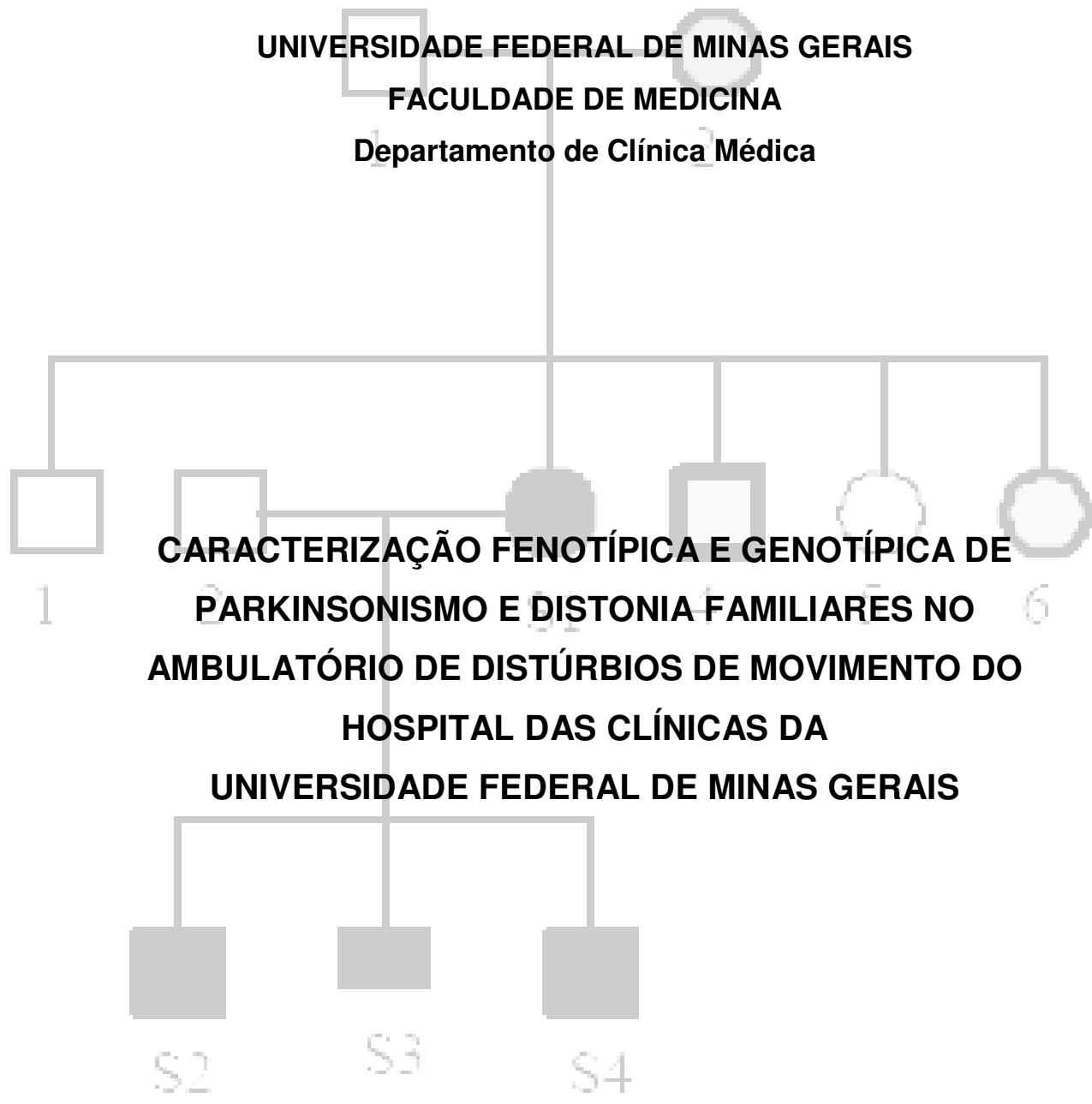


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Clínica Médica



SARAH TEIXEIRA CAMARGOS

SARAH TEIXEIRA CAMARGOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
PARKINSONISMO E DISTONIA FAMILIARES NO
AMBULATÓRIO DE DISTÚRBIOS DE MOVIMENTO DO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cardoso.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral (coordenador)

Profa. Dra. Maria da Consolação Vieira Moreira (subcoordenadora)

Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes

Prof. Dr. Marcus Vinícius de Melo Andrade

Prof. Dr. Nilton Alves de Rezende

Profa. Dra. Suely Meireles Rezende

Elizabete Rosária de Miranda (representante discente)

Ao meu amor, Leandro.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Francisco Cardoso, meu orientador.

Aos professores Andrew Singleton e John Hardy, do *Laboratory of Neurogenetics, National Institutes of Health*.

Aos amigos dos Estados Unidos da América (EUA) - Cristian Condack, Fabíola e Edgard Rizzatii, Sonja Scholzs, Javier Simon Sanchez, Parastoo Momeni, Joyce van de Lemmput.

À família “C” de Bom Despacho.

À família “C” de Dores de Guanhões e à enfermeira Neusa.

Aos incentivadores: Rodrigo Santiago, Antônio Lúcio Teixeira Jr, Paulo Caramelli, Juliana Gurgel-Giannetti, Mauro Cunningham, Leonardo Dornas e Débora Palma Maia.

Ao laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao laboratório de Doenças Infectoparasitárias do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial à Aguidemir.

À Dra Sandra Xavier.

A minha família: minha amada mãe, Carmen; Camila, Erony, Elmano e Cássia.

“(...) No real da vida, as coisas acabam com menos formato, às vezes nem acabam..... Melhor assim, pelear pelo exato dá erro contra a gente. Não se queira. Viver é muito perigoso.... Qual o caminho certo da gente? Nem para trás nem para frente: só para cima (...)”

João Guimarães Rosa

Grande Sertão:Veredas, 1956.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi fazer uma avaliação fenotípica e genotípica de pacientes com parkinsonismo e distonia de início precoce e parkinsonismo e distonia familiares. Foram atendidos no ambulatório de Movimentos Anormais do Hospital das Clínicas da UFMG 575 pacientes entre junho de 2005 e junho de 2006, dos quais 39% preenchiam critérios para parkinsonismo e 33% preenchiam critérios para distonia. Foram selecionados oito pacientes com doença de Parkinson familiar de início habitual, 45 com doença de Parkinson de início precoce (PIP), 11 com distonia e parkinsonismo familiar, sete com distonia responsiva à dopa, quatro com neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro e 21 com distonia de início precoce e distonia familiar. Os pacientes foram caracterizados clinicamente e genes conhecidos (*PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA*, *GCH1*, *PANK2*, *DYT1*, *DYT12*) foram seqüenciados de acordo com a doença dos indivíduos. Os éxons *PRKN* e *SNCA* foram dosados. Causas hereditárias puderam ser identificadas em 18,8% dos casos de distonia e parkinsonismo familiares e de início precoce na presente série, permitindo inferir que causas não hereditárias, genes não testados ou genes ainda não descritos podem participar da etiopatogenia da doença nos casos em que o gene causador não pode ser identificado. Foram encontradas mutações novas nos genes *PINK1* (del exon 7), *LRRK2* (Q923H) e *CGH1* (T209P). Foram também encontradas mutações já anteriormente descritas em *PRKN* (W54R em heterozigose composta com V3I; heterozigose composta de 255Adel com T240M, heterozigose composta de P253R com duplicação do éxon 5 e também heterozigose simples de 255Adel e T240M), *GCH1* (M211V e K224R) e *PANK2* (N294I). Os indivíduos com parkinsonismo de início precoce e das demais séries de herança provável autossômico-recessiva foram selecionados para o estudo amplo do genoma a partir de *single nucleotide polymorphism* (SNP). Nenhuma SNP se mostrou estatisticamente relevante nos pacientes com PIP em relação aos controles. Não houve alteração estrutural (duplicação ou deleção) em nenhuma região não descrita em controles saudáveis. Foi encontrado um traço de homozigose comum em duas famílias com quadro clínico de distonia e parkinsonismo no cromossomo 2 em uma região compreendendo 1,2Mb. Os éxons codificantes dos 12 genes da região foram seqüenciados e foi encontrada mutação segregadora de doença no gene *PRKRA* (P222L). O gene codifica uma proteína quinase de indução de interferon dependente de ativador de ácido ribonucléico (RNA) de dupla-fita. *PRKRA* ativa a quinase latente PKR no caso de estresse extracelular. Este foi, então, identificado como um novo gene causador de distonia, o primeiro com transmissão autossômico-recessiva, denominado DYT16.

Palavras-chave: Avaliação fenotípica. Avaliação genotípica. Parkinsonismo. Distonia de início precoce.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize phenotypically and genotypically patients with early onset and familiar parkinsonism and dystonia. During the period of June 2005 through June 2006, 575 patients were assisted at Movement Disorder Clinic, Minas Gerais Federal University. From all, 39% filled criteria for parkinsonism and 33% for dystonia. We selected eight familiar Parkinson disease patients, 45 early onset Parkinson disease patients (EOPD), 11 dystonia and parkinsonism patients, seven dopa responsive dystonia patients, four patients with diagnosis of neurodegeneration with brain iron accumulation and 21 patients with familiar dystonia and early onset dystonia. Accordingly with the phenotype, we studied the known genes *PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA*, *GCH1*, *PANK2*, *DYT1*, *DYT12*. Gene dosage was performed for the exons of *PRKN* and *PINK1*. Hereditary causes were identified in 18.8% of patients with parkinsonism and dystonia. We described new mutations in *PINK1* gene (del exon 7), *LRRK2* (Q923H) and *CGH1* (T209P). We have found the described mutations in *PRKN* (W54R in compound heterozygous with V3I; 255A del in compound heterozygous with T240M, P253R in compound heterozygous with exon 5 duplication, 255A del single mutation and T240M single mutation), *GCH1* (M211V e K224R) and *PANK2* (N294I). Patients with early onset Parkinson disease and patients with autosomal recessive inheritance (negative for known mutations) were selected for Whole Genomic Association Study. We failed to find any SNP with significant statistical association in parkinsonian patients when compared with controls. We also failed to find structural association (deletion or duplication) in a region not previously described in healthy controls. A common homozygous track was found in two non correlated and consanguineous families with dystonia and parkinsonism. This was located in the chromosome 2 in a region comprising 1.2Mb. The coding exons from the 12 genes from region were sequenced and we found a mutation segregating disease at *PRKA* gene (P222L). The gene codifies a protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator. *PRKA* activates a latent PKR in case of cellular stress. We describe a new gene related to dystonia; the first with autosomal recessive inheritance, nominated *DYT16*. Non hereditary causes (environmental), not tested genes or not described genes might participate of the disease pathology in the cases we didn't find out the cause.

Keys words: Phenotypic spectrum. Genotypic evaluation. Parkinsonism. Early onset dystonia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Autossômico-dominante
AMP	Amplificação
AR	Autossômico-recessivo
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	<i>BeadChip</i>
Bp	Pares de base (<i>base pair</i>)
<i>CGH1</i>	Gene GTP ciclo-hidrolase 1
cM	Centi-Morgan
DIP	Distonia de início precoce
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Dinucleotídeos
DP	Doença de Parkinson
DPIA	Distonia-parkinsonismo de início abrupto
<i>DYT</i>	Locus de distonia familiar
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>GCH1</i>	GTP- ciclo hidroxilase 1
<i>GTP</i>	Trifosfato de guanina
GW-SNP	<i>Genome wide single nucleotide polymorphism association</i>
<i>HAGH</i>	Hidrolase hidroxiacilglutatiônica
HC	Hospital das Clínicas
<i>LRRK2</i>	Gene quinase rica em repetição de leucina tipo 2
MAOB	Monoamino oxidase B
MPP	Metilfenilpiridina
MPTP	Tetra-hidropteridina
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	<i>US National Center for Biotechnology Information</i>
<i>ND3</i>	Gene codificador da subunidade 3 da NADH desidrogenase
<i>NINDS</i>	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NT	<i>Non template</i>

<i>PANK2</i>	Gene da pantotenato quinase 2
<i>PARK</i>	Locus de parkinsonismo familiar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
<i>PINK1</i>	Gene quinase indutora de PTEN (fosfatase e tensina homólogos)
PIP	Parkinson de início precoce
<i>PRKN</i>	Gene Parkin
PSP	Paralisia supranuclear progressiva
RNA	Ácido ribonucléico
RNM	Ressonância nuclear magnética
rpm	Rotação por minuto
<i>SNCA</i>	Gene da α -Sinucleína
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SUP	Sistema ubiquitina-proteossoma
TCC	Tomografia computadorizada de crânio
<i>UCHL</i>	Codificador de L1 ubiquitina carboxiterminal hidrolase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPDRS	<i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>
WGA	<i>Whole Genomic Association</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Esquema da patogênese da morte neuronal na DP.....	25
FIGURA 2 - Etapas de extração de DNA genômico de sangue total.....	54
FIGURA 3 - Visualização de produtos de PCR e controle negativo.....	56
FIGURA 4 - Visualização da placa WG #1 AMP2.....	62
FIGURA 5 - Sumário do processo do <i>Illumina</i> TM	66
FIGURA 6 - Mutação inédita no gene LRRK2- Q923H.....	73
FIGURA 7 - Heredograma da família 6.....	76
FIGURA 8 - Heredograma da família 7.....	77
FIGURA 9 - Heredograma da família 8.....	79
FIGURA 10 - Mutação inédita no gene GCH1.....	82
FIGURA 11 - Mutações inéditas em heterozigose composta no gene GCH1.....	82
FIGURA 12 - Imagens compatíveis com neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro em pacientes negativos para mutações em <i>PANK2</i>	84
FIGURA 13 - Mutação homozigótica em <i>PANK2</i>	84
FIGURA 14 - Heredograma da família 9.....	85
FIGURA 15 - Heredograma da família 10.....	86
FIGURA 16 - Heredograma da família 11.....	87
FIGURA 17 - Heredograma da família 12.....	88
FIGURA 18 - Heredograma da família 13.....	89
FIGURA 19 - Traço de homozigose comum entre duas famílias portadoras de distonia generalizada e provenientes de casamentos consangüíneos.....	93
FIGURA 20 - Seqüenciamento de <i>PRKRA</i> mostrando o mutante em azul, o alelo normal em vermelho e o portador em verde.....	94

Gráficos

GRÁFICO 1 - Distribuição fenomenológica dos pacientes do Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.....	69
---	----

Quadros

QUADRO 1 - Causas de parkinsonismo familiar.....	34
QUADRO 2 - Classificação etiológica das distonias.....	36
QUADRO 3 - Causas de distonia familiar.....	46
QUADRO 4 - Genes testados em cada série.....	55
QUADRO 5 - Ciclos de temperatura e tempo do PCR <i>touchdown</i>	56
QUADRO 6 - Ciclos de temperatura e tempo em PCR de seqüenciamento.....	57
QUADRO 7 - Ciclos de temperatura e tempo em PCR de dosagem de éxons.....	59
QUADRO 8 - Dados comparativos dos pacientes portadores e não-portadores de mutações em <i>PRKN E PINK1</i>	74
QUADRO 9 - Dados clínicos dos pacientes portadores de mutações em <i>PRKN E PINK1</i>	75
QUADRO 10 - Dados clínicos dos pacientes com distonia dopa-responsiva.....	81
QUADRO 11 - Pacientes selecionados para o estudo genotípico.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características demográficas dos portadores de distonia.....	70
TABELA 2 - Características demográficas dos portadores de parkinsonismo.....	71
TABELA 3 - Dados clínicos dos pacientes com doença de Parkinson de início habitual e familiar.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doença de Parkinson.....	18
1.1.1 Patogênese da morte neuronal.....	20
1.1.1.1 Sistema ubiquitina proteossomo.....	20
1.1.1.2 Outras teorias.....	21
1.1.1.2.1 Fatores ambientais.....	21
1.1.1.2.2 Herança mitocondrial e disfunção mitocondrial.....	22
1.1.2 Doença de Parkinson familiar de herança mendeliana.....	23
1.1.2.1 <i>PARK1</i>	26
1.1.2.2 <i>PARK2</i>	27
1.1.2.3 <i>PARK4</i>	28
1.1.2.4 <i>PARK5</i>	28
1.1.2.5 <i>PARK6</i>	29
1.1.2.6 <i>PARK7</i>	29
1.1.2.7 <i>PARK8</i>	30
1.1.2.8 <i>PARK9</i>	32
1.1.2.9 Papel das mutações heterozigóticas simples em genes recessivos.....	32
1.2 Distonia.....	35
1.2.1 <i>DYT1</i>	37
1.2.2 <i>DYT3</i>	38
1.2.3 <i>DYT5</i>	40
1.2.4 <i>DYT8</i>	40
1.2.5 <i>DYT11</i>	42
1.2.6 <i>DYT12</i>	43
1.2.7 <i>PANK2</i>	44
1.3 Considerações finais.....	45
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo primário.....	49
2.2 Objetivos secundários.....	49

3 PACIENTES E MÉTODOS.....	50
3.1 Parecer ético.....	51
3.2 Pacientes.....	51
3.2.1 Critérios de inclusão.....	51
3.3 Métodos.....	52
3.3.1 Critérios do Banco de Cérebro de Londres (<i>Uk Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria</i>).....	52
3.3.2 Critérios de Fahn, Brassman e Marsden.....	52
3.3.3 Divisão em séries.....	53
3.3.4 Extração de DNA.....	53
3.3.4.1 Coleta de sangue.....	53
3.3.4.2 Extração de DNA.....	54
3.3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	55
3.3.5.1 Purificação do produto da PCR.....	57
3.3.6 Reação de seqüenciamento.....	57
3.3.6.1 Purificação da reação de seqüenciamento.....	58
3.3.6.2 Análise da reação de seqüenciamento.....	58
3.4 Análise quantitativa de éxons.....	58
3.4.1 Cálculo dos valores de CT.....	59
3.5 Análise na plataforma <i>Illumina</i> TM	60
3.5.1 Protocolo indicado pelo <i>Illumina</i> TM	61
3.5.1.1 Fazer AMP2 (amplificação do DNA).....	61
3.5.1.2 Fragmentar AMP2.....	61
3.5.1.3 Precipitar AMP2.....	62
3.5.1.4 Ressuspender AMP2.....	63
3.5.1.5 Hibridizar no <i>BeadChip</i> TM	63
3.5.1.6 Incubar o <i>BeadChip</i> TM	64
3.5.1.7 Estender BC2.....	64
3.5.1.8 Lavar e secar.....	65
3.5.1.9 Lendo os <i>BeadChips</i>	66
3.6 Análise do mapa de autozigose.....	66
4 RESULTADOS.....	68

4.1 Dados demográficos da amostra.....	69
4.2 Estudo clínico-molecular da série 1: doença de Parkinson de início habitual familiar (n=8).....	72
4.3 Estudo clínico-molecular da série 2: doença de Parkinson de início precoce (n= 45).....	73
4.4 Estudo clínico-molecular da série 3: distonia e parkinsonismo familiar (n=9).....	75
4.5 Estudo clínico-molecular da série 4: distonia responsiva à dopa (n=7)	80
4.6 Estudo clínico-molecular da série 5: neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro ou doença de Hallervorden Spatz (n=4).....	82
4.7 Estudo clínico-molecular da série 6: distonia de início precoce e distonia familiar (n=21).....	85
4.8 Análise genotípica pelo <i>Illumina</i>	90
5 DISCUSSÃO.....	95
5.1 Dados demográficos da amostra.....	96
5.2 Estudo clínico-molecular da série 1.....	97
5.3 Estudo clínico-molecular da série 2.....	98
5.4 Estudo clínico-molecular da série 3.....	100
5.5 Estudo clínico-molecular da série 4.....	101
5.6 Estudo clínico-molecular da série 5.....	102
5.7 Estudo clínico-molecular da série 6.....	103
5.8 Análise genotípica pelo <i>Illumina</i> TM	104
6 CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS.....	110
APÊNDICES E ANEXOS.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), inicialmente descrita por James Parkinson em 1817 e denominada por ele de “paralisia agitante”, é afecção neurológica das mais comuns e sua incidência anual está estimada em cinco a 24 casos em 100.000 pessoas (MARTTILA; RINNE, 1981). É considerada a segunda maior causa de doença neurodegenerativa depois da doença de Alzheimer, estando presente em até 1% da população após os 65 anos (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1996), chegando a 4 a 5% da população acima dos 85 anos (FAHN, 2003). Estudos epidemiológicos mostram aumento da incidência da doença de acordo com a idade, crescendo rapidamente após a quinta década (MAYEUX *et al.*, 1995).

Estima-se que a DP seja responsável por aproximadamente 86% dos casos de parkinsonismo (RAJPUT *et al.*, 1984). Um estudo de prevalência de parkinsonismo em uma clínica de Distúrbios de Movimento no Brasil mostrou porcentagem de 68,9% de DP (CARDOSO; CAMARGOS; SILVA JÚNIOR, 1998). Foi demonstrado em uma pesquisa populacional brasileira que a taxa de prevalência na população acima de 64 anos é de 3,3% (BARBOSA *et al.*, 2006).

