR4415/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	N	N	c.1225-34/ c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
218	PAR4416/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
219	PAR4417/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
220	PAR4418/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
221	PAR4419/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
222	PAR4420/15	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
223	PAR4421/15	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
224	PAR4422/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A (rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
225	PAR4424/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
226	PAR4425/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
227	PAR4426/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A (rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
228	PAR4432/15	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
229	PAR4433/15	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
230	PAR4434/15	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
231	PAR4435/15	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
232	PAR4436/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	N	N	N
233	PAR4437/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
234	PAR4438/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
235	PAR4439/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
236	PAR4440/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
237	PAR4447/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
238	PAR4448/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
239	PAR4449/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
240	PAR4451/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
241	PAR4452/15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
242	PAR4453/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
243	PAR4454/15	N	N	N	N	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
244	PAR4455/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
245	PAR4456/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
246	PAR4457/15	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
247	PAR4459/15	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
248	PAR4460/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
249	PAR4461/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
250	PAR4462/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
251	PAR4463/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
252	PAR4470/15	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
253	PAR4471/15	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
254	PAR4472/15	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
255	PAR4473/15	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
256	PAR4475/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
257	PAR4476/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
258	PAR4477/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
259	PAR4485/16	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
260	PAR4486/16	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
261	PAR4490/16	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
262	PAR4491/16	N	c.28-133T>G (rs2070679)	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
263	PAR4492/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
264	PAR4493/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
265	PAR4494/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
266	PAR4495/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
267	PAR4500/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
268	PAR4501/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
269	PAR4502/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
270	PAR4508/16	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	c*102T>C (rs368275143)
271	PAR4509/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
272	PAR4515/16	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
273	PAR4522/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
274	PAR4523/16	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
275	PAR4528/17	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	c.1389-68T>C (rs2974924)	N
276	PAR4529/17	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
277	PAR4530/17	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
278	PAR4541/17	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
279	PAR4547/17	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
280	PAR4548/17	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
281	PAR4549/17	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	N	N	N
282	PAR4550/17	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
283	PAR4551/17	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
284	PAR4552/17	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
285	PAR4554/17	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
286	PAR4555/17	N	N	N	N	N	N	N	N	N
287	PAR4556/17	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
288	PAR4557/17	N	N	N	N	c.455-206A>C (rs7416991)	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
289	PAR4560/17	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
290	PAR4562/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	N	N	N
291	PAR4563/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
292	PAR4564/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G> A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
293	PAR4568/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N

Nº	Registro	Região promotora 5'UTR	Intron 1	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6	Intron 8	Intron 9	Região promotora 3'UTR
294	PAR4569/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	N	N	N
295	PAR4570/18	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	N	N	N	N
296	PAR4571/18	N	N	N	N	N	N	N	N	N
297	PAR4572/18	N	N	N	c.454+47G>A (rs2075569)	N	c.589-86A>G (rs2974923)	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
298	PAR4573/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
299	PAR4574/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
300	PAR4575/18	N	N	N	c.454+47G>A /c.454+47G>A(rs2075569)	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
301	PAR4580/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
302	PAR4582/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34/c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
303	PAR4583/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	N
304	PAR4586/18	N	N	N	N	N	N	c.1225-34C>A (rs3115534)	N	c*102T>C (rs368275143)

N = Normal.





Nº	Registro	IM	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4
88	4249A/14	35	N	N	N	N	N	N	N	N
89	4262/14	71	N	N	N	N	N	N	N	N
90	4263/14	53	N	N	N	N	N	N	N	N
91	4265/14	62	N	N	N	N	N	N	N	N
92	4266/14	46	N	N	N	N	N	N	N	N
93	4274/14	59	N	N	N	N	N	N	N	N
94	4284/14	46	N	N	N	N	N	N	N	N
95	4290/14	48	N	N	N	N	N	N	N	N
96	4291/14	38	N	N	N	N	N	N	N	N
97	4294/14	50	N	N	N	N	N	N	N	N
98	4304/14	52	N	N	N	N	N	N	N	N
99	4323/15	48	N	N	N	N	N	N	N	N
100	4324/15	62	N	N	N	N	N	N	N	N
101	4328/15	63	N	N	N	N	N	N	N	N
102	4332/15	56	N	N	N	N	N	N	N	N
103	4343/15	60	N	N	N	N	N	N	N	N
104	4346/15	60	N	N	N	N	N	N	N	N
105	4365/15	35	N	N	N	N	N	N	N	N
106	4373/15	63	N	N	N	N	N	N	N	N
107	4377/15	49	N	N	N	N	N	N	N	N
108	4378/15	46	N	N	N	N	N	N	N	N
109	4386/15	18	N	N	N	N	N	N	N	N
110	4387/15	38	N	N	N	N	N	N	N	N
111	4406/15	43	N	N	N	N	N	N	N	N
112	4417/15	62	N	N	N	N	N	N	N	N
113	4418/15	69	N	N	N	N	N	N	N	N
114	4425/15	55	N	N	N	N	N	N	N	N
115	4433/15	23	N	N	N	N	N	N	N	N
116	4447/15	64	N	N	N	N	N	N	N	N
117	4448/15	38	N	N	N	N	N	N	N	N
118	4454/15	51	N	N	N	N	N	N	N	N
119	4472/15	40	N	N	N	N	N	N	N	N
120	4508/16	47	N	N	N	N	N	N	N	N
121	4509/16	35	N	N	N	N	N	N	N	N
122	4515/16	43	N	N	N	N	N	N	N	N