Estudos de prevalência nos Estados Unidos e Europa (*The National Parkinson Foundation*) mostraram que Parkinson de início precoce (PIP) contribui com 4 a 10% dos casos de DP (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003). Define-se PIP como doença iniciada entre os 21 e 40 anos (QUINN; CRITCHLEY; MARSDEN, 1987). Estudos epidemiológicos recentes de Sveinbjornsdottir *et al.* (2000) e Payami *et al.* (2002) indicam que há mais evidência de um componente genético na etiopatogenia de PIP quando comparado à DP. Tanner *et al.* (1999) acompanharam 19.842 gêmeos mono e dizigóticos e concluíram que não havia um componente genético evidente quando a doença iniciava-se após os 50 anos. No entanto, houve alta concordância de DP em gêmeos monozigóticos (e baixa em dizigóticos) quando a doença se iniciava antes dos 50 anos, sugerindo, portanto, um componente hereditário em PIP.

O componente familiar na DP foi descrito inicialmente por Leroux em 1880, embora esse fato seja também atribuído a Gowers em 1900 (GOWERS, 1900).

Aproximadamente 10% dos casos de DP têm padrão de herança familiar (OLANOW; MCNAUGHT, 2006). Genes causadores de DP são identificados em 2 a 3% de todos os casos (KLEIN; SCHLOSSMACHER, 2007). Há clara evidência de que fatores etiológicos variam na dependência de contexto geográfico e hereditário. Formas monogênicas de DP e suas respectivas mutações podem variar consideravelmente entre populações (HARDY *et al.*, 2006). A teoria mais aceita atualmente é a de que a degeneração nigral com formação de corpos de Lewy é resultado de um processo multifatorial no qual tanto fatores hereditários quanto ambientais são participantes do processo da doença.

Os sintomas cardeais da doença consistem na lentidão dos movimentos (bradicinesia), além de tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. Os achados anatomopatológicos da DP clássica constituem perda de neurônios dopaminérgicos na porção compacta da substância negra, além da presença de corpos de Lewy nos neurônios remanescentes (embora haja alguns casos de doença de Parkinson que não apresentem corpos de Lewy). Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas proteináceas e eosinofílicas que contêm proteínas livres e conjugadas à ubiquitina, diversas enzimas e proteínas do citoesqueleto celular. O conteúdo proteináceo dos corpos de Lewy inclui neurofilamentos, ubiquitina, α -sinucleína ligada à proteína sinfilina 1 e TorsinaA, enzimas de ubiquitinação e deubiquitinação, ativadores de proteossomos e proteínas induzidas por choque térmico. O centro do corpo de Lewy é formado de agregados de proteínas ubiquitinizadas e a radiação é composta de neurofilamentos e α -sinucleína. Os corpos de Lewy contêm também lípidos e carboidratos, estando ausentes os ácidos nucleicos (OLANOW *et al.*, 2004). É sabido que na DP ocorre degeneração neuronal em outras regiões do cérebro, tais como o *locus coeruleus*, núcleo dorsal do vago, núcleo basal de Meynert e o sistema olfatório.

1.1.1 Patogênese da morte neuronal

1.1.1.1 Sistema ubiquitina proteossomo

A morte neuronal na doença de Parkinson parece ocorrer secundariamente à sinalização de processo apoptótico envolvendo uma cascata de eventos que incluem o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e excitotoxicidade (OLANOW; MCNAUGHT, 2006).

Sugere-se que uma falha no sistema ubiquitina-proteossomo (SUP), o qual degrada proteínas de descarte, seja o pivô na patogênese da doença tanto em sua forma esporádica quanto hereditária (HALLIWELL; JENNER, 1998; MCNAUGHT; OLANOW; HALLIWELL, 2001). O SUP é essencial para degradação e clareamento não-lisossomal de proteínas descartáveis em células eucariotas (proteínas mutadas, oxidadas, deslocadas, etc). O sistema consiste em uma série de reações enzimáticas que realizam uma ligação covalente de múltiplos de ubiquitina à proteína-alvo, como forma de sinalização para a degradação: inclui três enzimas que ativam, conjugam e ligam a ubiquitina (E1, E2, E3). O conjugado proteína-ubiquitina é reconhecido e degradado pela subunidade 26S do proteossomo. Com essa operação são liberadas cadeias de ubiquitina que serão degradadas pela ubiquitina carboxiterminal hidrolase para produção de novos monômeros de ubiquitina. Na deubiquitinação, os monômeros da ubiquitina se ligam à subunidade 20S do proteossomo. O ciclo reinicia-se com a ubiquitina reentrando no SUP em E1.

O aumento das proteínas intracelulares gera incremento da expressão dos proteossomos, com posterior formação de agregossomos. Os agregossomos são inclusões proteínicas formadas no centrosomo (centro perinuclear de organização de microtúbulos durante a mitose celular) em resposta ao estresse proteolítico. Isso ocorre quando o SUP excede sua capacidade. As proteínas são transportadas ao longo dos microtúbulos para o centrosomos. Eles seqüestram e degradam proteínas não desejadas, ora em excesso, ora mutadas ou danificadas. São unidades protetoras dos neurônios em resposta às proteínas de organização terciária alterada; promovem o clareamento das proteínas, criando, assim,

proteção contra a atividade citotóxica. O acúmulo de proteínas anormais e a falha do SUP leva o neurônio a um estado chamado estresse proteolítico, no qual são dificultados processos críticos para a célula, como transporte axonal, plasticidade sináptica e neurotransmissão, além de também ocorrer indução à citotoxicidade (OLANOW; MCNAUGHT, 2006).

Há possibilidade de que a formação de corpos de Lewy seja decorrência de efeito citoprotetor, no qual ocorre seqüestramento e compartimentalização de proteínas não degradadas em agregados insolúveis nos neurônios dopaminérgicos (MCNAUGHT; OLANOW; HALLIWELL, 2001). Os corpos de Lewy muito se assemelham aos agregossomos. Inibição de formação de corpos de inclusão em modelos de estresse proteolítico leva à morte celular mais rápida e grave (OLANOW; MCNAUGHT, 2006). Em regiões em que não se degeneram em DP, como córtex, hipocampo, ponte e cerebelo, observa-se aumento da atividade proteossômica, sugerindo um mecanismo compensatório contra a neurodegeneração, tornando mais relevante a teoria de SUP na etiopatogênese da doença. Há alguns modelos experimentais de parkinsonismo com inclusões citoplasmáticas ricas em α -sinucleína e ubiquitina, além de perda dopaminérgica após a administração de inibidores proteossômicos, embora esse modelo não tenha sido reproduzido por outros grupos (OLANOW; MCNAUGHT, 2006).

1.1.1.2 Outras teorias

1.1.1.2.1 Fatores ambientais

Langston *et al.* (1983) descreveram parkinsonismo em pacientes usuários de drogas ilícitas contendo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetra-hidropteridina (MPTP), ascendendo o interesse de que fatores ambientais poderiam modular a doença. O MPTP passa livremente pela barreira hematoencefálica e é oxidado em metilfenilpiridina (MPP⁺) pela monoamino oxidase B (MAOB). O MPP⁺ é transportado para o interior dos neurônios por um transportador ativo de dopamina e se concentra na mitocôndria. Na mitocôndria, liga e inibe o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH I), bloqueia a fosforilação

oxidativa e a produção de trifosfato de adenosina (ATP), aumenta a produção de radicais livres e óxido nítrico, levando a apoptose e morte celular. Diversos outros pesticidas são conhecidos por sua capacidade de agir como bloqueio da ação mitocondrial (organo clorados, tiadidazóis, piretróides e outros). Betarbet *et al.* (2000) descreveram um modelo animal de administração crônica do inseticida rotenona em ratos. Esse modelo é ainda mais próximo da DP do que o modelo com MPTP, por sua alta especificidade de neurodegeneração nigroestriatal, incluindo formação de corpos de Lewy. Assim como a MPTP, a rotenona é inibidora do complexo respiratório mitocondrial do tipo I.

Entre outros estudos de caso-controle, Gorell *et al.* (1998) encontraram risco mais alto de desenvolvimento de DP em indivíduos provenientes da área rural quando comparados com indivíduos provenientes de área urbana. Priyadarshi *et al.* (2001) fizeram uma metanálise com 59 investigações de associação entre DP e indivíduos provenientes de área rural, fazendeiros, exposição a animais de fazenda, pesticidas e água de poço. A maioria dos estudos relatou elevação significativa do risco de DP e exposição a fatores ambientais, como habitação no meio rural, trabalho rural, exposição a pesticidas, animais de fazenda e água de poço.

Sugita *et al.* (2000) fizeram uma metanálise de varios estudos e verificaram associação estatisticamente significativa entre o risco de não fumar e o desenvolvimento de DP. O risco de o fumante desenvolver DP parece ser a metade do risco do não fumante. Os mecanismos pelos quais o cigarro exerce proteção contra a DP são ainda incertos.

Associação entre a ingestão de cafeína com o decréscimo do risco para DP foi descrita por Tan *et al.* (2007). Alguns autores apostam na hipótese de que a DP seja a resultante de fatores ambientais agindo em indivíduos geneticamente predispostos e susceptíveis ao envelhecimento.

1.1.1.2.2 Herança mitocondrial e disfunção mitocondrial

Van der Walt *et al.* (2003) evidenciaram polimorfismos no genoma mitocondrial (complexo I da cadeia respiratória, subunidade 3 da NADH desidrogenase - ND3) relacionados à susceptibilidade à doença.

O reconhecimento de que o MPTP altera a função oxidativa mitocondrial inibindo o complexo I da cadeia respiratória sugere que defeitos mitocondriais congênitos ou adquiridos possam ter papel na gênese da DP. Modelos animais corroboram a hipótese. No modelo da rotenona, o complexo I da cadeia respiratória é inibido em todos os tecidos, mas a doença nos neurônios dopaminérgicos do sistema nigral é seletiva. Uma explicação para esse fato seria a maior vulnerabilidade desses tecidos ao estresse oxidativo. As mitocôndrias comprometidas seriam mais susceptíveis ao apoptose e ao estresse oxidativo em áreas mais susceptíveis, como os neurônios do sistema nigroestriatal (CHINOPOULOS; ADAM-VIZI, 2001).

1.1.2 Doença de Parkinson familiar de herança mendeliana

Há várias causas de parkinsonismo hereditário, algumas são DP e outras são doenças neurodegenerativas também hereditárias, que se apresentam com sinais parkinsonianos (mutações na proteína tau associadas à demência fronto-temporal, ataxias espinocerebelares tipos 2 e 3, por exemplo). Essas doenças, além de serem diferentes no aspecto clínico da DP idiopática, não podem ser consideradas doença de Parkinson, pois não há enfermidade ligada à perda seletiva de neurônios dopaminérgicos e aos corpos de Lewy (HARDY *et al.*, 2006).

As formas de parkinsonismo autossômico-dominantes levam ao ganho de função tóxica, ao passo que as autossômico-recessivas levam à perda de função protetora de estresse oxidativo. As mutações dominantes falam de agregação protéica, corpos de inclusão e perda neuronal e as recessivas de perda da função protetora. As proteínas envolvidas no processo etiopatológico da DP têm envolvimento na dinâmica de lipídios e vesículas (α -sinucleína), SUP (Parkina e

UCHL1), sinalização com fosforilação (*LRRK2*), estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Parkina, *PINK1* e DJ1), além de estabilidade dos microtúbulos (tau). Disfunções nessas vias associadas ao envelhecimento levam à morte de neurônios dopaminérgicos e à DP (FARRER, 2006).

Até a presente data, foram descobertos, a partir de análises de ligação, 13 regiões genômicas envolvendo parkinsonismo. Os *PARKs* descritos a seguir são aqueles cujos genes e proteínas codificadas pelo mesmo foram identificadas. Os demais *loci* estão descritos no QUADRO 1. A FIG. 1 mostra esquematicamente a proposta de patogênese da morte neuronal na DP.

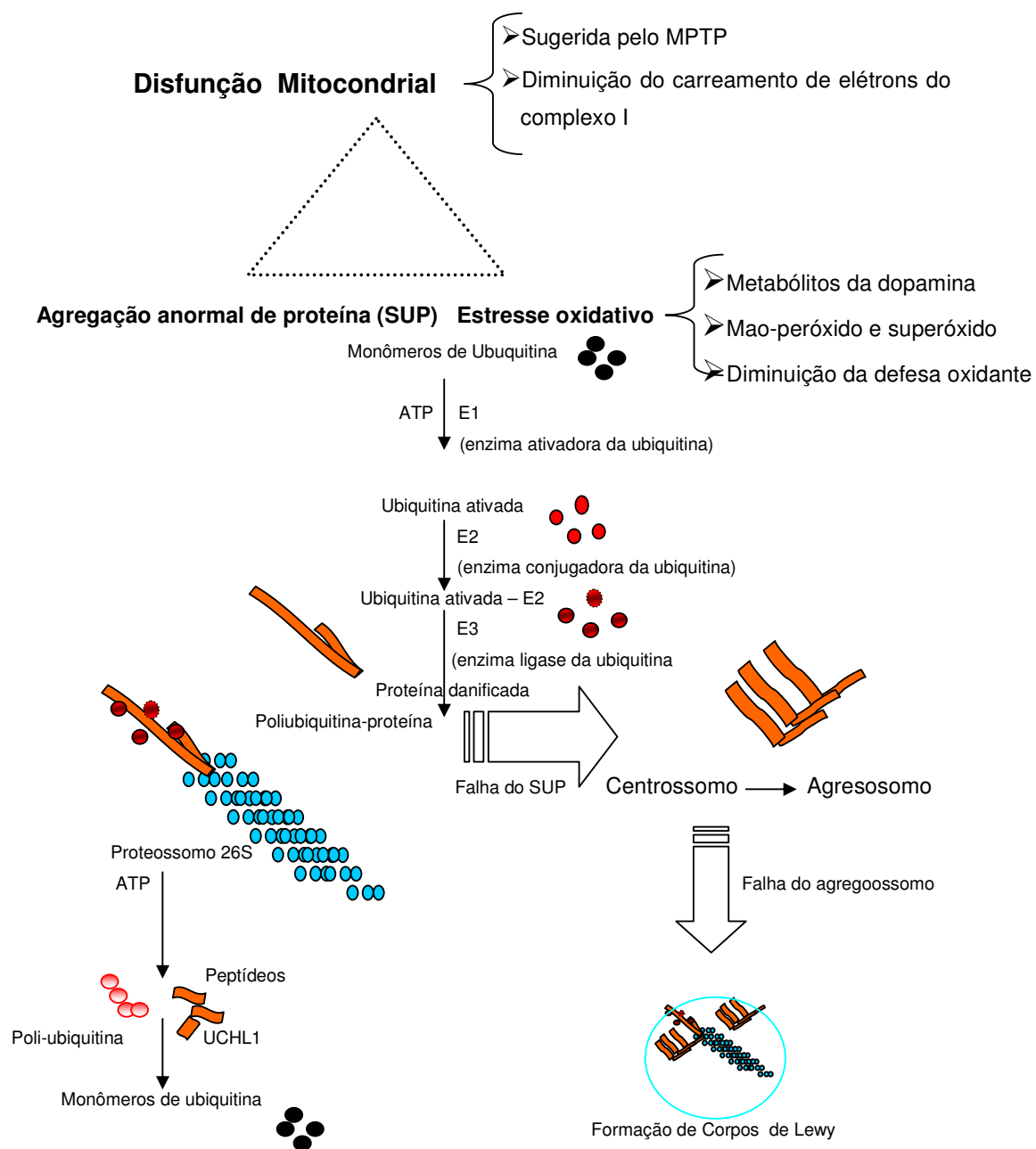


FIGURA 1 - Esquema da patogênese da morte neuronal na DP.

Fonte: Adaptado de Farrer (2006) e Hardy *et al.* (2006).

1.1.2.1 *PARK1*

Em 1996, análises de ligação em uma família ítalo-americana (Contursi) com parkinsonismo autossômico-dominante demonstraram relação com o cromossomo 4. Em 1997, o gene foi identificado: era o codificador da proteína α -sinucleína. A mutação é uma substituição de alanina por treonina no códon 53 (POLYMERPOULUS *et al.*, 1996). Outras mutações descritas em *PARK1* são a A30P em uma família alemã (KRUGER *et al.*, 1998) e a E46K em uma família espanhola (ZARRANZ *et al.*, 2004). Singleton *et al.* (2003) também encontraram DP familiar como resultado de duplicação ou triplicação no gene codificador da α -sinucleína. A idade de início nos pacientes com duplicação ou triplicação parece estar relacionada ao número de cópias do *locus* de *PARK1* (MILLER *et al.*, 2004). Parece também haver relação entre o número de cópias e a gravidade dos sintomas, apesar da ampla variabilidade fenotípica da doença (FUCHS *et al.*, 2007).

Clinicamente, a doença se assemelha aos casos esporádicos, exceto pela idade relativamente precoce (em torno dos 40 anos) e também pela alta frequência de demência, especialmente nos casos com a mutação E46K. A mutação A53T, diferentemente da A30P, é relacionada a parkinsonismo de início precoce. Há poucas famílias descritas com tais mutações

A α -sinucleína é o maior componente das inclusões citoplasmáticas dos corpos de Lewy, o que leva a crer que a disfunção da proteína esteja implicada na patogênese da doença. A α -sinucleína foi descrita como bastante semelhante à proteína 14-3-3, reguladora da enzima tirosina hidroxilase, a qual converte levodopa em dopamina. A α -sinucleína estaria, portanto, relacionada à síntese de dopamina, à disponibilidade intracelular da dopamina e também ao estoque. Suspeita-se também de que ela esteja relacionada à inibição da fosfolipase D2, implicada na reciclagem de dopamina nas vesículas sinápticas, tráfico vesicular e dinâmica do citoesqueleto (FARRER, 2006). Estudos em *Drosophila* mostraram ganho de função tóxica quando a proteína é mutada. A α -sinucleína mutada é resistente à degradação pelo SUP. Com isso, ela se agrega, a si e também a

outras proteínas, causando citotoxicidade. A superexpressão de α -sinucleína leva também ao estresse proteolítico e neurodegeneração (FARRER, 2006).

1.1.2.2 *PARK2*

A primeira forma de parkinsonismo autossômico-recessiva foi reconhecida em famílias japonesas (KITADA *et al.*, 1998). Os autores identificaram o gene *PRKN* codificador da proteína Parkina como causador da doença nessas famílias.

Clinicamente, a doença nesses pacientes assemelha-se muito com formas esporádicas, exceto por início precoce (média de início aos 26 anos) e progressão lenta dos sintomas. Atribui-se às mutações em *PRKN* a causa de 10 a 20% dos eventos de início precoce (KLEIN; SCHLOSSMACHER, 2007).

Em sua maioria, pacientes com mutações em *PRKN* não apresentam corpos de Lewy. Farrer *et al.* (2001) descreveram casos de mutações em heterozigose composta com presença de corpos de Lewy à necropsia.

A Parkina é uma ligase de ubiquitina - E3, especificamente - e liga os monômeros de ubiquitina a proteínas de descarte para posterior degradação pelo SUP. O mecanismo etiopatogênico de Parkina não é ainda estabelecido, embora se entenda que a mutação em Parkina afete sua função de ubiquitinação, levando a célula a não sinalizar proteínas de descarte que seriam processadas pelo SUP, com isso agregando-se e causando morte celular. Um fato intrigante é que mutações heterozigóticas em *PRKN* ocorrem tanto em pacientes com DP quanto em controles em semelhante frequência (LINCOLN *et al.*, 2003), o que leva à hipótese de que outros fatores hereditários ou mesmo ambientais possam ser o gatilho para a evolução rumo à neurodegeneração, causando DP (OLANOW; MCNAUGHT, 2006). De modo igualmente intrigante, há relatos de pacientes com uma única mutação em Parkina apresentando modo de herança autossômico-dominante (PRAMSTALLER *et al.*, 2005). A ocorrência de co-segregação da doença em pacientes com uma única mutação em Parkina sugere que a mutação é no mínimo um fator de risco de desenvolvimento de DP (HARDY *et al.*, 2006).

1.1.2.3 *PARK4*

PARK4 foi inicialmente descrito em uma família americana (*Iowa kindred*) com doença de corpos de Lewy e inclusões de α -sinucleína. O distúrbio era caracterizado por início precoce de parkinsonismo responsivo à levodopa (quarta década), progredindo rapidamente com perda de peso, demência e disautonomia. O transtorno cognitivo iniciava-se com perda subjetiva da memória visuoespacial seguida por perda da função do lobo temporal (GWINN-HARDY *et al.*, 2000).

A partir de estudos de ligação, Farrer *et al.* (1999) sugeriram o *locus* 4p15. Mutações em α -sinucleína foram descartadas por seqüenciamento (GWINN-HARDY *et al.*, 2000). Um estudo amplo do genoma feito nessa família posteriormente por Singleton *et al.* (2003) revelou *lod score* de 3,5 no marcador DS42460 no cromossomo 4q. Na mesma publicação, os autores verificaram que a etiopatogenia da doença estava relacionada à triplicação na região da α -sinucleína. A penetrância foi estimada em 33% em uma das famílias (NISHIOKA *et al.*, 2006).

1.1.2.4 *PARK5*

PARK5 foi descrito em uma única família alemã (dois irmãos) como resultado de uma única mutação no gene *UCH-L1*, codificador de L1 ubiquitina carboxiterminal hidrolase (LEROY *et al.*, 1998). É considerada causa rara de DP e tem padrão de herança autossômico-dominante com média de idade de início aos 50 anos, iniciando com tremor de repouso progredindo para rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Os sintomas eram responsivos à levodopa. Um tio paterno e avó paterna foram afetados, mas não eram vivos por ocasião da descoberta. Os pais não exibiam sinais e sintomas parkinsonianos, o que indicava penetrância incompleta.

UCH-L1 está presente exclusivamente em neurônios (constituindo de 1 a 2% de proteínas no cérebro) e é uma enzima deubiquitinizadora que remove a ubiquitina ligada à proteína previamente à sua entrada no proteossomo. Indivíduos com a

mutação em *UCH-L1* em tese não são capazes de entrar no SUP para posterior degradação.

1.1.2.5 *PARK6*

Várias famílias europeias com DP de início precoce e padrão de herança autossômico-recessivo foram ligadas à região 1p35 e ao gene codificador da proteína PINK1 (VALENTE *et al.*, 2004a). Clinicamente, a idade de início variou entre 18 e 56 anos, a maioria iniciando-se na terceira ou quarta década. Os principais sinais incluíam rigidez e bradicinesia assimétricas, instabilidade postural e boa resposta à levodopa. Outros sinais incluíam tremor de repouso, congelamento motor à marcha, fenômeno *on-off* e discinesia induzida por levodopa. Menos comuns foram a distonia no início do quadro, hiperreflexia, benefício dos sintomas com o sono, sintomas psiquiátricos e disautonomia. A progressão era geralmente lenta e indistinguível da DP idiopática e de *PARK2*.

PINK1 é uma proteína encontrada na mitocôndria. Sua função é desconhecida, embora haja a sugestão de que ela realize a fosforilação de proteínas, além de proteger os neurônios contra disfunção mitocondrial e apoptose induzida por estresse (FARRER, 2006). Especula-se que mutações no gene *PINK1* tornem os neurônios susceptíveis a toxinas que, por sua vez, inibem a função de SUP. Mutações em *PINK1* são menos comuns que mutações em *PRKN*. Há algumas famílias de casos com mutações heterozigóticas em *PINK1*, sugerindo que a perda parcial de função seja um fator de risco para a doença (VALENTE *et al.*, 2004b). A frequência dessas mutações varia de 1 a 8% dos casos de início precoce com história familiar positiva (KLEIN; SCHLOSSMACHER, 2007).

1.1.2.6 *PARK7*

A partir de mapa de homozigose de duas famílias consanguíneas não relacionadas, uma holandesa e outra italiana, foi localizado um gene relacionado à DP de início precoce, o qual codifica a proteína DJ1 (BONIFATI *et al.*, 2003). O

gene está associado à PIP e é responsável por menos de 1% dos casos de início precoce (LOCKHART *et al.*, 2004). Clinicamente, a doença inicia-se antes dos 40 anos de idade, com tremor de repouso, postural e bradicineisa assimétricos, além de instabilidade postural. A progressão é geralmente lenta, com boa resposta à levodopa. Ocasionalmente, há envolvimento psiquiátrico e não há sinais de acometimento neurológico de outros sistemas ou sinais atípicos. A proteína DJ1 está presente no núcleo e no citoplasma de astrócitos e sugere-se que ela seja sinalizadora do estresse oxidativo ou mesmo um antioxidante. A proteína mutada induz agregação de α -sinucleína, limitando o clareamento de proteínas.

Foram recentemente descritos por Tang *et al.* (2006) dois pacientes de uma família chinesa com herança digênica; os pacientes eram portadores de mutações heterozigóticas em *PINK1* e *DJ1*. Nesse estudo também foi preconizada a associação física entre as duas proteínas, além de atividade sinérgica na antagonização do estresse oxidativo.

Especula-se que as proteínas DJ1, Parkina e PINK1 tenham ação sinérgica e sua mais importante ação no sistema nervoso central seja a proteção de neurônios dopaminérgicos contra o estresse oxidativo. Essa seria uma explicação para o fenótipo intercambiável dos pacientes portadores de tais mutações (KLEIN; SCHLOSSMACHER, 2007).

1.1.2.7 *PARK8*

Uma forma de parkinsonismo autossômico-dominante foi relacionada à região 12p11.2-q13.1. O gene foi identificado (*LRRK2*) e codifica a quinase rica em leucina, LRRK2 (PAISAN-RUIZ *et al.*, 2004). A mutação mais freqüente é a G2019S, ocorrendo 2 a 6% em casos familiares e 1 a 2% em casos esporádicos na Europa (BRICE, 2005). Há alta prevalência dessa mutação na população do norte da África: 37% nos pacientes com história familiar e 41% em pacientes esporádicos (LESAGE *et al.*, 2006); e em judeus asquenazins: 29,7% em pacientes com história familiar, 18,3% em pacientes esporádicos e 1,3% em controles saudáveis (OZELIUS *et al.*, 2006). Segundo Di Fonzo *et al.* (2005), há

penetrância incompleta da mutação idade dependente (aumento da penetrância do gene com o avançar da idade). Os autores relatam indivíduos assintomáticos carreadores da mutação. A estimativa é de que a penetrância de mutações no gene *LRRK2* seja de 17% aos 50 anos, chegando a 85% aos 70 anos (KACHERGUS *et al.*, 2005). Ozelius *et al.* (2006) estimaram a penetrância em judeus asquenazins, durante todo o período de vida do indivíduo carreador da mutação, entre 31,8 e 35,2%. Kay *et al.* (2005) reportam um indivíduo de 89 anos, carreador da mutação G2019S, sem sinais ou sintomas da doença. Para Hardy *et al.* (2006), esse fato não enfraquece a hipótese da patogenicidade de G2019S, mas pode explicar os casos “esporádicos” da doença.

A idade de início dos sintomas dos pacientes varia entre 35 e 78 anos. Frequentemente, mas não exclusivamente, *LRRK2* está associado a início tardio da doença (GOLDWURM *et al.*, 2005). Portadores homocigotos parecem não diferir em fenótipo dos heterocigotos, dado que enfraquece a hipótese de efeito de dose (ISHIHARA *et al.*, 2006). Clinicamente, os pacientes apresentam parkinsonismo de início assimétrico com tremor de repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez, com início entre 50 e 60 anos, progressão lenta e boa resposta com baixas doses de levodopa. A maioria dos pacientes não apresenta declínio cognitivo mesmo após muitos anos de doença. Os achados anatomopatológicos incluem: perda neuronal nigroestriatal, corpos de Lewy em neurônios nigrais e corticais e inclusões citoplasmáticas contendo tau. Em alguns casos os corpos de Lewy não são encontrados.

A teoria da patogenicidade de *LRRK2* mutada é a de que ocorre ganho de função tóxica com aumento da atividade de fosforilação de proteínas, já que algumas proteínas requerem fosforilação como pré-requisito para a ubiquitinação e processamento pelo SUP. A fosforilação anômala parece desviar a reação em direção à via de formação de α -sinucleína, levando à doença de corpos de Lewy e em alguns casos à patologia tau. Sabe-se que os corpos de Lewy podem ser encontrados em indivíduos idosos sem sinal ou sintoma parkinsoniano (PARKKINEN *et al.*, 2005). Em contrapartida, alguns pacientes com DP portadores de mutações em *LRRK2* e *PRKN*, podem apresentar a doença sem corpos de Lewy (FARRER *et al.*, 2001; PRAMSTALLER *et al.*, 2005). Acredita-se

que os corpos de Lewy sejam apenas uma das respostas às injúrias e processos relativos ao envelhecimento (KLEIN; CHLOSSMACHER, 2007).

1.1.2.8 *PARK9*

Ramirez *et al.* (2006) descreveram o gene *ATP13A2* como o agente causador da síndrome de Kufor-Rakeb. Tal síndrome foi inicialmente descrita por Najim Al-Din *et al.* (1994). Nesse estudo, os autores encontraram a doença em cinco de nove filhos provenientes de um casamento consanguíneo na propriedade rural de Kufor-Rakeb, na Jordânia. Caracteristicamente, os sinais e sintomas da doença tiveram início em torno dos 12 a 16 anos, com parkinsonismo responsivo à levodopa, espasticidade, paralisia supranuclear e demência. Uma outra família foi referida no Chile (RAMIREZ *et al.*, 2006) e recentemente Di Fonzo *et al.* (2007) destacaram um paciente brasileiro com mutação homozigótica inédita no gene *ATP13A2*. O fenótipo bastante distinto colocou em dúvida a designação de *PARK* para essa doença. Dois pontos corroboram a designação *PARK* (LEES; SINGLETON, 2007): a) outros *PARKs* dividem o mesmo *loci*, 1p36 (*PARK6* e *PARK7*); b) há nessa doença uma resposta notável à levodopa, o que fortalece a hipótese de degeneração nigroestriatal.

ATP13A2 codifica a ATPase tipo 5 lisossomal. Pensa-se que o sistema lisossomal possa estar ligado à renovação de α -sinucleína, além do que mutações no gene codificador da β -glucocerebrosidase, a qual causa doença lisossomal de depósito (doença de Gaucher), têm sido apontadas como fator de risco para DP (AHARON-PERETZ; ROSENBAUM; GERSHONI-BARUCH, 2004).

1.1.2.9 Papel das mutações heterozigóticas simples em genes recessivos

Há muitas controvérsias no que se refere ao papel de mutações heterozigóticas na gênese da DP. Dois estudos (KAY *et al.*, 2007; LINCOLN *et al.*, 2003) referenciaram que mutações heterozigóticas são comuns em portadores de DP e controles. Tal dado não foi confirmado no estudo de Clark *et al.* (2006a). Algumas

alterações parkinsonianas sutis, mas inequívocas, podem ser observadas em indivíduos “assintomáticos”, como mencionado por Hedrich *et al.* (2006), Hiller *et al.* (2007) e Pramstaller *et al.* (2005). Um outro argumento é o de que indivíduos assintomáticos não atingiram ainda a idade de início dos sintomas, uma vez que não foram seguidos ao longo dos anos. Avaliações com tomografia por emissão de pósitrons em portadores heterozigotos simples em Parkina (HILKER *et al.*, 2001) e PINK1 (KHAN *et al.*, 2002) enfatizaram redução na captação de Fdopa no *striatum* de portadores quando comparados com controles. A haploinsuficiência com a inativação do alelo normal levando à perda da heterozigose e a efeito dominante negativo pode ser também uma explicação alternativa para a doença no paciente com uma única mutação nos alelos recessivos (KHAN *et al.*, 2002). Há considerável porcentagem de mutações heterozigóticas em genes recessivos. Sugere-se que estas sejam fatores de risco para parkinsonismo (AHARON-PERETZ; ROSENBAUM; GERSHONI-BARUCH, 2004; SIDRANSKY, 2006).

QUADRO 1
Causas de parkinsonismo familiar

LOCUS	OMIM*	CROMOSOMO	GENE-PROTEÍNA	FUNÇÃO	PA-DRÃO	IDADE DE INÍCIO	REGIAO	DOENÇA
<i>PARK1</i>	168601	4q21	<i>SNCA</i> - α -sinucleína	? tráfico vesicular (neurotransmissão e plasticidade)	AD	Tardio (30-60) Média- 55 anos	Grécia e Itália EUA	Corpos de Lewy com perda neuronal nigro-hipocampal. Acúmulo de α -sinucleína e tau no estriado e no córtex. Pacientes com triplicação apresentam vacuolização no córtex e inclusões citoplasmáticas gliais.
<i>PARK2</i>	600116	6q25.2-q27	<i>PRKN</i> - Parkina	E3 ligase	AR**	Precoce (7-58) Média- 26 anos	Japão	Ausência de corpos de Lewy. Heterozigotos compostos podem ter corpos de Lewy e proteína tau. Perda nigral.
<i>PARK3</i>	602404	2p 13	desconhecido	Desconhecida	AD	Tardio	Alemanha	---
<i>PARK5</i>	191342	4p14	<i>UCH-L1</i> - UCH-L1	Produção de monômeros de ubiquitina	AD	Tardio (49-51)	Alemanha	? UCH1 é proteína proeminente em Lewy-degradação do proteossomo.
<i>PARK6</i>	605909	1p36-36	<i>PINK1</i> -Pink1	Kinase mitochondrial.	AR	Precoce (32-48)	Europa	Desconhecida
<i>PARK7</i>	606324	1p36	<i>DJ1</i> -DJ1	Sinalização de estresse oxidativo	AR	Precoce (20-40) Média- 35 anos	Holanda	Desconhecida
<i>PARK8</i>	607060	12p12	<i>LRRK2</i> -LRRK2	Kinase citossólica	AD	Tardio (35-79 anos) Média- 57 anos	Japão e país basco	Corpos de Lewy, raramente emaranhados neurofibrilares, tau e perda nigral
<i>PAR9</i>	606693	1p36	<i>ATP13A2</i> -ATPase tipo 5 lisossomal	Desconhecida	AR	Juvenil	Jordânia	Desconhecida
<i>PARK10</i>	606852	1p	Desconhecida	Desconhecida	AD?		Islândia	Desconhecida
<i>PARK11</i>	607688	2q	Desconhecida	Desconhecida	AD?			Desconhecida
<i>PARK12</i>	300557	Xq21-q25	Desconhecida	Desconhecida	LX**			Desconhecida
<i>PARK13</i>	610297	2p12	<i>HTRA2</i>	Desconhecida	AD			Desconhecida

OMIM* - herança mendeliana no homem *on line*
AD* - autossômico-recessiva

AR** - autossômico-dominante
LX*** - ligada ao X

1.2 Distonia

Em 1911, Oppenheim descreveu um distúrbio do movimento denominado por ele de *dystonia musculorum deformans*. Anteriormente, Gowers, em 1888, havia cunhado o termo *coréia tetanóide* para descrever um movimento anormal em dois irmãos que posteriormente foram diagnosticados como portadores da doença de Wilson. Distonia refere-se ao movimento anormal caracterizado por contração muscular padronizada, direcional e freqüentemente sustentada, levando a posturas anormais ou movimentos de torção (FAHN; BRESSMAN; MARSDEN, 1998).

Distonia é a terceira causa mais comum de movimento anormal após tremor e parkinsonismo, atingindo prevalência de dois a 50 casos por milhão (início precoce, menores de 20 anos) e 30 a 7.320 casos por milhão em início tardio, maiores de 20 anos (DEFAZIO *et al.*, 2004).

Quanto à classificação etiológica, a distonia pode ser: a) primária, quando nenhuma anormalidade, exceto a distonia, está presente e não há anormalidade estrutural cerebral ou erros inatos do metabolismo detectáveis; ou b) secundária, quando a distonia segue uma alteração neurológica hereditária ou insulto exógeno e geralmente está associada a outras anormalidades, como parkinsonismo, demência, sinais piramidais ou cerebelares (GEYER; BRESMANN, 2006). Uma subcategoria de distonia secundária é a distonia-*plus*, que é hereditária e acompanhada de outros sinais além da distonia, mas não há degeneração cerebral. Outra subcategoria das distonias secundárias é a heredodegenerativa. Nesta, há evidência histopatológica de degeneração cerebral. É comumente recessiva, resultado de erros inatos do metabolismo. Há também as autossômico-dominantes, as ligadas ao X e as de herança mitocondrial, conforme o QUADRO 2.

QUADRO 2
Classificação etiológica das distonias

Primária	
Esporádica	
Hereditária <i>DYT 1, 2, 4, 6, 7, 13</i>	
Secundária	
Associada à doença neurológica hereditária	
Distonia <i>plus</i>	
Esporádica - <i>DP, PSP*</i> , <i>AMS**</i> , <i>DCBG***</i>	
Hereditária - <i>DYT 5, 11, 12, 14, 15</i>	
Doença degenerativa	
Ligada ao X- <i>DYT3, Lesch Nyhan</i> , distonia-surdez, distonia-cegueira-surdez e retardo	
<i>AD*</i> - Doença de <i>Huntington, SCA 1-8</i> , paraparesia espástica, <i>DRLPA****</i>	
<i>AR**</i> - Doença de <i>Wilson, Hallervorden Spatz</i> , acantocitose, ataxia-telangiectasia	
Associada a defeitos do metabolismo - acidúria glutárica, homocistinúria, tirosinose	
- leucodistrofia, Nieman Pick, gangliosidose	
- bipterina, lipofuccinose ceróide	
Herança mitocondrial - Doença de <i>Leber, Doença de Leigh</i>	
Herança incerta - Neuroacantocitose, síndrome de <i>Rett</i> , doença de inclusão neuronal	
Sintoma de um agente exógeno ou ambiental - neurolépticos, anticonvulsivantes, ergot, levodopa, agonistas dopaminérgicos, bloqueadores de canal de cálcio, Mn, CO, metanol	
Relacionada a uma causa conhecida - síndrome paraneoplásica, deficiência de vitamina E, hipoparatiroidismo, encefalite, vasculites, esclerose múltipla, tumor, isquemia cerebral, sangramento, malformação vascular, trauma craniano, lesão de nervo periférico	
Relacionada a outro movimento anormal – Tique distônico	
- Distonia paroxística (<i>DYT 8, 9, 10</i>)	
Pseudodistonia - siringomielia, síndrome de <i>Arnold-Chiari</i> , torcicolo vestibular, síndromes de <i>Isaacs</i> , pessoa rígida e <i>Sandifer</i> , contratura de <i>Dupuytren</i> , subluxação atlantoaxial	
Psicogênia	
* paralisia supranuclear progressiva	*** degeneração córtico-basal gangliônica
** atrofia de múltiplos sistemas	+ autossômico-dominante
**** atrofia dentado-pálido-luisiana	
++ autossômico-recessiva	+++ ataxia espino-cerebelar

Até a presente data, 15 *loci* foram associados à doença (*DYT1-DYT15*). Em seis desses o gene responsável foi identificado e estão descritos a seguir em detalhe: *DYT1* (OZELIUS *et al.*, 1997); *DYT3* (NOLTE; NIEMANN; MULLER, 2003); *DYT5* (ICHINOSE *et al.*, 1994); *DYT8* (RAINER *et al.*, 2004); *DYT11* (ZIMPRICH *et al.*, 2001) e *DYT12* (DE CARVALHO AGUIAR *et al.*, 2004).

1.2.1 *DYT1*

Distonia de torção de Oppenheim, distonia primária ou idiopática de torção, distonia *musculorum deformans* 1 constituem as variadas denominações para a *DYT1*. Tipicamente, a doença se manifesta por volta dos 12 anos (variando dos quatro aos 44 anos) em um único membro (perna ou braço), progredindo para os demais membros e tronco em aproximadamente cinco anos. A prevalência é variada nas diversas etnias, com preponderância nos judeus asquenazins, provavelmente devido a um efeito fundador nessa população. O modo de herança é o autossômico-dominante, com penetrância em torno de 30 a 40%. O *locus* e o gene responsável foram identificados por Ozelius *et al.* (1997). Trata-se de gene codificador da proteína TorsinaA, que contém um domínio ligado ao ATP com conservação entre as espécies. Há homologia com rato, camundongo e o nematodo *C.elegans*, sugerindo ser uma protease induzida por choque térmico (*heat-shock*). A mutação comum é a perda da seqüência GAG, gerando a perda de dois ácidos glutâmicos, próxima da porção C terminal da proteína, flanqueando resíduos de cisteína.

As proteínas induzidas por choque térmico parecem ter função de chaperona ou função proteolítica, conferindo tolerância térmica, dinâmica do citoesqueleto, dobramento e degradação de proteínas, localização correta e regulação da sinalização protéica. A proteína parece interagir com o transportador de dopamina e tráfico intracelular (OZELIUS *et al.*, 1997). A TorsinaA localiza-se no lúmen do retículo endoplasmático em contigüidade com a membrana nuclear; e a perda da proteína pode levar à ruptura da membrana nuclear neuronal (GOODCHILD; KIM; DAUER, 2005).

Estudos anatomopatológicos em quatro pacientes portadores de deleção GAG em *DYT1* mostraram a formação de inclusões nucleares em neurônios colinérgicos e não-colinérgicos da formação reticular do mesencéfalo, núcleos pedúnculo-pontino e cuneiforme. As inclusões foram positivas para ubiquitina, TorsinA e laminina A-C, uma proteína da membrana nuclear. Alguns agregados tau-ubiquitina foram encontrados em neurônios pigmentados da substância negra compacta e *locus coeruleus*. Esses achados sugerem que uma alteração na membrana nuclear de regiões reguladoras do tônus muscular pode estar relacionada à fisiopatologia das distonias (MCNAUGHT *et al.*, 2004).

DYT1 é a distonia primária mais comum. Aproximadamente 75% dos casos de distonia primária de início precoce contêm a deleção GAG heterozigótica em um dos alelos (BRESSMAN *et al.*, 2000). A deleção GAG é a mutação mais comum, mas existem outras duas mutações descritas: uma deleção de 18 bp no éxon 5, removendo seis aminoácidos na porção carboxiterminal, incluindo o sítio de fosforilação de TorsinA (LEUNG *et al.*, 2001) e também uma deleção de 4 bp no éxon 5 (KABAKCI *et al.*, 2004) em um doador de sangue aparentemente normal.