N= Normal

**APÊNDICE F - Resultados da análise molecular dos exons do gene *GBA* em pacientes saudáveis (amostra controle)**

Nº	Registo	Idade (anos)	Sexo	Exon 2	Exon 3	Exon 8
1	COPAR1486/07	61	F	N	N	N
2	COPAR1492/07	75	F	N	N	N
3	COPAR1531/07	74	F	N	N	N
4	COPAR1534/07	73	F	N	N	N
5	COPAR1538/07	67	F	N	N	N
6	COPAR1590/07	73	F	N	N	N
7	COPAR1692/07	65	F	N	N	N
8	COPAR1694/07	73	M	N	N	N
9	COPAR1786/07	71	F	N	N	N
10	COPAR1790/07	64	F	N	N	N
11	COPAR2050/09	58	M	N	N	N
12	COPAR2052/09	54	M	N	N	N
13	COPAR2053/09	60	M	N	N	N
14	COPAR2054/09	50	M	N	N	N
15	COPAR2055/09	53	M	N	N	N
16	COPAR2062/09	53	M	N	N	N
17	COPAR2070/09	55	M	N	N	N
18	COPAR2071/09	59	M	N	N	N
19	COPAR2073/09	55	M	N	N	N
20	COPAR2074/09	63	M	N	N	N
21	COPAR2076/09	56	M	N	N	N
22	COPAR2078/09	51	M	N	N	N
23	COPAR2105/09	65	M	N	N	N
24	COPAR2106/09	70	M	N	N	N
25	COPAR2109/10	63	M	N	N	N
26	COPAR2110/09	65	M	N	N	N
27	COPAR2111/09	69	M	N	N	N
28	COPAR2132/09	72	M	N	N	N
29	COPAR2146/09	72	M	N	N	N
30	COPAR2147/09	67	M	N	N	N
31	COPAR2148/09	72	M	N	N	N
32	COPAR2159/09	52	F	N	N	N
33	COPAR2168/09	71	F	N	N	N
34	COPAR2169/09	74	F	N	N	N
35	COPAR2170/09	72	M	N	N	N
36	COPAR2171/09	60	M	N	N	D443N
37	COPAR2174/09	66	M	N	N	N
38	COPAR2175/09	68	F	N	N	N
39	COPAR2177/09	66	F	N	N	N
40	COPAR2182/09	82	F	N	N	N
41	COPAR2184/09	52	M	N	N	N
42	COPAR2185/09	51	M	N	N	N

Nº	Registo	Idade (anos)	Sexo	Exon 2	Exon 3	Exon 8
43	COPAR2187/09	57	M	N	N	N
44	COPAR2193/09	54	M	N	N	N
45	COPAR2194/09	85	M	N	N	N
46	COPAR2195/09	53	F	N	N	N
47	COPAR2196/09	52	M	N	N	N
48	COPAR2200/09	64	F	N	N	N
49	COPAR2201/09	95	F	N	N	N
50	COPAR2202/09	60	M	N	P68P	N
51	COPAR2203/09	73	F	N	N	N
52	COPAR2204/09	63	F	N	N	N
53	COPAR2205/09	72	M	N	N	N
54	COPAR2209/09	66	F	N	N	N
55	COPAR2210/09	56	F	N	N	N
56	COPAR2211/09	68	M	N	N	N
57	COPAR2213/09	66	F	N	N	N
58	COPAR2222/09	70	F	N	N	N
59	COPAR2224/09	50	M	N	N	N
60	COPAR2227/09	75	F	N	N	N
61	COPAR2234/09	58	M	N	N	N
62	COPAR2236/09	59	M	N	N	N
63	COPAR2237/09	53	M	N	N	N
64	COPAR2240/09	56	M	N	N	N
65	COPAR2245/09	79	M	N	N	N
66	COPAR2297/09	74	F	K(-)27R	N	N
67	COPAR2325/09	85	M	N	N	N
68	COPAR2337/09	51	M	N	N	N
69	COPAR2415/10	60	M	K(-)27R	N	N
70	COPAR2419/10	71	F	N	N	N
71	COPAR2424/10	71	F	N	N	N
72	COPAR2427/10	71	M	N	N	N
73	COPAR2428/10	75	F	N	N	N
74	COPAR2433/10	78	M	N	N	N
75	COPAR2441/10	55	F	N	N	N
76	COPAR2443/10	74	F	N	N	N
77	COPAR2444/10	68	F	N	N	N
78	COPAR2448/10	55	M	N	N	N
79	COPAR2450/10	51	F	N	N	N
80	COPAR2452/10	52	M	N	N	E326K
81	COPAR2475/10	79	M	N	N	N
82	COPAR2493/10	56	F	N	N	G325G
83	COPAR2506/10	70	M	K(-)27R	N	N
84	COPAR2513/10	75	F	N	N	N
85	COPAR2514/10	79	M	N	N	N
86	COPAR2515/10	74	M	N	N	N
87	COPAR2516/10	66	M	N	N	N

N°	Registo	Idade (anos)	Sexo	Exon 2	Exon 3	Exon 8
88	COPAR2517/10	56	F	N	N	N
89	COPAR2522/10	92	F	N	N	N
90	COPAR2524/10	69	F	N	N	N
91	COPAR2613/10	64	F	N	N	N
92	COPAR2615/10	82	F	N	N	N
93	COPAR2663/10	58	M	N	N	N
94	COPAR2867/10	86	F	N	N	N
95	COPAR2870/10	67	F	N	N	N
96	COPAR2873/10	69	F	N	N	N
97	COPAR2879/10	67	F	N	N	N
98	COPAR2952/10	68	F	N	N	N
99	COPAR2974/10	70	F	N	N	N
100	COPAR2997/10	64	M	N	N	N

N = Normal.