1.2.2 *DYT3*

É também conhecida como distonia ligada ao X ou *lubag*. A doença tem caráter homogêneo e foi introduzida por um efeito fundador na população filipina. No dialeto local, *lugbag* significa torcido. Em 1976, Lee *et al.* identificaram 28 casos pertencentes a 25 famílias provenientes da ilha de Panay. Todos os pacientes eram homens e a análise dos heredogramas revelou tratar-se de herança ligada ao cromossomo X. A média de idade de início foi de 31 anos, alguns casos (quatro) iniciaram-se com blefaroespasma.

Kupke *et al.* (1990) realizaram amplo estudo na ilha de Panay com 36 pacientes de 21 famílias. A média de idade de início foi de 37,9 anos, variando de 12 a 52 anos. Os sintomas foram de início focal, com posterior evolução para distonia segmentar ou generalizada (em 78% dos casos, com média de duração de 6,8

anos após o primeiro sintoma). Frequentemente, sintomas parkinsonianos podem preceder ou acompanhar os sintomas distônicos.

A avaliação anatomopatológica de Waters *et al.* (1993) em um paciente com distonia de *lubag* evidenciou perda neuronal e padrão de astrocitose do tipo mosaico restrito ao caudado e ao putâmen lateral.

Exame *post-mortem* dos gânglios da base de sete pacientes com distonia de *lubag* foi feito por Goto *et al.* (2005). Um ensaio imuno-histoquímico com marcador neuroquímico e de matriz (calcinerina e calbidina) destacou que cinco pacientes com predominância clínica de distonia tinham áreas irregulares de neurônios preservados no *striatum* e preservação do compartimento da matriz, ao passo que os dois parkinsonianos tinham grave depleção neuronal assim como da matriz. Foi então postulado que em estágios iniciais dessa distonia ocorre perda de projeções gabaérgicas no *striatum*, levando à desinibição dos neurônios dopaminérgicos, resultando em transtorno hiperkinético. Em um estágio posterior, há envolvimento da matriz, levando à redução das projeções a ela relacionadas, gerando forma extranigral de parkinsonismo.

Kupke, Lee e Muller (1990a) mapearam o gene da distonia ligada ao X, à região X21.3. Graeber, Kupke e Muller (1992) restringiram a região ao Xq13. Makino *et al.* (2007) seqüenciaram a região crítica do *locus* Xq13.1 e posteriormente fizeram a análise de expressão do tecido cerebral de pacientes com distonia de *lubag*. Eles encontraram a inserção de um retrotransposon na porção intrônica do gene *TAF1* (íntron 32), codificador do maior componente do complexo do fator de transcrição IID. Estudos em tecido cerebral *post-mortem* mostraram decréscimo dos níveis de expressão de *TAF1* e do receptor do gene de dopamina no caudado dos pacientes. Eles também identificaram padrão anormal de metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA) no retrotransposon no genoma do caudado, o que poderia justificar decréscimo na expressão de *TAF1* nesses pacientes.

1.2.3 *DYT5*

Essa doença é também chamada de distonia responsiva à dopa ou doença de Segawa. Em 1976, Segawa *et al.* descobriram nova forma distinta de outras distonias e parkinsonismo anteriormente descritos. Caracteristicamente, o distúrbio se apresenta na infância, com distonia focal em um membro (comumente o membro inferior), evoluindo para envolvimento de outros membros. Há flutuação diurna, isto é, sintomatologia leve pela manhã, com piora no decorrer do dia, além de dramática resposta à levodopa em baixas doses. Sintomas parkinsonianos podem estar presentes. O modo de dominância é autossômico-dominante, com penetrância de aproximadamente 35% (NYGAARD *et al.*, 1990).

A distonia dopa-responsiva é causada por mutações no gene trifosfato de guanina - ciclo hidroxilase 1 - *GCH1* (ICHINOSE *et al.*, 1994) situado no *locus* 14q22.1-22.2. O gene codifica a proteína trifosfato de guanina (GTP) ciclo-hidrolase I, a enzima envolvida na síntese de tetra-hidrobiopterina; um co-fator para a ação da tirosina hidroxilase e síntese de dopamina. A diminuição de dopamina secundária à redução da enzima produz uma miríade fenotípica, incluindo distonia, parapareseia espástica e movimentos anormais mimetizando paralisia cerebral (BANDMANN *et al.*, 1996a).

1.2.4 *DYT8*

Demirkiran e Jankovic (1995) estudaram 46 pacientes com discinesias paroxísticas e introduziram uma classificação para elas baseada principalmente nos fatores precipitantes: cinesiogênica induzida por movimento; não-cinesiogênica induzida por esforço; e hipnogênica induzida pelo sono. Cada categoria foi subdividida em idiopática (esporádica e familiar) e secundária (geralmente um transtorno estrutural subjacente).

DYT8 pode também ser chamada de córeo-atetose não-cinesiogênica ou discinesia paroxística não-cinesiogênica. Richards e Barnet (1968) sugeriram o epônimo *Mount-Reback*, assim como córeo-atetose distônica paroxística, a fim de

distingui-la da córeo-atetose cinesiológica paroxística (discinesia episódica cinesiológica ou DYT10) – (MOUNT; REBACK, 1940).

A discinesia paroxística não-cinesiológica foi detectada inicialmente por Mount e Reback, em 1940, os quais acompanharam uma família de cinco gerações com vários membros afetados por córeo-atetose paroxística diferente da observada na doença de Huntington. Clinicamente, os ataques duravam apenas alguns minutos, ocorrendo várias vezes ao dia, sem alteração de consciência. Alguns fatores foram indicados como precipitantes, como álcool, cafeína, chocolate, tabaco, fadiga e raiva. O movimento anormal pode ser reconhecido desde o nascimento, outrossim, inicia-se na adolescência e juventude, normalmente precedido por aura.

Fouad *et al.* (1996) fizeram uma análise de ligação em uma família com transmissão autossômico-dominante que segregava um gene alelo para uma discinesia não-cinesiológica com fenótipo de doença de *Mount-Reback*. A doença foi mapeada no cromossomo 2, *locus* 2q31-36.

Rainier *et al.* (2004) identificaram o gene responsável como o gene regulador da miofibrillogênese 1. A isoforma *MR-1L* é expressa especificamente no cérebro e é localizada na membrana celular. Análise bioinformática (LEE *et al.*, 2004) mostrou homologia com o gene codificador da hidrolase hidroxiacilglutamiônica (*HAGH*). A *HAGH* está incluída na metabolização final do metilgloxal (em ácido láctico e glutamato reduzido), um componente presente no café, bebidas alcoólicas e produto de estresse oxidativo. O estudo sugere que as vias de resposta ao estresse podem ser a chave para a elucidação de transtornos episódicos.

Acompanhando famílias de pacientes com discinesia não-cinesiológica paroxística, portadores e não-portadores de mutações no gene *MR1*, Bruno *et al.* (2007) estimaram a penetrância do gene em 98%. Pacientes com a mutação no gene *MR1* têm fenótipo homogêneo, com início precoce (de três meses a 12 anos) e com ataques consistindo em coréia e distonia em membros, tronco e face, durando de 10 a 60 minutos, geralmente uma vez por semana. Em 41% dos indivíduos desse grupo foi verificada sensação premonitória (aura), geralmente

parestesia ou rigidez em membro, embora uma sensação inespecífica assemelhando-se à ansiedade tenha sido também descrita. Os ataques, em sua maioria, foram precipitados por café, álcool e estresse e houve boa resposta a benzodiazepínicos. Do total, 70% tiveram o benefício do sono. Os critérios sugeridos pelos autores baseiam-se na idade de início dos sintomas, que são mais precoces nos casos positivos ($4 \pm 4,6$ anos), e a precipitação com álcool e cafeína, já que em 100% dos casos estes foram importantes precipitadores de crises, além de também boa resposta a benzodiazepínicos.

1.2.5 *DYT11*

A *DYT11*, também chamada de distonia mioclônica, mioclonia-distonia ou distonia responsiva ao álcool, tem como principal achado a mioclonia, embora a distonia possa estar presente. A primeira descrição da doença se deu em 1967, por Mahloudji e Pikieln.

A média de idade do início da mioclonia varia entre dois e três anos e da distonia entre seis e 18 meses, segundo Kyllerman *et al.* (1990). Nygaard *et al.* (1999) avaliaram uma numerosa família americana com mioclonia altamente responsiva ao álcool. A média de início dos sintomas foi de 6,5 anos (de quatro a 15 anos). Quase todos os indivíduos relataram problemas psiquiátricos, incluindo depressão, ansiedade e transtorno obsessivo compulsivo. O mesmo estudo mapeou o *locus* da distonia a 28 centi-Morgan (cM) da região 7q21-q31.

Usando clonagem posicional, Zimprich *et al.* (2001) identificaram o gene relacionado à doença: tratava-se do epsilon-sarcoglicano (*SGCE*). A análise do *pedigree* revelou diferença importante na penetrância, a depender da origem parental do alelo mutado (indivíduos afetados geralmente herdaram o alelo mutado do pai), sugerindo um mecanismo de *imprinting* materno. De 69 pacientes afetados, 49 herdaram o alelo mutado do pai, quatro da mãe e, nos nove restantes, a origem parental do alelo não pôde ser identificada. Origem materna foi identificada em 14 de 18 indivíduos assintomáticos e portadores do alelo mutado. Asmus *et al.* (2002) relataram 24 pacientes de nove famílias, portadores de mutações no gene *SGCE*. A apresentação clínica era homogênea, com

mioclonia afetando principalmente o pescoço, membros superiores e tronco, com média de idade de 5,4 anos (de 0,5 a 20 anos). A distonia apresentava-se geralmente com distribuição focal (cervical e câimbra do escrivão), com idade de início entre um e 38 anos (média de 8,8 anos) freqüentemente em paralelo com piora das mioclonias. Na maioria dos casos (21), houve melhora importante com álcool. Alguns pacientes tiveram história de depressão e ataques de pânico com agorafobia. As análises dos *pedigrees* confirmaram o *imprinting* genômico. A função das subunidades α , β , γ , δ sarcoglicanas é a síntese de componente transmembrana do complexo distrofina-glicoproteína, o qual liga o citoesqueleto à matriz extracelular. A função de ϵ -sarcoglicana no cérebro é ainda desconhecida.

1.2.6 DYT12

A primeira descrição da distonia-parkinsonismo de início abrupto (DPIA) foi feita por Dobyms *et al.* (1993). Os autores encontraram numerosa família americana com uma nova forma de distonia e parkinsonismo, caracterizada por aparecimento agudo dos sintomas. Os indivíduos afetados iniciaram a doença por volta dos 14 a 15 anos de idade, com a progressão dos sintomas variando de horas a semanas. Após o início, a evolução é geralmente lenta. O modo de herança é autossômico-dominante, com importante variabilidade fenotípica e penetrância incompleta.

Kramer *et al.* (1999) estudaram 81 membros de duas famílias americanas com DPIA, 16 deles com sinais clássicos da doença. Encontraram evidência de ligação ao *locus* 19q13 definindo a região candidata em 8cM.

De Carvalho Aguiar *et al.* (2004) identificaram o gene causador da doença analisando indivíduos de sete famílias não correlatas. Trata-se do gene *ATP1A3*, codificador da subunidade $\alpha 3$ da bomba de Na^+/K^+ -ATPase. Estudos funcionais e da estrutura da proteína mostraram que os mutantes alteram a atividade e a estabilidade da enzima. Esses achados ressaltam a importância da bomba de sódio e potássio, a responsável pelo gradiente eletroquímico através da membrana celular, na distonia e no parkinsonismo.

Pacientes com DPIA portadores e não-portadores de mutações no gene e negativos para mutação no gene *ATP1A3* foram estudados por Brashear *et al.* (2007). O fenótipo dos indivíduos carreadores de mutações incluiu o início abrupto dos sintomas, distonia com sinais parkinsonianos, gradiente rostro-caudal e sinais bulbares proeminentes. Fatores estressores foram encontrados como precipitantes dos sintomas em alguns casos. Geralmente, o tremor nesses pacientes é mínimo ou ausente, a resposta a agentes dopaminérgicos é pobre e a estabilização do quadro se dá em um mês, podendo haver melhora com a evolução do quadro. Tremor no início dos sintomas, gradiente rostro caudal invertido e dor em membro excluem o diagnóstico de DPIA.

1.2.7 PANK2

A doença conhecida atualmente como neurodegeneração com acúmulo intracerebral de ferro é uma distonia *plus* de início precoce, descrita inicialmente por Hallervorden e Spatz em 1922. Os sintomas iniciais são distonia e rigidez progressivas iniciadas em membros inferiores e progredindo para membros superiores, além de bradicinesia, distonia generalizada com envolvimento oromandibular, demência, degeneração retiniana e epilepsia. Geralmente, os indivíduos com a doença evoluem para óbito aos 30 anos. A imagem à ressonância magnética mostra diminuição da intensidade do sinal em T2 nos pálidos, compatível com depósito de ferro, com pequena área de hiperintensidade interna. Esse sinal é característico da doença e é chamado de sinal do olho de tigre. Na forma clássica, os pacientes apresentam-se com sintomas na primeira década de vida, com progressão rápida e perda da deambulação em 15 anos. Na forma atípica, os sintomas iniciam-se na segunda década, com progressão lenta e manutenção da deambulação dentro dos 15 anos subsequentes (HAYFLICK *et al.*, 2003).

Zhou *et al.* (2001) identificaram em membros de uma família *amish*, o gene causador da doença, na região codificadora de *PANK2*.

1.3 Considerações finais

Aproximadamente 70% dos pacientes com distonia têm a forma idiopática ou primária. Em relação à distonia focal, acredita-se que aproximadamente 25% tenham base hereditária. Quanto à distonia generalizada, multifocal ou segmentar, 85% dos casos parecem ter base hereditária (FLETCHER; HARDING; MARSDEN, 1990). Até então foram descritas 15 regiões genômicas e identificados seis genes relacionados à distonia. Em casos de distonia dopa-responsiva, 40 a 80% dos pacientes são positivos para mutações em *GCH1*. Em casos de distonia generalizada idiopática de início precoce, 2,8 a 15% dos indivíduos são positivos para mutações em *DYT1*. Os outros genes descobertos correspondem a formas mais raras de distonia e clinicamente distintas. Mais estudos são necessários a fim de se identificar se fatores não-genéticos (ambientais) ou genéticos (outros genes) são importantes na etiopatogenia da doença nos casos negativos para mutações nos genes conhecidos.

O QUADRO 3 reúne os principais dados das *DYT*s supracitadas e das demais *DYT*s cujo gene não foi ainda identificado.

QUADRO 3
Causas de distonia familiar

<i>Locus</i>	<i>Omim*</i>	<i>Cromossoma</i>	<i>Gene-proteína</i>	<i>Função</i>	<i>Pa- drão</i>	<i>Idade início</i>	<i>Penetrância</i>	<i>Tipo</i>	<i>Clínica</i>
<i>DYT1</i>	128100	9q34	<i>TOR1A</i> - TorsinA	? chaperona do retículo endoplasmático/ envolvimento estrutural da membrana nuclear	AD	Antes dos 26 anos	30-40%	Primária	Geralmente inicia como distonia focal de ação principalmente nos pés e posteriormente generaliza-se.
<i>DYT2</i>	224500	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecida	AR**	Infância	Desconhecida	Primária	Distonia generalizada ou segmentar
<i>DYT3</i>	314250	Xq13	<i>TAF1</i> , Fator de transcrição IID	Regulação da expressão de receptores D2 de dopamina	LX***	12-52 (média 37,9)	100% até a quinta década	Heredo-degenerativa	Distonia focal seguida por sequitar ou generalizada, parkinsonismo desenvolve-se em 50% dos casos. Comum em Panay (Filipinas).
<i>DYT4</i>	128101	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecida	AD	13-77	40% acima de 40 anos	Primária	Uma família australiana. Distonia laríngea, cervical e freqüentemente generalizada. Sintomas psiquiátricos presentes.
<i>DYT5</i>	128230	14q22.1-q22.2 11p15.5	<i>GCH1</i> - GTP ciclo-hidroxilase I <i>TH</i> - Tirosina hidroxilase	Síntese de bipterina (co-fator para síntese de tirosina hidroxilase e dopamina)	AD AR	Infância	30%	<i>Plus</i>	Distonia focal com posterior generalização, parkinsonismo muitas vezes presente. Flutuação diurna e resposta exuberante à levodopa e, por isso, cunhada de distonia responsiva à dopa.
<i>DYT6</i>	602629	8p2s1-q22	Desconhecido	Síntese de dopamina Desconhecida	AD	Média - 19 anos	30%	Primária	Focal ou segmentar. Pode generalizar-se. Relatadas em famílias Amish.
<i>DYT7</i>	602124	18p	Desconhecido	Desconhecida	AD	28 a 70 anos	Incompleta	Primária	Distonia focal. Relatada em famílias alemãs.

DYT8	118800	2q35	<i>MR1</i> -regulador da miofibrillogênese 1	Desconhecida? relação com canal iônico ?	AD	Infância e adulto jovem	90%	Paroxística	Episódios de distonia e coréia de duração de minutos a horas precipitadas por estresse, álcool, e cafeína.
DYT9	601042	1p	Desconhecido	Desconhecida	AD	Infância (2 a 15 anos)	Desconhecida	Paroxística	Paraparesia espástica crônica com episódios de distonia, córeoatetose, parestesia e diplopia precipitado por estresse, exercício e álcool.
DYT10	128200	16p11.2-q12.1	Desconhecido	Desconhecida	AD	Infância (6 a 16 anos)	Incompleta	Paroxística	Episódios de distonia e córeoatetose precipitados por exercício, estresse e movimentos bruscos.
DYT11	159900	7q21	<i>SGCE</i> - ϵ Sarcoglican	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - Síntese de componente transmembrana do complexo dystrofina-glicoproteína o qual liga o citoesqueleto à matriz extracelular. ϵ função no cérebro?	AD	Infância e adolescência	Incompleta (<i>imprinting</i> materno)	<i>Plus</i>	Mioclonia e distonia responsivos a álcool
DYT12	128235	19q12-q13.2	<i>ATP1A3</i> - α 3sódio-potássio atpase	Síntese da bomba de sódio-potássio? hiperexcitabilidade neuronal ?	AD	Variável	Incompleta	<i>Plus</i>	Distonia generalizada com parkinsonismo de início súbito geralmente após um fenômeno estressor.
DT13	607671	1p36.32-p36.13	Desconhecido	Desconhecida	AD	Média -15 anos	58%	Primária	Focal ou segmentar, raramente generalizada relatada em uma família relatada em uma família italiana.
DYT14	607195	14q13	Desconhecido	Desconhecida	AD	Infância	Incompleta	<i>Plus</i>	Semelhante à <i>DYT5</i> (distonia responsiva à dopa).
DYT15	607488	18p11	Desconhecido	Desconhecida	AD	Infância e adolescência	Incompleta	<i>Plus</i>	Semelhante à <i>DYT11</i> (distonia mioclônica). Vista em uma numerosa família canadense

OMIM^{*}- herança mendeliana no homem *on line* AD^{*} -autossômico-recessiva AR^{**} - autossômico-dominante LX^{***} - ligada ao X

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Realizar estudo fenotípico e genotípico de pacientes portadores de doença de Parkinson de início precoce; doença de Parkinson familiar; distonia de início precoce; distonia familiar.

2.2 Objetivos secundários

- Estabelecer a correlação fenotípica-genotípica dos pacientes com doença de Parkinson de início precoce e doença de Parkinson familiar.
- Estabelecer a correlação fenotípica-genotípica dos pacientes com distonia de início precoce e distonia familiar.
- Avaliar, nos casos negativos para mutações nos genes conhecidos, outras regiões/genes candidatos por intermédio de *Whole Genomic Association*.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Parecer ético

O projeto de pesquisa: “Caracterização Fenotípica e Genotípica de Parkinsonismo e Distonia Familiares no Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas (HC–UFMG)” foi submetido à avaliação da Câmara Departamental de Clínica Médica e posteriormente encaminhado para aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados em janeiro do ano de 2005, COEP-ÉTIC 580-4 (ANEXO B).

3.2 Pacientes

Todos os pacientes do Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram entrevistados e cadastrados em um banco de dados durante o período de julho do ano de 2005 a julho do ano de 2006. O Ambulatório de Distúrbios de Movimento foi criado em 1993 e constitui-se hoje em centro de referência em assistência e pesquisa na área. Os pacientes do presente estudo foram selecionados a partir desse banco de dados, segundo critérios de inclusão preestabelecidos. Todos os selecionados foram examinados tanto pelo autor quanto pelo orientador do estudo. Foi realizado exame clínico e neurológico com subsequente aplicação das escalas de Burk-Fahn-Marsden (BURK *et al.*, 1985), *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (FAHN; ELTON, 1987) e Mini Exame do Estado Mental. Todos os indivíduos tinham pelo menos um exame de imagem (tomografia computadorizada ou imagem por ressonância magnética), além de testes hematológicos, bioquímicos, dosagem sérica e urinária de cobre e dosagem de ceruloplasmina.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Parkinsonismo de acordo com critério do banco de cérebro de Londres (DANIEL; LEES, 1993).

- Distonia primária ou distonia-*plus*, de acordo com os critérios de Fahn, Bressman e Marsden (1998).
- História familiar positiva para transtorno do movimento similar, compatível com transmissão hereditária de padrão definido (entendendo-se por história familiar positiva pelo menos um parente de primeiro grau com acometimento semelhante ao do paciente em questão).
- Parkinsonismo ou distonia idiopáticas de início precoce (idade de início menor que 40 anos).

3.3 Métodos

3.3.1 Critérios do Banco de Cérebro de Londres (*Uk Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria*)

Bradicinesia associada a pelo menos um dos seguintes sintomas: rigidez, tremor de repouso de 4 a 6 hertz e instabilidade postural não causada por alteração visual, vestibular, coclear, cerebelar ou disfunção proprioceptiva. Excluem-se: história de isquemias cerebrais recorrentes ou evolução em escadas; traumas encefálicos de repetição; encefalite; crises oculógiras; tratamento com neurolépticos no início dos sintomas; remissão sustentada; sintomas unilaterais restritos por mais de três anos; paralisia supranuclear; sinais cerebelares; envolvimento disautonômico precoce; demência precoce com distúrbios de memória, linguagem e praxias; sinal de Babinski; tumor cerebral ou hidrocefalia; exposição ao tetra-hidropteridina; resposta negativa à levodopa, a despeito de altas doses na ausência de má-absorção.

3.3.2 Critérios de Fahn, Bressman e Marsden

São definidos como distonia definitiva, movimentos característicos de torção claramente manifestos ou movimentos direcionais e posturas sustentadas consistentemente presentes. Excluem-se hemiparesia secundária a acidente

vascular cerebral, exposição a neurolépticos ou lesões secundárias ao nascimento.

3.3.3 Divisão em séries

Os pacientes selecionados foram divididos em seis séries:

- Série 1 - doença de Parkinson de início habitual e familiar.
- Série 2 - doença de Parkinson de início precoce definida por idade de início dos sintomas entre 21 e 40 anos (QUINN; CRITCHLEY; MARSDEN, 1987).
- Série 3 - distonia e parkinsonismo familiar.
- Série 4 - distonia responsiva à dopa definida por distúrbio do movimento iniciado na infância, caracterizado por resposta excelente e sustentada, com baixas doses de levodopa (SEGAWA *et al.*, 1976).
- Série 5 - neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro (SWAIMAN, 1991).
- Série 6 - distonia de início precoce (idade de início dos sintomas antes dos 40 anos) e distonia familiar.

3.3.4 Extração de DNA

3.3.4.1 Coleta de sangue

Após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), foram colhidos com o sistema de *vacuntainer* 5 mL de sangue da veia antecubital e colocados em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), conforme as técnicas de anti-sepsia do serviço. O estoque foi feito a -20°C até a extração para análise.

3.3.4.2 Extração de DNA

Para extração de DNA de linfócitos do sangue periférico, foi utilizado o sistema “*Wizard Genomic DNA Purification KIT*” (Promega™ Corporation, Madison, Wis).

A extração consistiu de quatro etapas: lise celular, lise nuclear, precipitação de proteínas e precipitação do DNA. As reações foram feitas a partir das orientações do fabricante (FIG. 2). Foi extraída média de 5 mL de linfócitos de sangue periférico, que gerou média de 1,5 µg de DNA nuclear.

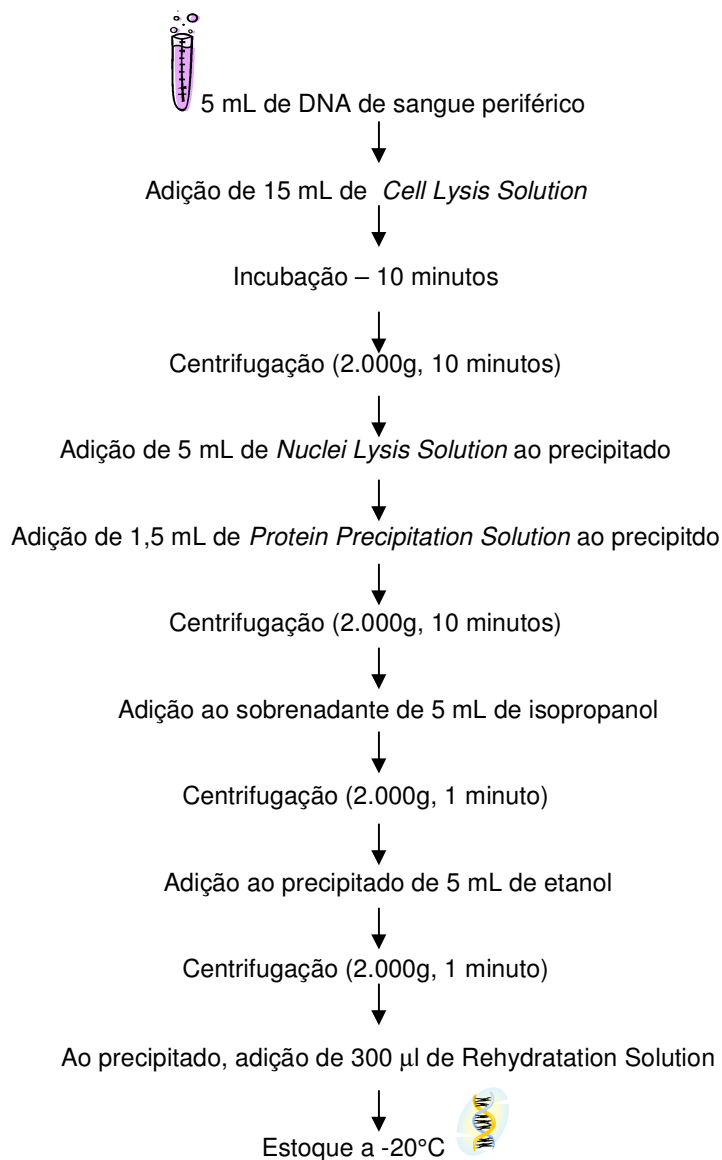


FIGURA 2 - Etapas de extração de DNA genômico de sangue total.

3.3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

É necessário mencionar que essa etapa e as que se seguem foram realizadas pela autora da tese no *Laboratory of Neurogenetics, National Institutes of Aging, National Institutes of Health* (Bethesda, MD-EUA), sob a supervisão dos doutores John Hardy e Andrew Singleton. Em cada série citada no subitem 3.3.3 foram testados os genes mostrados no QUADRO 4.

QUADRO 4
Genes testados em cada série

Série	Gene
1- Doença de Parkinson familiar	<i>PRKN, PINK1, LRRK2, SNCA</i>
2- Doença de Parkinson de início precoce	<i>PRKN, PINK1</i>
3- Distonia e parkinsonismo familiar	<i>PRKN, PINK1, LRRK2, SNCA, DYT1, DYT12</i>
4- Distonia responsiva à dopa	<i>CGH1</i>
5- Neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro	<i>PANK2</i>
6- Distonia de início precoce e distonia familiar	<i>DYT1, DYT12</i>

Em cada PCR foram utilizados 20 nanogramas de DNA genômico, 5 pmol de cada *primer* (*forward* 3'→5' e *reverse* 5'→3') e 2U de FastStart TaqDNA polimerase (Roche™ *Diagnosics Corporation*, Basel, Switzerland) contendo todos os tampões e os dinucleotídeos (dNTPs) necessários, num volume total de 15 µL. Os ciclos de temperatura foram realizados em um programa *touchdown* (60 TD 50), cujas variações de tempo e temperatura e são demonstradas no QUADRO 5.

QUADRO 5

Ciclos de temperatura e tempo de PCR *touchdown*

Ciclo	Fase	Temperatura	Tempo
1 ao 8	Desnaturação	94°C	2'30"
	Desnaturação	94°C	30"
	Anelamento	60°C	20"
	Extensão	72°C	30"
9 ao 24	Desnaturação	94°C	20"
	Anelamento	60°C	20"
	Extensão	72°C	30"
25 ao 45	Desnaturação	94°C	20"
	Anelamento	50°C	20"
	Extensão	72°C	30"

Do produto final da PCR final foram utilizados 5 μ L para eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio para posterior visualização por transluminação ultravioleta. Após a confirmação de que os controles negativos estavam sem contaminação por DNA (ausência de visualização de bandas; FIG. 3), o produto de PCR foi purificado.

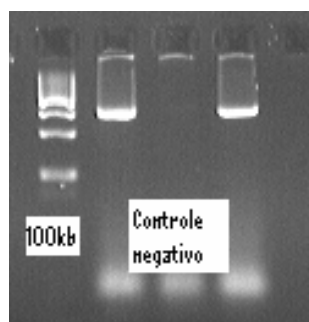


FIGURA 3 - Visualização de produtos de PCR e controle negativo.

3.3.5.1 Purificação do produto da PCR

Adicionaram-se 60 μL de *UltraPure Water* (Millipore™ Corporation, New York, NY) a cada PCR. Transferiu-se a mistura para a *MultiScreen PCR_{μ96} Filter Plate* (Millipore™ Corporation, New York, NY). Colocou-se a placa no vácuo por aproximadamente três a quatro minutos em 20 a 25 mmHg ou até que não houvesse líquido na placa. Ressuspendeu-se em 25 μL de água e colocou-se a placa no agitador por 10 minutos e transferiu-se o produto de PCR purificado para uma placa limpa de 96 reações.

3.3.6 Reação de seqüenciamento

Do produto de PCR purificado, 5 ng foram submetidos à reação de seqüenciamento; 5 ng do produto de PCR purificado; 3,2 pmol de *primer* (*forward* ou *reverse*); 1 μL de *BigDye* (*BigDye Terminator v3.1*, Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 2 μL do tampão do fabricante (*5x ABI Sequencing Buffer*), perfazendo um volume total de 10 μL .

Os ciclos de temperatura e tempo são apontados No QUADRO 6:

QUADRO 6

Ciclos de temperatura e tempo em PCR de seqüenciamento

Ciclo	Fase	Temperatura	Tempo
1 ao30	Desnaturação	96°C	30"
	Anelamento	50°C	15"
	Extensão	60°C	3'

Cada produto de PCR foi seqüenciado em ambas as direções (*forward* 3'→5' e *reverse* 5'→3') com os mesmos *primers* usados para primeira amplificação (ANEXO A).

3.3.6.1 Purificação da reação de seqüenciamento

Foram adicionados 25 μ L de *Montage Millipore Injection* (Millipore Corporation™) a cada PCR. Transferiu-se a mistura para a *MultiScreen SEQ₉₆ Filter Plate* (Millipore Corporation™). Colocou-se a placa no vácuo por aproximadamente três a quatro minutos em 20 a 25 mmHg ou até que não houvesse líquido na placa. Repetiu-se o procedimento de ressuspensão e vácuo. Ressuspendeu-se em 20 μ L de *Montage Millipore Injection* e colocou-se a placa no agitador por 10 minutos sob proteção da luz.

3.3.6.2 Análise da reação de seqüenciamento

Após a purificação da reação de seqüenciamento, o produto foi processado no ABI3730XL (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Todas as corridas processadas foram avaliadas pelo programa *Sequencher* (*GeneCodes Corporation, Ann Arbor, Mi*).

3.4 Análise quantitativa de éxons

A PCR quantitativa (*real-time PCR*) foi realizada com os éxons de *PRKN* E *SNCA* nas séries 1 e 2 para *PRKN* e série 1 para *SNCA*, em quadruplicatas de cada amostra e de pelo menos dois controles para cada éxon dosado. Foi também incluído um controle (NT, *non template*) com todos os reagentes, no entanto, sem DNA: a PCR foi feita com um volume total de 20 μ L contendo: 25 ng de DNA genômico, 20 pmol/ μ L de *primers forward* e *primers reverse* do éxon-alvo e da β -globina; 10 pmol/ μ L de *probes* do éxon-alvo e da β -globina e 10 μ L de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems™, Foster City, CA*). As seqüências de *primers* e *probes* estão no ANEXO A. A PCR foi então processada no ABI 7900HT (*Applied Biosystems™, Foster City, CA*), com condições relacionadas no QUADRO 7.

QUADRO 7

Ciclos de temperatura e tempo em PCR de dosagem de éxons

Ciclo	Fase	Temperatura	Tempo
1		50°C	2`
		95°C	10`
2 ao 40	Desnaturação	96°C	30"
	Anelamento	60°C	30"
	Extensão	72°C	30"

3.4.1 Cálculo dos valores de CT

Onde:

Ct é definido como o primeiro ciclo de PCR no qual há detecção de fluorescência; é um indicador de sucesso da PCR, assim como de anelamento específico do *probe*.

Valor Ct – *probe* – valor Ct- β -globina:

Calcula-se a média do valor de Δ Ct e calcula-se a média de desvio(s)-padrão das médias dos valores de Δ Ct.

Calcula-se a diferença entre Δ Ct do calibrador (controle normal) e o Δ Ct-alvo ($\Delta\Delta$ Ct) e após:

Soma-se o valor ao desvio-padrão $\Delta\Delta$ Ct \pm s

Alcance: $2^{-(\Delta\Delta$ Ct + s)} a $2^{-(\Delta\Delta$ Ct - s)}

Valores aceitáveis: Ct 22-27, s \leq 0,16

Dosagem de genes: 0,4 – 0,6 deleção

0,8 - 1,2 normal

1,3 - 1,6 duplicação

\geq 1,7 - triplicação/ duplicação homozigóticos

3.5 Análise na plataforma Illumina™

O *beadstudio* 500G™ (*Illumina* Inc™, San Diego, CA, EUA) é um sistema altamente eficiente, com boa relação custo-efetividade para genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs – *single nucleotide polymorphim*). Assim, a partir do *Illumina's HumanHap550 Genotyping BeadChip*™ (*Illumina* Inc™, San Diego, CA, EUA), foram estudados 555.000 SNPs derivados do *International HapMap Project* (www.hapmap.org) ao longo de todo o DNA cromossômico por amostra de DNA e um único *BeadChip*™ (BC). Com o sistema, é possível fazer estudos de associação do genoma, assim como da perda de heterozigose e número de cópias, promovendo alta cobertura genômica com menos SNPs quando comparados a estratégias usando SNPs selecionados randomicamente. O *call rate* (eficácia) estimado é de 99,78% e a reproducibilidade é de 99,9% (*Illumina*™ *Product Guide* 2006-2007)

O DNA usado para o ensaio foi amplificado isotermicamente durante a noite. São usados 750 ng de DNA genômico. O produto amplificado é então fragmentado enzimaticamente. Após a precipitação alcoólica e ressuspensão do DNA, o *BeadChip*™ é preparado para hibridização em câmara de fluxo capilar. Em um segundo momento, as amostras são hibridizadas no *BeadChip*™ e incubadas durante a noite: as amostras então fragmentadas e amplificadas hibridizam-se covalentemente aos 550.000 *loci* específicos. Um *bead type* corresponde a um alelo por *locus* de SNP. Após a hibridização, a especificidade alélica é conferida com extensão enzimática de bases. Os produtos são subseqüentemente submetidos à fluorescência. A intensidade de fluorescência é detectada no *Illumina BeadArray Reader*™ e após análise, usando-se o programa *Illumina*™ para genotipagem automatizada.

3.5.1 Protocolo indicado pelo *Illumina*™

3.5.1.1 Fazer AMP2 (amplificação do DNA)

- Aplicar 15 µL 0,1N NaOH nas células designadas (colunas 1, 5 e 9) na placa WG#1 AMP2.
- Aplicar 15 µL de amostra de DNA em cada célula contendo NaOH.
- Incubar por 10 minutos em ar ambiente.
- Aplicar 270 µL da solução WG#MP1 em cada célula contendo as amostras.
- Aplicar 300 µL da solução WG#AMM em cada célula contendo amostras.
- Selar a placa WG#1 AMP2.
- Inverter a placa selada por 10 minutos para misturar o conteúdo, centrifugar em pulso em 280 Xg.
- Incubar a placa WG#1 AMP2 no *Illumina Hyb Oven* por 20 horas (máximo de 24 horas) a 37°C.

3.5.1.2 Fragmentar AMP2

- Remover a placa do forno e centrifugar a 50 Xg por um minuto.
- Dividir as amostras nas três células adicionais, para um total de quatro células por amostra, cada uma contendo 150 µL (FIG. 3).
- Adicionar 50 µL da solução WG# FRG em cada célula de WG #1 AMP2.
- Selar a placa, colocá-la no vórtex a 1.600 rotações por minuto (rpm) por um minuto e centrifugar a 50 Xg por um minuto.
- Incubar a placa WG#1 AMP2 em um bloco aquecido por uma hora a 37°C.

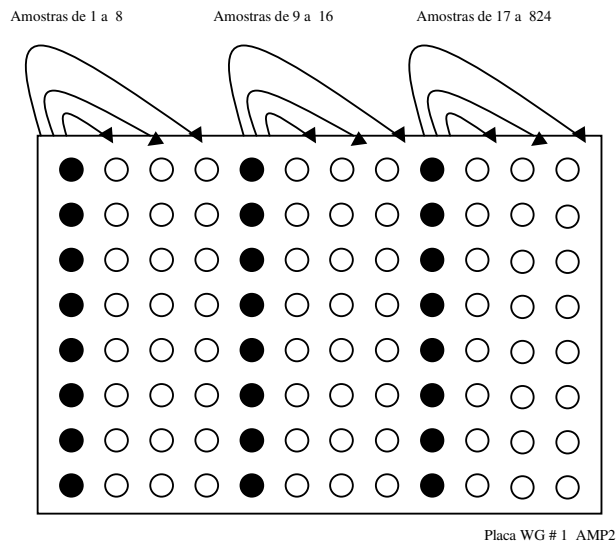


FIGURA 4 – Visualização da placa WG #1 AMP2.

3.5.1.3 Precipitar AMP2

- Centrifugar a placa WG#1 AMP2 a 50 Xg à temperatura ambiente por um minuto.
- Incubar por cinco minutos a 37°C.
- Centrifugar a placa WG#1 AMP2 a 50 Xg à temperatura ambiente por um minuto.
- Remover a capa da placa e adicionar 300 μ L de 2-propanol a 100% em cada célula contendo amostras.
- Selar a placa e inverter aproximadamente 10 vezes.
- Incubar a placa WG#1 AMP2 por 30 minutos a 4°C.
- Centrifugar a placa WG#1 AMP2 a 3.000 Xg por 20 minutos a 4°C.
- Remover a placa e desprezar o sobrenadante, invertendo rapidamente a placa e depois invertê-la sobre um papel absorvente várias vezes durante um minuto até que as células estejam livres do líquido.
- Inverter a placa sem selar em um suporte por uma hora a 22°C a fim de secar ainda mais o *pellet* azul.

3.5.1.4 Ressuspender AMP2

- Adicionar 42 μ L da solução WG#-RA1 em cada célula da placa WG#1 AMP2 que contiver o *pellet* de DNA e selar a placa.
- Incubar a placa no *Illumina*[®] *Hyb Oven* por uma hora, a 48°C.
- Colocar a placa no vórtex a 1.800 rpm por um minuto e, após, centrifugar em pulso a 280 Xg.

3.5.1.5 Hibridizar no *BeadChip*[™]

- Usar papel absorvente (*Kimwipe*[®]) para lavar cada placa de vidro com álcool 70%.
- Colocar os selos de metal do *Illumina Hyb chamber*[™] na câmara *BeadChip Hyb*[™].
- Dispensar 200 μ L da solução WG # -PB2 em cada um dos reservatórios de tampão (oito no total) da Hyb.
- Selar a câmara *Illumina*[®] *Hyb* e deixar em temperatura ambiente.
- Colocar o *rack* com os *chips* enfileirados e deixá-los submersos em 200 mL de etanol a 100%, agitando-os inicialmente e nos intervalos de cinco e 10 minutos.
- Retirar o *rack* com os *chips* submersos em etanol e submergê-los na solução WG# -PB1, agitando-os inicialmente e nos intervalos de dois minutos e meio e cinco minutos.
- Colocar a placa WG #1 AMP2 com as amostras ressuspendidas em bloco aquecido a 95° por 20 minutos
- Secar o *rack* com os *chips*, colocando-os na centrífuga a 280 Xg por um minuto.
- Alinhar as placas de vidro com o *chip* entre elas, colocando o espaçador de plástico, e selá-las com o selo de metal dentro da câmara *Illumina Hyb*[™] e levá-las para a *Chamber Rack Area*[™].

- Remover a WG #1 AMP2 do bloco aquecido e centrifugar em pulso a 280 Xg.
- Recolocar as quatro colunas da placa WG #1 AMP2 na coluna original.
- Dispensar 150 μ L de formamida a 100% em cada câmara em seu reservatório final.
- Dispensar 150 μ L da solução WG#-RA1 em cada câmara em seu reservatório final.
- Dispensar 150 μ L de amostra de DNA a 100% em cada câmara.

3.5.1.6 Incubar o *BeadChip*[™]

Incubar a *Hyb Chamber* no *Illumina*[®] *Hyb Oven* por 16 horas a 48°C, com o agitador na velocidade cinco.

3.5.1.7 Estender BC2

A) Para extensão de base única

- Em cada câmara dispensar 150 μ L da solução WG #-RA1 em cada reservatório da câmara e incubar por 30 segundos. Repetir seis vezes para cada câmara.
- 450 μ L da solução WG #-XC1 e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG #-XC2 e incubar por 10 minutos.
- 200 μ L da solução WG #-TEM e incubar por 15 minutos.
- 450 μ L de formamida 95%/1 mM EDTA e incubar por um minuto. Repetir por mais uma vez e esperar por cinco minutos.
- 450 μ L da solução WG #-XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez.
- Aguardar até a câmara atingir 37° C.

B) *Stain BeadChip*

- Em cada câmara, dispensar- 250 μ L da solução WG #LTM e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG # -XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez e esperar por cinco minutos.
- 250 μ L da solução WG#-ATM e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG # -XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez e esperar por cinco minutos.
- 250 μ L da solução WG#-LTM e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG # -XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez e esperar por cinco minutos.
- 250 μ L da solução WG#-ATM e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG # -XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez e esperar por cinco minutos
- 250 μ L da solução WG#-LTM e incubar por 10 minutos.
- 450 μ L da solução WG # -XC3 e incubar por um minuto. Repetir uma vez e esperar por cinco minutos.
- Remover as câmeras do *chamber rack* e colocá-las horizontalmente em temperatura ambiente.

3.5.1.8 Lavar e secar

- Colocar 310 mL da solução WG # -PB1 na câmara de lavar *BeadChips*.
- Mover o *rack* com os *BeadChips* para baixo e para cima durante cinco minutos.
- Colocar 310 mL de WG # -XC4 na câmara de lavar não mais que 10 minutos.
- Retirar o *rack* com os *BeadChips* e colocá-los no vácuo até secarem (40-45 minutos a 508 mmHg).

3.5.1.9 Lendo os *BeadChips*

- Colocar o primeiro *BeadChip* no *BeadArray Reader Tray*.
- Usar o escaneador com código de barras e ler o primeiro *BeadChip* e pressionar a tecla SCAN.

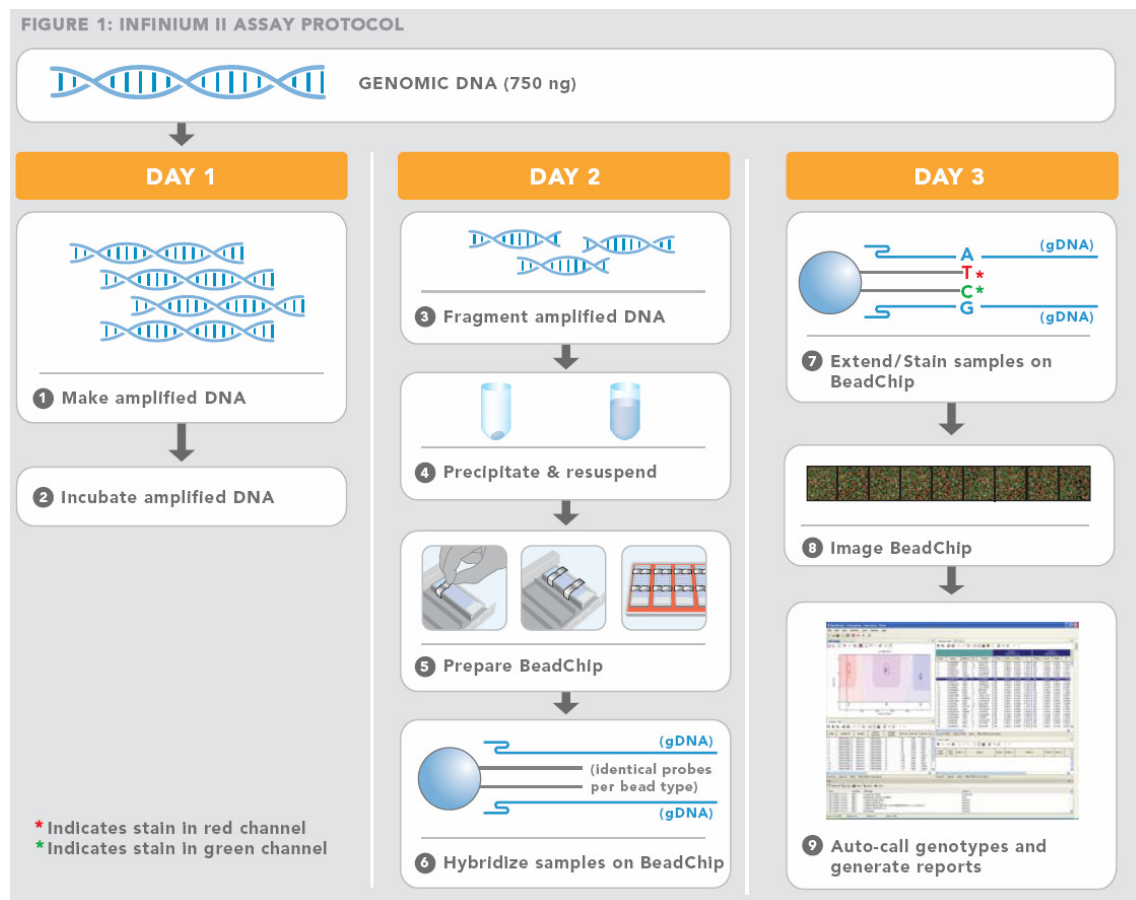


FIGURA 5 – Sumário do processo do *Illumina*TM (www.illumina.com).

3.6 Análise do mapa de autozigosidade

Os dados foram analisados com o programa *BeadStudio* v3 (*Illumina* Inc.) e posteriormente manipulados e estocados no programa *GERON Genotyping database* (<http://neurogenetics.nia.nih.gov>).

O mapa de autozigose foi feito usando-se o programa *tracker* (versão 0.99), uma ferramenta java desenvolvida para visualizar os traços contíguos de homozigose com potencial segregador de doença (www.neurogenetics.org). Após a identificação de todos os traços de homozigose nos indivíduos afetados, os genótipos foram exportados do *BeadStudio* (Illumina Inc.) e comparados por identidade.

Os genes resultantes do mapa de autozigose foram identificados com os marcadores indicados (de rs1434087 e rs10497541 até rs1518709 e rs10930936) com base nas informações do *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e Ensembl (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> e http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html). Os *primers* foram desenhados para amplificação e seqüenciamento dos éxons codificantes, flanqueando 30 Bp da região intrônica. Os genes *OSBPL6*, *PRKRA*, *DFNB59*, *FKBP7*, *PLEKHA3*, *TTN*, *FLJ39502*, *SESTD1*, *LOC728984*, *LOC644776*, *ZNF533*, *LOC729001* foram seqüenciados a partir de 25 ng de DNA, 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*, *vide anexo*) e 6 µL de *FastStart PCR master mix* (Roche). Foram testados para a mutação em *PRKA* (*vide resultados*) 426 controles portugueses, 83 controles brasileiros, 738 amostras da *Human Genome Diversity Project DNA panel* (incluindo 44 brasileiros), 249 norte-americanos com PIP do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS, neurogenetics repository)*, 45 pacientes brasileiros com PIP (série 2) e 12 pacientes brasileiros não relacionados portadores de distonia generalizada (série 6).

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos da amostra

Os participantes do presente estudo foram selecionados a partir dos pacientes atendidos no Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, no período compreendido entre junho do ano de 2005 e junho do ano de 2006. Foi atendido um total de 575 indivíduos, com média de intervalo entre consultas de 3,5 meses. Quanto à distribuição por sexo, 294 eram do sexo feminino e 281 do sexo masculino. A média de idade do início dos sintomas foi de 40,5 anos \pm 21,1 anos, com máximo de 86 anos e mínimo de um dia de vida. É importante mencionar que a prevalência de coréia foi subestimada nesse gráfico, uma vez que a maioria dos pacientes com esse diagnóstico fazia seguimento em um ambulatório à parte. O GRAF. 1 mostra a distribuição dos pacientes conforme a etiologia do distúrbio do movimento.

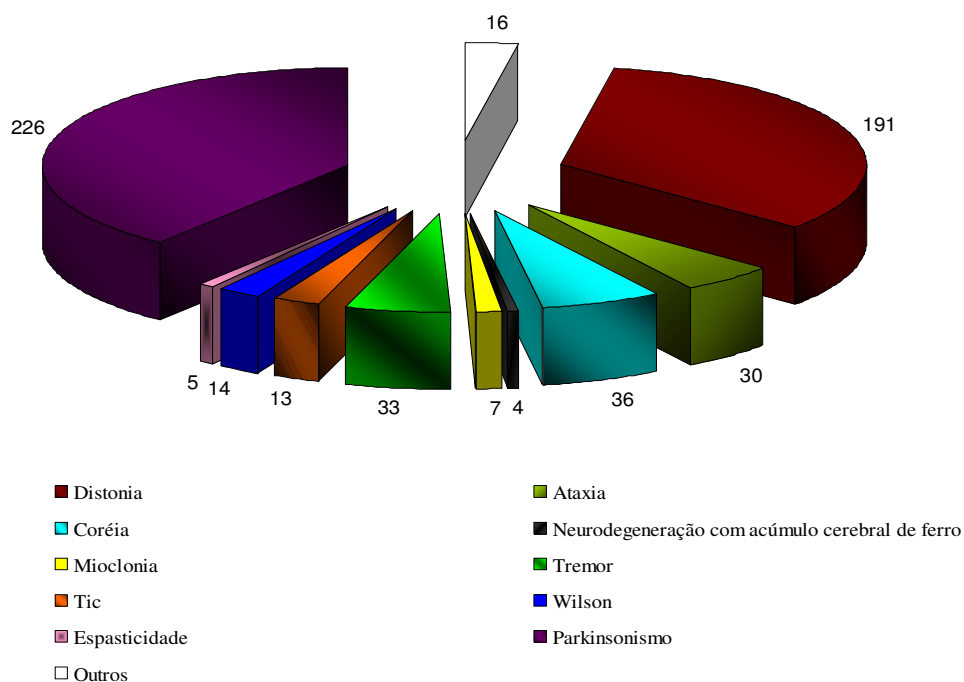


GRÁFICO 1 – Distribuição fenomenológica dos pacientes do Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As TAB. 1 e 2 mostram, respectivamente, os subtipos de distonia e parkinsonismo, idade de início dos sintomas, distribuição por sexo e história familiar.

TABELA 1
Características demográficas dos portadores de distonia

TIPOS DE DISTONIA	N	IDADE DE INÍCIO (ANOS)	HISTÓRIA FAMILIAR	SEXO MASC/FEM
<i>Distonia Primária</i>				
Espasmo hemifacial	36	49,4±13,5	0	11 X 25
Generalizada idiopática	22	17,4±11,2	8	11 X 11
Distonia cervical	21	34,4±18,7	2	6 X 15
Blefaroespasmo	19	57,8±13,5	1	5 X 14
Blefaroespasmo congênito	2	1 dia de vida	2	1 X 1
Distonia responsiva à dopa	10	7,6±3,8	3	5 X 5
Distonia de escrita	12	30,7±6,5	5	5 X 7
Distonia segmentar	9	49,5±11,7	0	4 X 5
Outras distonia focais	6	38,4±25,1	1	2 X 4
Disfonia espasmódica	4	66±3,5	1	0 X 4
Distonia multifocal	3	25±5	2	1 X 2
Distonia paroxística	1	13	0	1 X 0
<i>Distonia Secundária</i>				
Distonia generalizada	27	23,81±22,18	0	12 X 15
Distonia cervical	7	34,71±13,81	0	3 X 4
Outras distonias focais	7	27 ±25,81	0	1X 6
Distonia multifocal	2	2±2,8	0	1 X 1
Distonia segmentar	3	34,3±18	0	3 X 0

TABELA 2
Características demográficas dos portadores de parkinsonismo

SUBTIPOS DIAGNÓSTICOS	N	IDADE DE INÍCIO (ANOS)	HISTÓRIA FAMILIAR	SEXO MASC/FEM
Doença de Parkinson idiopática	198	52,38±13,22	29	108 X 90
Parkinson de início precoce	45	34,8 ± 5,4	11	25X20
Parkinsonismo vascular	7	58,5±2,1	0	3 X 4
Parkinsonismo induzido por drogas	6	60,8±15,2	0	3 X 3
Atrofia de múltiplos sistemas	4	49,8±9,7	0	3 X 1
Paralisia supranuclear progressiva	3	64,66±5	0	2 X 1
Demência por corpos de Lewy	2	63±8,5	0	1 X 1
Parkinsonismo				
Associado à doença do neurônio motor	2	69,5±23,3	0	2 X 0
Doença mitocondrial	1	33	0	1 X 0
Hidrocefalia	1	80	0	0 X1
Doença de Fahr	1	50	0	0 X1
Psicogênico	1	40	0	0 X 1
Total	226	53±13,4	29	123X103

Os pacientes selecionados foram divididos em séries:

Série 1 - Doença de Parkinson de início habitual e familiar (n=8).

Série 2 - Doença de Parkinson de início precoce (n= 45).

Série 3 - Distonia e parkinsonismo familiares (n=11).

Série 4 - Distonia responsiva à dopa (n=7).

Série 5 - Neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro (n=4).

Série 6 - Distonia de início precoce e distonia familiar (n=21).

4.2 Estudo clínico-molecular da série 1: doença de Parkinson de início habitual familiar (n=8)

Foi estudado um total de oito pacientes portadores de DPI em cinco famílias. Os dados clínicos estão demonstrados na TAB. 3.

TABELA 3
Dados clínicos dos pacientes com doença de Parkinson de início habitual e familiar

Família	Paciente	Idade de início dos sintomas	Familiar acometido	Comorbidades	Imagem	Cognição	Herança
1	22	57	mãe e avó	----	normal	normal	AD*
1	24	80	mãe	----	normal	normal	AD
2	28	60	tio	hipertensão	normal	normal	AD
3	43	46	Mãe, irmão	depressão	normal	normal	AD
4	54	46	irmãos	hanseníase	normal	normal	AR**
5	95	47	irmãos	depressão	normal	normal	AR
5	96	50	irmãos	depressão	normal	normal	AR
5	105	54	irmãos	depressão	normal	normal	AR
		Média	55 ±11,37				

* autossômico-dominante

** autossômico-recessivo

Foram seqüenciados os éxons dos genes *PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA* e dosados os éxons de *PRKN* e *SNCA*. Os genes foram escolhidos pelos critérios de dominância, por serem os mais comuns causadores de mutações em diversas séries. Não houve alteração quantitativa em nenhum dos éxons dosados.

Houve apenas uma mutação inédita em heterozigose simples no éxon 21 do gene *LRRK2*, uma substituição de um nucleotídeo (guanina por citosina), gerando uma troca de um único aminoácido (glicina por histidina) na posição 923 (Q923H), como mostra a FIG. 6. O quadro clínico da paciente portadora da mutação (família 3, identificação 43) não diferiu significativamente em relação aos demais dessa

série. O sintoma inicial foi tremor de membros superiores e a forma clínica foi a rígido-acinética. A nova variante não foi encontrada em 192 controles saudáveis.

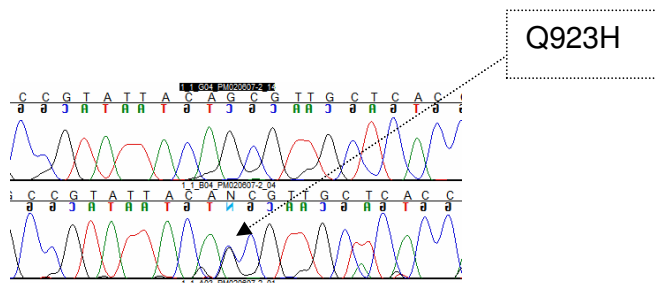


FIGURA 6 – Mutação inédita no gene LRRK2- Q923H.

4.3 Estudo clínico-molecular da série 2: doença de Parkinson de início precoce (n= 45)

Foram estudados 45 pacientes consecutivos com diagnóstico de PIP. A média de idade de início foi de $34,8 \pm 5,4$ anos; 11 tinham história familiar positiva. Foram seqüenciados os éxons de *PRKN* e *PINK1* e dosados os éxons de *PRKN*, já que esses genes são os mais comuns causadores de parkinsonismo em casos de início precoce e herança autossômico-recessiva.

Encontraram-se cinco mutações anteriormente descritas no gene *PRKN*, como: W54R (substituição do aminoácido triptofano por arginina na posição 54) em heterozigose composta com V3I (substituição do aminoácido valina por isoleucina na posição 3); heterozigose composta de 255Adel (deleção do nucleotídeo adenina na posição 255) com T240M (substituição do aminoácido treonina por metionina na posição 240); heterozigose composta de P253R (substituição do aminoácido prolina por arginina na posição 253) com duplicação do éxon 5 e também heterozigose simples de 255Adel e T240M (CLARK *et al.*, 2006a; KLEIN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006). Constatou-se uma mutação inédita em *PINK1*: trata-se de uma deleção homozigótica no éxon 7. Dos 39 pacientes negativos para mutações, foi possível fazer estudo genotípico em 35 (QUADRO 8); em

quatro a amostra de DNA foi insuficiente. Os dados comparativos entre os casos com e sem mutação estão demonstrados no QUADRO 8. Os dados clínicos dos pacientes portadores das mutações estão descritos conforme mostra o QUADRO 9.

QUADRO 8
Dados comparativos dos pacientes portadores e não-portadores
de mutações em *PRKN* E *PINK1*

	Não-portadores de mutação	Mutados
N	39	6
Casos índice	36	6
Sexo (masculino e feminino)	19 M e 20 F	4 M e 2 F
Início dos sintomas	$35 \pm 5,4$ anos	$33,1 \pm 7,6$
História familiar	8	0
Idade à primeira consulta	$40,5 \pm 5,8$	$38 \pm 6,8$
Presença de distonia independente de tratamento	71,70%	66,60%
Resposta à levodopa	boa-77%, intolerante- 7,7%, não se aplica-15,4%	boa-66,7%, não se aplica- 33,3%
Média para discinesia induzida por levodopa	1,8 anos	3,5 anos
Discinesia grave, requerendo cirurgia	4	1
Outras comorbidades	2 pacientes (hipotireoidismo e neuropatia periférica)	0

QUADRO 9

Dados clínicos dos pacientes portadores de mutações em *PRKN* E *PINK1*

PACIENTE	2035-21	2035-23	2035-46	2035-49	2035-76	2035-112
Gene	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PINK1</i>
Mutação	W54R V3I	255Adel	T240M	P253R Dup exon5	255Adel T240M	Ex7 del
Sexo	Masculino	Feminino	Masculino	Masculino	Masculino	Feminino
Idade atual	54	52	38	46	64	43
Início (anos)	40	40	33	40	22	24
Sintoma inicial	Bradicinesia	Tremor de membros	Tremor	Bradicinesia	Tremor	Tremor
Seguimento (ano)	7	7	2	4	11	14
História familiar	Negativa	negativa	Negativa	Negativa	negativa	Negativa
UPDRS ⁺⁺ motor-“on	50	12	17	54	36	10
Taxa progresso (escore motor /ano)	+2,5/ano	0,3/ano	+1/ano	+4/ano	+0,8/ano	+0,5/ano
Tipo	Rígido- acinético	Tremor predominante	Tremor predominante	Rígido- acinético	Tremor predominante	Rígido- acinético
Imagem	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Tempo do início de sintomas para uso de levodopa	5 anos	*	*	1 anos	15 anos	6 anos
Tempo p/desenvolver discinesia	2 anos	-----	-----	4 anos	1 ano	7 anos
Discinesias (escore do UPDRS)	1-1-2-0	0	0	1-0-0-0	1-2-2-1	1-0-0-0
Cirurgia	Não	Não	Não	Não	Palidotomia	Não
Sintomas psiquiátricos	Nenhum	Ansiedade generalizada	Depressão	Ansiedade	Nenhum	Ansiedade

⁺⁺UPDRS – *Unified Parkinson disease Rating Scale*.

* Paciente nunca usou levodopa

4.4 Estudo clínico-molecular da série 3: distonia e parkinsonismo familiar (n=9)

Foram estudadas três famílias com fenótipos de distonia e parkinsonismo.

Família 6 – A família 6 foi composta de quatro indivíduos afetados, de fenótipos variados, conforme o heredograma da FIG. 7.

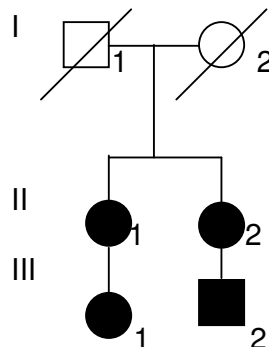


FIGURA 7 - Heredograma da família 6.

II.1 Paciente atualmente com 67 anos (janeiro de 2008). Os sintomas iniciaram-se aos 58 anos, com tremor céfálico. O exame neurológico não mostrou anormalidades nos reflexos osteotendíneos, tônus, equilíbrio e coordenação. Não havia tremor postural, de repouso, de intenção ou parkinsonismo. A paciente não apresentava co-morbidade. O tremor céfálico apresentou resposta subótima com propranolol (80 mg ao dia) e primidona (100 mg ao dia).

II.2 Paciente atualmente com 74 anos (janeiro de 2008). Iniciou os primeiros sintomas aos 31 anos, com tremor em membros inferiores. Gradativamente, os sintomas evoluíram para membros superiores (aos 44 anos) com rigidez e bradicinesia. Aos 66 anos, surgiu congelamento ao início da marcha, além de tremor ortostático e instabilidade postural. Apresentou boa resposta a levodopa e biperideno; atualmente usando 1 g de levodopa e 4 mg de biperideno. O escore da parte III da UPDRS foi de 45 (na vigência do efeito da medicação). Como co-morbidade, depressão maior.

III.1 Paciente com idade atual de 46 anos (janeiro de 2008). Iniciou aos 46 anos alteração da fala, caracterizada por estrangulamento da voz. O exame neurológico não apresentou anormalidades, a não ser a disfonia espasmódica do

tipo adutora. O tratamento com toxina botulínica nas cordas vocais mostrou-se satisfatório (10 unidades de toxina botulínica tipo A, Botox® em musculatura adutora).

III.2 Paciente com idade atual de 49 anos (janeiro de 2008). O paciente iniciou, em torno dos 40 anos, tremor de membros superiores, sendo esse de repouso, postural e cinético. O tremor era assimétrico e havia dificuldade de escrita. O quadro era acompanhado de rigidez e bradicinesia. O exame neurológico não mostrou alterações cerebelares ou piramidais. Não havia instabilidade postural. O escore da parte III da UPDRS era de 17. Foi iniciado pramipexole com boa resposta. Como co-morbidade, transtorno de ansiedade generalizada e hipertensão arterial sistêmica.

Família 7 – A família 7 foi composta de quatro indivíduos afetados, sendo estudados três indivíduos devido ao óbito do indivíduo II.2, conforme FIG. 8.

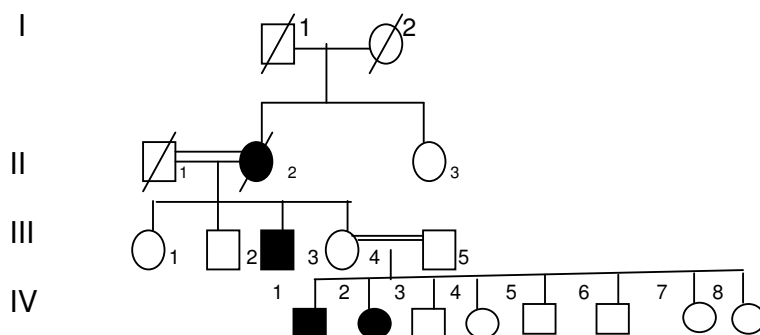


FIGURA 8 - Heredograma da família 7.

III.3 Paciente de 64 anos (janeiro de 2008), com idade de início dos sintomas aos 18 anos. O primeiro sintoma foi contração involuntária da perna esquerda à marcha. Os sintomas foram progressivos, envolvendo a perna direita, o braço esquerdo, laterocolo para a direita, desvio do tronco para a direita e fala disártrica ao longo de 10 anos. O exame neurológico em outubro de 2007 mostrou um laterocolo e látero-tronco para direita, disfonia espasmódica, extensão da perna direita à marcha, leve bradicinesia e reflexos tendinosos normais. O escore na

parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 44, com escore na parte III da UPDRS motor de 18. O paciente foi tratado com biperideno (12 mg ao dia), triexfenidil (15 mg ao dia) e baclofeno (30 mg ao dia), com melhora apenas discreta.

IV.1 Paciente de 34 anos (janeiro de 2008), nascido de parto a termo, sem intercorrências, com leve retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (início da marcha aos dois anos, fala aos cinco anos). Na idade de 11 anos, manifestou-se fechamento involuntário da mão esquerda. No mesmo ano, iniciaram-se movimentos involuntários no ombro esquerdo (desvio inferior-posterior) e extensão do pescoço para trás. Dois anos após, evoluiu com envolvimento do pé direito (inversão do pé), mão esquerda (hiperextensão do punho) e da voz, com disfonia espasmódica em adução. Três anos mais tarde, apresentou movimento involuntário do pescoço para trás. Aos 20 anos de idade procurou assistência médica. O exame oftalmológico descartou anel de Kayser-Fleischer. O exame neurológico mostrou disfonia espasmódica em adução, riso sardônico, distonia lingual, retro e laterocolo, além de hiperextensão do cotovelo esquerdo, hiperflexão do pulso e dedos à esquerda. A marcha apresentava distonia, com inversão do pé esquerdo. Não havia sinais parkinsonianos. Os reflexos se apresentavam normais. O tratamento medicamentoso com levodopa-carbidopa (375-37,5 mg ao dia), baclofeno (60 mg ao dia) e agentes anticolinérgicos (biperideno, 24 mg ao dia), além de toxina botulínica, foi desapontador. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden durante a ação da toxina foi de 64, com o escore da incapacidade de 21.

IV.2 Paciente de 48 anos (janeiro de 2008), com dificuldade na fala desde o início do desenvolvimento motor (aos dois anos de idade), sendo esta sempre disártrica. Aos 10 anos, a mãe relata surgimento de lentidão nos movimentos das mãos. Aos 20 anos, tremor nas mãos e postura distônica no pé direito à marcha. Posteriormente, surgiram congelamento da marcha e disfagia. Ao exame, apresentava riso sardônico, hipomímia acentuada, além de diminuição tonal e estrangulamento da voz. Nessa idade (20 anos) exibia distonia das mãos em repouso (flexão do punho) e ao escrever (flexão dos dedos) e eversão do pé esquerdo à marcha. Ainda havia bradicinesia, leve tremor postural em mãos e

rigidez em membros. Reflexos osteotendíneos, sensibilidade e provas cerebelares eram normais. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 14, com escore da parte III da UPDRS de 30. O tratamento com levodopa-carbidopa (375-37,5 mg ao dia) e biperideno (12 mg ao dia) foi ineficaz.

Família 8 – A família 8 é composta de dois indivíduos afetados. O heredograma está representado na FIG. 9.

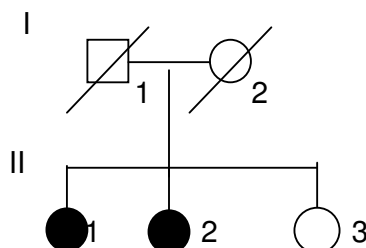


FIGURA 9 – Heredograma da família 8.

II. Paciente de 47 anos (janeiro de 2008), com início dos sintomas aos 44 anos. Os sintomas iniciaram-se com tremor de repouso, rigidez e bradicinesia em membro superior direito e evoluíram em três anos para o dimídio esquerdo. Não havia comorbidades. O exame neurológico não revelou alteração piramidal, cerebelar ou instabilidade postural. A parte III do escore da UPDRS foi de 14. A paciente faz uso de agonista dopaminérgico pramipexole (3 mg ao dia), com boa resposta motora.

II.2 Paciente de 46 anos (janeiro de 2008), com início dos sintomas aos 42 anos: contração involuntária na musculatura do pescoço, gerando um laterocolo para a esquerda e torcicolo para a direita, com dor local. O exame neurológico mostrou apenas laterocolo e torcicolo. Não havia sinais cerebelares, piramidais ou parkinsonianos. A terapêutica com levodopa-carbidopa (250/25mg ao dia) e biperideno (6 mg ao dia) foi insatisfatória. A aplicação de toxina botulínica (*Dysport*[®], 500U) em musculatura cervical (esternocleidomastoideo, esplênio, trapézio e levantador da escápula) mostrou-se eficaz.

Nessas famílias, não foram encontradas anormalidades nos genes testados: *PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA*, *DYT1* e *DYT12*. Os genes foram selecionados pela coexistência de distonia e parkinsonismo em indivíduos da mesma família: *PRKN* e *PINK1* podem causar parkinsonismo e distonia com padrão autossômico-recessivo; *LRRK2* e *SNCA* podem causar parkinsonismo com padrão autossômico-dominante; *DYT1* pode causar distonia com padrão autossômico-dominante; e *DYT12* pode causar parkinsonismo-distonia com padrão autossômico-dominante. Foi então procedida à análise de todos os pacientes dessa série na plataforma *Illumina* (vide subitem 4.8 - Análise genotípica pelo *Illumina*). Apesar da família 6 ter padrão de herança dominante e a análise da perda de heterozigose não se proceder nesse caso, a família foi incluída no estudo genotípico objetivando a análise de anormalidades estruturais no genoma (deleções, duplicações), comuns nos afetados.

4.5 Estudo clínico-molecular da série 4: distonia responsiva à dopa (n=7)

Foram estudados sete pacientes de seis famílias não correlatas. Dois eram de uma mesma família (pacientes 37 e 59 são irmãos). Os dados clínicos são expostos no QUADRO 10.

QUADRO 10
Dados clínicos dos pacientes com distonia dopa-responsiva

ID	Idade de início	Localização do primeiro sintoma	Progressão	Consanguinidade	História familiar	Imagem	Dose de levodopa	Mutação
25	4	Pé direito	Hemidistonia	Não	Negativa	RNM - normal	375 mg	?
37	7	Pés, mãos e fala	Generalizada	Não	Uma irmã afetada	RNM - normal	125 mg	M211V K224R
59	4	Pés, mãos e fala	Generalizada	Não	Um irmão afetado	RNM - normal	250-625 mg	M211V K224R
58	8	Pés	Generalizada	Não	Negativa	TCC** - normal	125 mg	T209P
64	4	Pés	Generalizada	Sim	Negativa	TCC - normal	250 mg	T209P
65	7	Pés	Generalizada	Não	Dois irmãos afetados	TCC - normal	125 mg	?
115	2	Mãos	Generalizada	Não	Negativa	RNM - normal	30 mg	?

* RNM- Ressonância nuclear magnética.

**TCC- Tomografia computadorizada de crânio.

Foi identificada uma nova mutação em dois pacientes de famílias diferentes, originando a modificação de um aminoácido: de treonina para prolina na posição 209 (T209P), como mostra a FIG.10. Outras duas mutações foram encontradas em dois irmãos em heterozigose composta no éxon 6 do gene GCH1. Tais mutações foram anteriormente descritas isoladamente (BANDMANN *et al.*, 1998; FURUKAWA *et al.* 1998; GARAVAGLIA *et al.*, 2004; LEUZZI *et al.*, 2002), mas nunca em heterozigose composta. Trata-se de substituições metionina por valina na posição 211 (M211V) e lisina por arginina na posição 224 (K224R), conforme a FIG.11. A fim de elucidar se essas mutações estariam em *cis* ou em *trans* foi feita digestão com enzima de restrição (*Pm1*). O produto digerido foi separado em gel de agarose e, posteriormente, as bandas foram seqüenciadas. Os experimentos revelaram tratar-se de alelos em *trans*, ou seja, cada um dos genitores contribuiu com um alelo mutado.

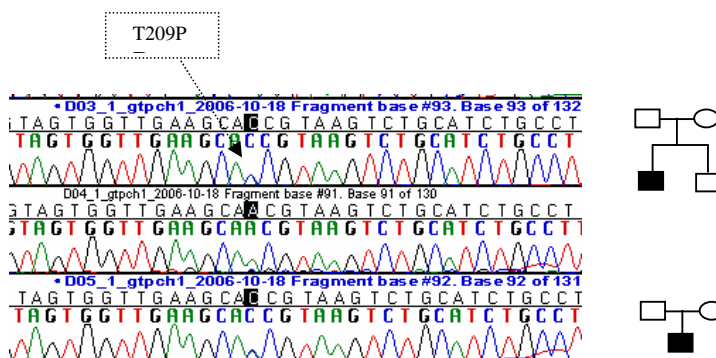


FIGURA 10 – Mutação inédita no gene GCH1.

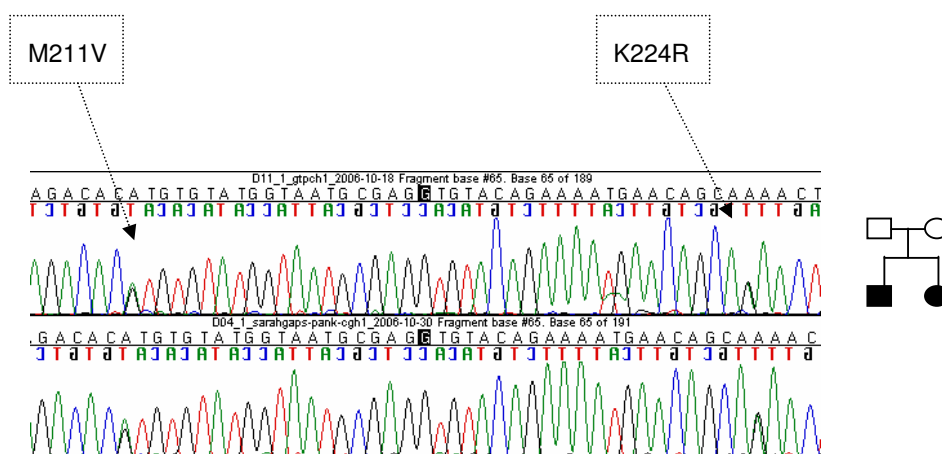


FIGURA 11 – Mutações inéditas em heterozigose composta no gene GCH1.

4.6 Estudo clínico-molecular da série 5: neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro ou doença de Hallervorden Spatz (n=4)

Foram estudados quatro pacientes com distonia de início precoce e que ao exame de imagem mostraram sinais compatíveis com aqueles vistos em neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro. A média de idade de início foi de $11,2 \pm 4,6$ anos. A amostra consistiu de três pacientes do sexo feminino e um do sexo masculino. Nenhum apresentou comorbidades.

Os pacientes negativos para mutação em *PANK2* iniciaram a doença aos dois, 12 e 15 anos, todos com alteração de marcha secundária à distonia e alteração de fala secundária à disfonia espasmódica. O quadro rapidamente progrediu para distonia generalizada não-responsiva a agentes colinérgicos ou dopaminérgicos. O exame de imagem mostrou alterações compatíveis com a hipótese de neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro (FIG. 12).

Apenas um paciente apresentou uma mutação no gene *PANK2*. Trata-se de mutação homozigótica, uma substituição de asparagina por isoleucina na posição 294 (FIG. 13). Tal paciente, fruto de casamento consanguíneo (pais eram primos em primeiro grau), teve início dos sintomas aos 13 anos, de forma insidiosa, com alteração de fala e desequilíbrio com quedas freqüentes, além de crise convulsiva tônico-clônica generalizada. Queixava-se também de episódios esporádicos e não provocados de flexão dos dedos da mão direita, com flexão do punho e duração de três minutos. Ao exame (em outubro de 2007, com 42 anos), apresentava fala escandida com disfonia espasmódica, mioquimia facial, discreto tremor postural, rigidez em roda dentada, bradicinesia e importante instabilidade postural. A marcha se dava em passos curtos com virada em bloco e diminuição da sincinesia dos membros superiores. Os reflexos tendinosos estavam aumentados com clônus aquileu. O escore da parte III da escala de UPDRS era de 24 e desde a primeira consulta se manteve inalterada (março de 2001). Não houve resposta com levodopa. Em outubro de 2007 foram também observados episódios de festinação da marcha.

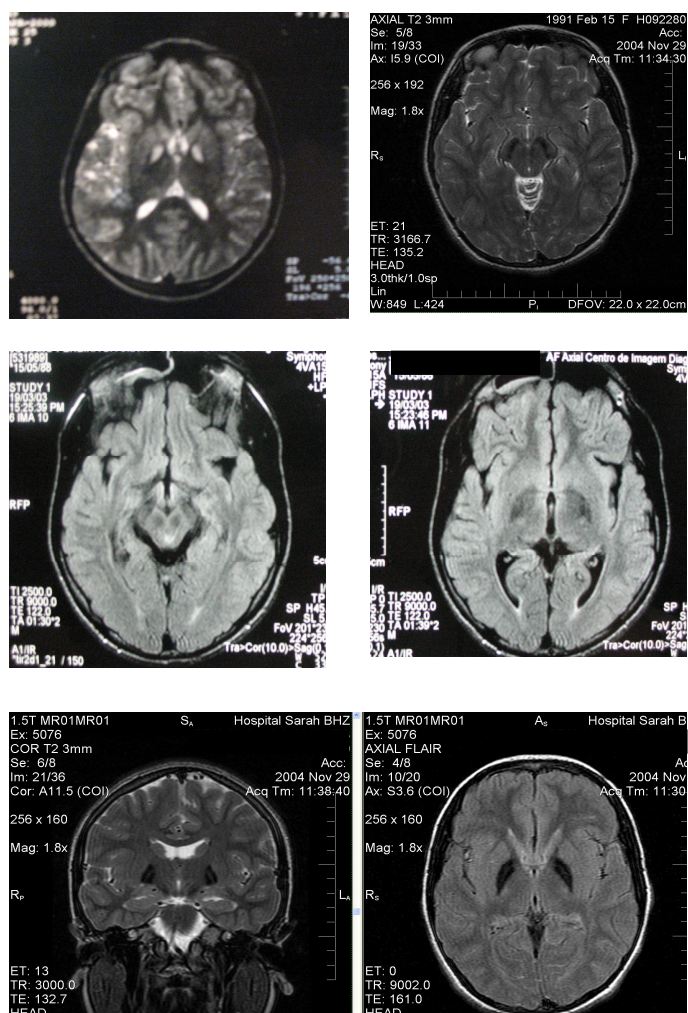


FIGURA 12 – Imagens compatíveis com neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro em pacientes negativos para mutações em *PANK2*.

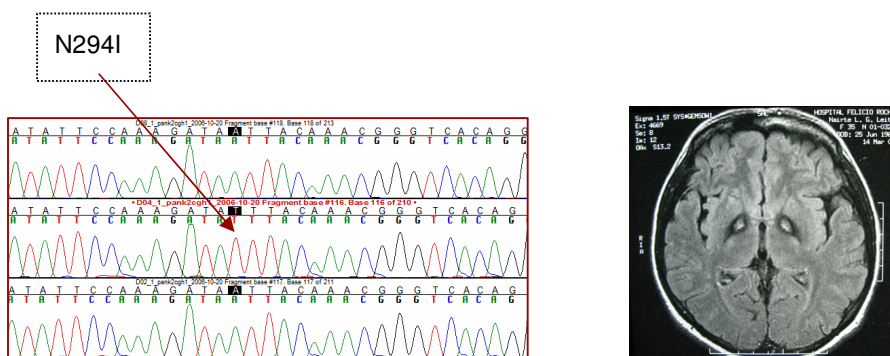


FIGURA 13 – Mutação homozigótica em *PANK2*.

4.7 Estudo clínico-molecular da série 6: distonia de início precoce e distonia familiar (n=21)

Nesse grupo, 21 pacientes apresentaram distonia generalizada precoce ou distonia familiar idiopática. A média de idade de início foi de 19,8 anos, com desvio-padrão de 12,3 anos. Oito pacientes eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino; 15 tinham história familiar positiva; três tiveram trauma relacionado ao membro distônico antes do início do quadro motor; e dois apresentaram comorbidades: um com síndrome nefrótica e outro com retardo mental (família de três irmãos acometidos e apenas um com retardo mental leve).

Foram estudadas cinco famílias: três com herança provavelmente autossômico-recessiva e duas com herança autossômico-dominante provável (FIG. 14).

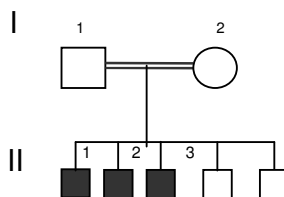


FIGURA 14 – Heredograma da família 9.

II. 1 Paciente de 32 anos de idade (janeiro de 2008), previamente hígido. Início dos sintomas aos 11 anos, com distúrbio de marcha secundária à distonia nos pés. Após dois anos, os sintomas evoluíram para alteração na deglutição, opistótono e importante retrocolo. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 96, com incapacidade de 26. Tratamento com anticolinérgicos, toxina botulínica e levodopa foi desapontador. Apresentava ao exame (outubro de 2007) quadro de distonia generalizada, sem sinais parkinsonianos ou piramidais.

II.2 Paciente de 35 anos de idade (janeiro de 2008). Leve retardo no desenvolvimento neuropsicomotor, com início da fala aos dois anos de idade. Os sintomas da doença tiveram início aos 12 anos, com adução das pernas durante a

marcha. Após um ano, os sintomas evoluíram para disfonia espasmódica, distonia oromandibular (riso sardônico), laterocolo e distonia em mãos (flexão dos dedos da mão direita). Ao exame neurológico, observou-se aumento dos reflexos tendinosos com clônus aquileu, além de distonia generalizada e bradicinesia. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 58, com incapacidade de 23. A bradicinesia apresentou pequena melhora com levodopa-carbidopa na dose de 375/37,5 mg ao dia (escore da parte III da UPDRS de 21 para 19). Os sintomas distônicos não sofreram melhora com anticolinérgicos (24 mg ao dia).

II.3 Paciente de 19 anos de idade (janeiro de 2008), com atraso moderado no desenvolvimento neuropsicomotor. Os sintomas começaram aos dois anos de idade, quando iniciou-se a marcha, já apresentando sinais sugestivos de espasticidade com inversão dos pés e flexão dos joelhos. Desde o início da vocalização, aos dois anos, a voz sempre foi ininteligível (caracterizada pelos pais como “estrangulada”). Em poucos anos, evoluiu com distonia generalizada, com envolvimento de tronco, membros superiores e musculatura orofacial. Os familiares referiram alguns episódios de agressividade. Ao exame (outubro de 2007), apresentava espasticidade, hiperreflexia (sem clônus) e bradicinesia. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 36, com incapacidade de 16. Os sintomas bradicinéticos tiveram apenas pequena melhora com a levodopa-carbidopa (375-37,5 mg ao dia), com mudança do escore da parte III da UPDRS de 21 para 19. Não havia tremor ou outro sinal parkinsoniano. Os sintomas distônicos não sofreram melhora com anticolinérgicos (24 mg ao dia).

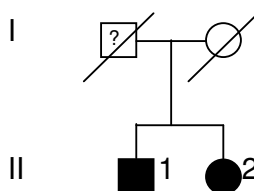


FIGURA 15 – Heredograma da família 10.

II.1 Paciente atualmente com 53 anos (janeiro de 2008). Iniciou os sintomas aos 20 anos de idade, com torção involuntária do pescoço com rotação para a direita. Evoluiu em 10 anos com dor, disartria, disfagia e generalização do quadro distônico, com envolvimento dos quatro membros e piora do quadro à marcha. Não havia comorbidades. O exame em outubro de 2007 mostrou laterocolo para a direita, retrocolo, flexão dos dedos e inversão dos braços, além de inversão dos pés e flexão dos joelhos. Não foram evidenciados sinais piramidais, cerebelares ou parkinsonianos. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 58, com incapacidade de 23. A terapêutica com levodopa-carbidopa (250/25 mg ao dia) e biperideno (16 mg ao dia) mostrou-se ineficaz.

II.2 Paciente de 45 anos em janeiro de 2008 iniciou os sintomas aos 18 anos com problemas na fala e na deglutição. Havia dificuldade para pronunciar determinadas palavras e a voz era estrangulada. Após aproximadamente um ano do surgimento dos sintomas, referiu movimento de torção involuntária do pescoço para a esquerda. Não havia comorbidades. Ao exame (em outubro de 2007) foram identificados um laterocolo para a esquerda, além da disfonia espasmódica em adução e movimentos coréicos e distônicos em mãos. Não havia sinais cerebelares, parkinsonianos ou piramidais ou distonia em membros. A terapêutica com levodopa-carbidopa (250/25 mg ao dia) e triexfenidil (15 mg ao dia) mostrou-se ineficaz.

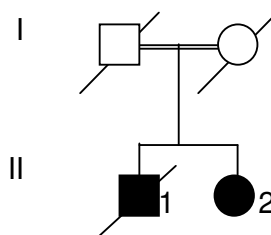


FIGURA 16 – Heredograma da família 11.

II.2 Paciente com 42 anos de idade (janeiro de 2008), seguida por 12 anos. Iniciou os sintomas aos sete anos, com dificuldade de escrita. Cinco anos após, desenvolveu alteração de marcha com extensão involuntária da perna esquerda,

seguida por envolvimento de membros superiores, tronco, face e voz. O irmão, hemofílico, apresentou os mesmos sintomas aos oito anos de idade e faleceu aos 34 anos de idade de pneumonia nosocomial. O exame neurológico da paciente em outubro de 2007 demonstrou riso sardônico, anartria, distonia orolingual com protusão de lábios e língua, escoliose com curvatura para esquerda, extensão dos punhos com flexão dos dedos, flexão dos joelhos e inversão dos pés. Os reflexos estavam hiperativos e não havia sinais parkinsonianos. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden era de 103, com incapacidade de 19. Levodopa-carbidopa (375/37,5 mg ao dia), baclofen (30 mg ao dia) e triexfenidil (20 mg ao dia) não surtiram efeito. Entretanto, injeções de toxina botulínica na região submentoniana resultaram em melhora dos sintomas de disfagia.

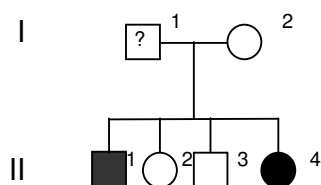


FIGURA 17 – Heredograma da família 12.

II.1 Paciente de 34 anos (janeiro de 2008), com início dos sintomas aos 21 anos, com alteração da fala caracterizada por estrangulamento da voz e dificuldade de deglutição. Em um ano, o quadro evoluiu para postura distônica em mão direita (rotação interna do braço, pronação do antebraço, flexão do punho), látero-tronco para a direita, laterocolo para a esquerda e joelhos valgus com rotação interna dos membros inferiores. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 66, com incapacidade de 19. Como houve progressão dos sintomas com dor e refratariedade a medicações (levodopa-carbidopa, 250/25 mg ao dia; biperideno, 12 mg ao dia; triexfenidil 15 mg ao dia e clonazepan 2 mg ao dia), nove anos após o início dos sintomas foi realizada palidotomia esquerda com melhora do quadro distônico à direita. Como houve ainda progressão dos sintomas à esquerda, após três anos da primeira cirurgia foi feita a palidotomia direita. O paciente evoluiu com pequena melhora dos sintomas e com anartria e

disfagia importantes. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden após a cirurgia foi de 52, com incapacidade de 13.

II.4 Paciente de 36 anos (janeiro de 2008) com início dos primeiros sintomas aos 30 anos. Refere quadro súbito de flexão dos dedos da mão direita e inversão do membro superior direito, principalmente à marcha, levando à dificuldade de escrita e coordenação. Concomitantemente, inicia alteração de voz caracterizada por estrangulamento e ocasional afonia. Tratamento com levodopa-carbidopa (375/37,5 mg ao dia) resultou em leve melhora da qualidade da voz. Após três anos do começo dos sintomas, apresentou torcicolo para a esquerda. O quadro estabilizou-se nos últimos três anos. Seu exame em outubro de 2007 foi caracterizado por distonia (escore objetivo na escala Burk-Fahn-Marsden de 24 pontos, com 10 pontos na parte de incapacidade). Não havia outras anormalidades ao exame tampouco comorbidades.

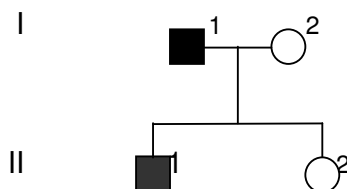


FIGURA 18 – Heredograma da família 13.

I.1 Paciente de 40 anos de idade (janeiro de 2008) notou o primeiro sintoma aos 35 anos, quando iniciou movimento anormal em flexão e lateralização do punho da mão direita. O sintoma não sofreu progressão. Não havia comorbidades. O exame neurológico não mostrou anormalidades, a não ser a distonia focal da mão. Negou-se a realizar tratamento medicamentoso.

II.1 Paciente atualmente com 12 anos (janeiro de 2008). Iniciou os sintomas aos sete anos após trauma do tipo torção com o pé direito. Após cinco dias do incidente, exibiu postura anormal do pé direito em inversão. Em um ano desenvolveu distonia no pé esquerdo, o qual apresentava padrão de inversão. À época também foi observada postura em desvio radial da mão direita. O exame

neuroológico de outubro de 2007 mostrou também escoliose importante, com curvatura para a direita. Não foram encontrados sinais cerebelares, parkinsonianos ou piramidais. O escore na parte objetiva da escala de Burk-Fahn-Marsden foi de 30. Não houve resposta à levodopa-carbidopa (500/50 mg ao dia), biperideno (24 mg ao dia) ou baclofeno (60 mg ao dia).

Nessas famílias foram testados os genes *DYT1* e *DYT12*, o primeiro por ser o mais comum causador de distonia primária; e o segundo por ser causador de distonia parkinsonismo de origem autossômico-dominante. Não foram testados os genes de *DYT3*, pela herança ligada ao X inexistente no grupo e pelo fato de *DYT3* ser exclusiva na população filipina; tampouco *DYT8* e *DYT11*, pela inexistência de coréia e mioclonia no grupo.

4.8 Análise genotípica pelo *Illumina*

Foram selecionados para o estudo genotípico (WGA) os pacientes com PIP (série 2) negativos para as mutações testadas e todas aquelas demais séries com provável herança recessiva, como mostra o QUADRO 11. Os indivíduos da série 2, a maioria deles com modo de herança incerto, foram incluídos também em estudos de associação com amostras de pacientes portadores de PIP de outras partes do mundo, com a finalidade de se obter uma amostra significativa do ponto de vista estatístico. Foram encontradas diversas alterações estruturais e traços de homozigose na série, entretanto, tais alterações foram tanto descritas em populações normais como também não houve replicação dos achados em mais de uma amostra (ANEXO A). Os indivíduos das demais séries foram selecionados para o mapa de autozigose (mapeamento de áreas de perda de heterozigose, ou seja; procura de traços de homozigose no genoma), já que todos eles foram incluídos com base em critérios de recessividade. Uma exceção foi a família 6 (padrão de herança autossômico-dominante), cujo objetivo foi tentar localizar anormalidades estruturais comuns no genoma dos indivíduos afetados.

QUADRO 11

Pacientes selecionados para o estudo genotípico

SÉRIE	IDENTIFICAÇÃO	FAMÍLIA	INÍCIO (ANOS)	HF
1	95	5	47	Irmãos (96, 106)
1	96	5	50	Irmãos (95, 106)
1	105	5	54	Irmãos (95 e 96)
2	15	---	30	Irmã (16)
2	16	---	38	Irmão (15)
2	17	---	33	Irmã (50)
2	50	---	33	Irmã (17)
2	39	---	38	Irmão (109)
2	109	---	33	Irmão (39)
2	20	---	32	Tios
2	27	---	39	Negativa
2	30	---	38	Irmãos
2	31	---	40	Negativa
2	33	---	36	Negativa
2	34	---	40	Negativa
2	36	---	35	Negativa
2	42	---	41	Negativa
2	44	---	38	Negativa
2	47	---	40	Negativa
2	55	---	40	Negativa
2	72	---	39	Negativa
2	73	---	29	Negativa
2	75	---	40	Negativa
2	77	---	32	Negativa
2	78	---	42	Negativa
2	79	---	28	Negativa
2	80	---	33	Negativa
2	100	---	20	Negativa
2	101	---	39	Negativa
2	102	---	33	Negativa
2	103	---	39	Negativa
2	104	---	37	Negativa
2	104	---	40	Negativa
2	107	---	28	Negativa
2	108	---	40	Negativa
2	110	---	31	Negativa
2	111	---	29	Negativa
2	113	---	33	Negativa
3	7	6	58	Filha (8), irmã (9) e sobrinho (10)
3	8	6	36	Mãe (7), tia (9) e primo (10)
3	9	6	38	Irmã (7), filho (10) e sobrinha (8)
3	10	6	40	Mãe (9)
3	11	7	11	Irmã (12) e tio (119)
3	12	7	2	Irmão (11) e tio (119)
3	119	7	18	Sobrinhos (11 e 12)
3	52	8	46	Irmã (53)
3	53	8	42	Irmã (53)
6	1	9	11	Irmãos (2 e 3)
6	2	9	12	Irmãos (1 e 3)
6	3	9	2	Irmãos (1 e 2)
6	4	12	22	Irmã (5)
6	5	12	30	Irmão (4)
6	13	10	33	Irmã (14)
6	14	10	35	Irmão (13)
6	61	11	7	Irmão.

Foi encontrado traço de homozigose comum no cromossomo 2 nos indivíduos afetados das famílias 7 e 9. Aparentemente, essas famílias não são relacionadas. A região era constituída de 1,2 Mb (FIG. 18). Os éxons codificantes da região, a saber, *OSBPL6*, *PRKRA*, *DFNB59*, *FKBP7*, *PLEKHA3*, *TTN*, *FLJ39502*, *SESTD1*, *LOC728984*, *LOC644776*, *ZNF533*, *LOC729001*, foram seqüenciados. Verificou-se uma mutação de ponto nunca anteriormente descrita no éxon 7 do gene *PRKRA*, uma troca homozigótica do nucleotídeo citosina por uma timidina na posição 665, gerando a substituição de prolina por leucina na posição 222 (FIG. 19). Os 426 controles portugueses, 83 controles brasileiros, 738 amostras da *Human Genome Diversity Project DNA panel* (incluindo 44 brasileiros), 249 norte-americanos com PIP da *NINDS neurogenetics repository* (<http://ccr.coriell.org/ninds/>), 45 pacientes brasileiros com PIP (série 2) e 12 brasileiros não relacionados portadores de distonia generalizada (série 6) foram negativos para a mutação homozigótica P222L em *PRKRA*.

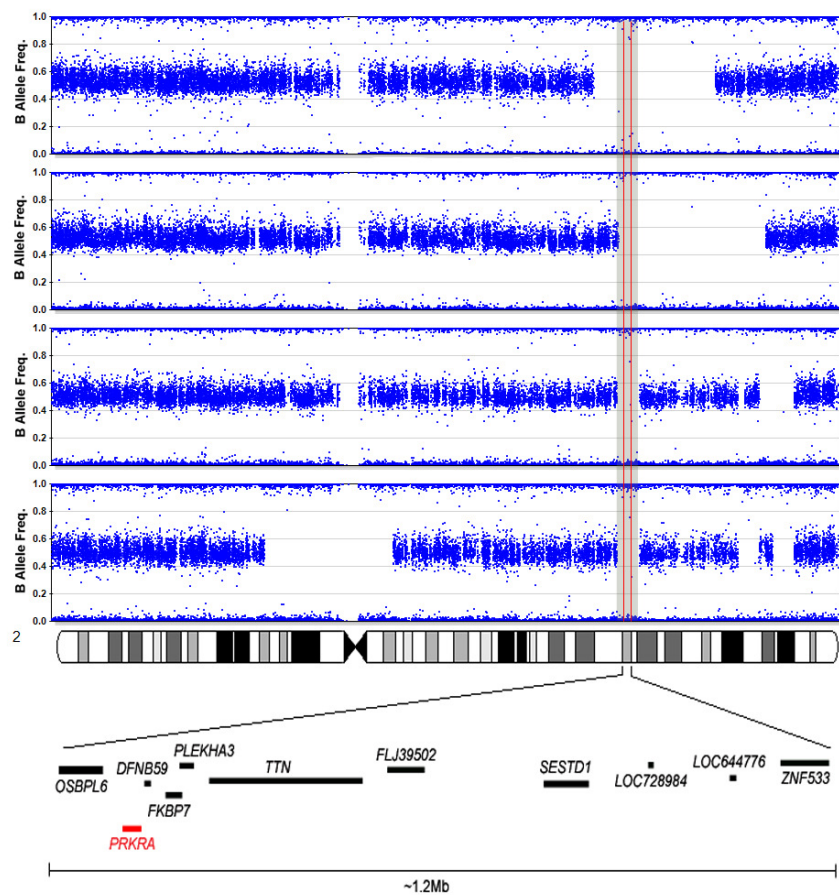


FIGURA 19 – Traço de homozigose comum entre duas famílias portadoras de distonia generalizada e provenientes de casamentos consangüíneos.

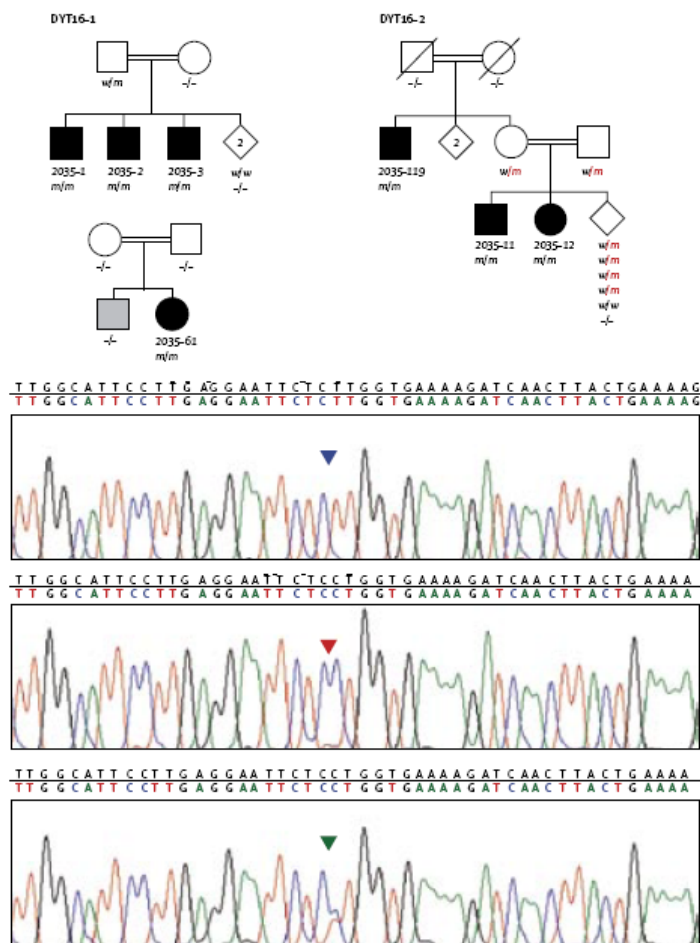


FIGURA 20 - Seqüenciamento de *PRKRA* mostrando o mutante em azul, o alelo normal em vermelho e o portador em verde.

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados demográficos da amostra

No período de junho de 2005 a junho de 2006, foram examinados, no Ambulatório de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da UFMG, 575 pacientes, entre os quais 226 preenchem os critérios para parkinsonismo (39%) e 191 tinham distonia (33%). Dos 226 casos de parkinsonismo, 198 foram diagnosticados como DP. Em um estudo anterior no mesmo ambulatório, foi identificada DP em 70% de 338 portadores de parkinsonismo, seguidos de 1993 a 1995 (CARDOSO; CAMARGOS; SILVA JÚNIOR, 1998). Nesse estudo foram também encontrados 13,3% de pacientes com diagnóstico de parkinsonismo induzido por drogas. Durante o ano de 2006, constataram-se 87,6% de pacientes com DP, com importante redução do número de parkinsonismo induzido por drogas (2,65%). Os diagnósticos de paralisia supranuclear progressiva, atrofia de múltiplos sistemas e parkinsonismo vascular não diferiram significativamente da série anterior. A diminuição da frequência de parkinsonismo induzido por drogas parece ser reflexo da diminuição do uso indiscriminado de bloqueadores dopaminérgicos. Tal dado não foi confirmado no estudo brasileiro de prevalências de parkinsonismo na cidade de Bambuí (Minas Gerais), no qual foi notificada prevalência de 3,3% para DP e 2,7% de parkinsonismo induzido por drogas para cada 100 habitantes acima de 64 anos (BARBOSA *et al.*, 2006).

Na presente casuística com DP (198 pacientes), 22,7% foram diagnosticados com PIP. Esse dado deve ser interpretado com cautela, uma vez que em centros terciários pode haver superestimação de pacientes menos típicos. Como exemplo, cita-se outro estudo populacional no qual foi diagnosticado PIP em 17% dos pacientes com parkinsonismo (DEKKER *et al.*, 2003). Prova da inferência da superestimação da incidência de PIP em centros terciários como o nosso é que a incidência populacional de DP estimada no estado de Minnesota, nos Estados Unidos, é de 0,8 caso em 100.000 por ano nos pacientes de zero a 29 anos; três por 100.000 em indivíduos de 30 a 49 anos; aumentando para 26,5 por 100.000/ano nos de 50 a 59 anos e 304,8 naqueles acima de 80 anos (BOWER *et al.*, 1999).

5.2 Estudo clínico-molecular da série 1

Na série 1 foram estudados oito pacientes com DP, provenientes de cinco famílias - quatro deles com padrão de herança provavelmente autossômico-dominante e quatro com herança provavelmente autossômico-recessiva. Com base no modo de herança, foram seqüenciados os genes *PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA* e dosados os éxons de *PRKN* e *SNCA*.

Não foi encontrada mutação ou alteração de dosagem em *SNCA*. Alterações neste gene são bastante raras, independentemente da idade dos pacientes. Considerando *SNCA* como uma causa rara de parkinsonismo, a frequência encontrada nesta pesquisa está de acordo com os achados de outros autores (JOHNSON *et al.*, 2004; KLEIN, 2006).

Não se encontraram mutações em *PRKN* ou *PINK1*. Embora haja casos de herança autossômico-recessiva compatível com alterações nos genes supracitados, tais mutações são mais comuns em grupos de início precoce.

Em relação ao gene *LRRK2*, não foi identificada a mutação G2019S, sabidamente a mais comum no referido gene (CLARK *et al.*, 2006b). Por outro lado, encontrou-se nova variante, a Q923H, localizada no éxon 21 em um paciente com DP clássica com padrão de herança autossômico-dominante. O cruzamento entre as espécies demonstrou alta conservação nesse códon e a variante não foi constatada em controles saudáveis. A glicina é aminoácido apolar e a histidina, polar básico. Tal fato associado aos supra citados corrobora mais ainda com a possibilidade de que a mutação Q923H exerça um efeito realmente patogênico. Diversas variantes têm sido descritas no gene *LRRK2* e em aproximadamente 16 delas há clara evidência de patogenicidade. Devido à baixa penetrância do gene, o efeito patogênico da maioria dessas variantes é incerto. Análise de segregação da mutação seria de grande importância na elucidação do papel dessa nova variante. Isto, infelizmente, não foi possível, uma vez que os pais da paciente e o irmão acometido já não eram vivos à época do estudo. Portanto, apesar de diversos fatores inferirem uma noção de patogenicidade dessa nova variante, seu

significado permanece, ainda, obscuro. Sabe-se que a frequência de mutações em *LRRK2* nos EUA (*Genetic Epidemiology of PD Study*) é de 1% nos casos esporádicos e 5% nos casos familiares (CLARK *et al.*, 2006b). Tal frequência justifica a realização do seqüenciamento dos 51 éxons de *LRRK2* apenas em casos familiares e não em todas as ocorrências de parkinsonismo.

Clinicamente, os pacientes mostraram-se com parkinsonismo clássico. Não houve característica fenotípica que pudesse distinguir pacientes com e sem mutações.

5.3 Estudo clínico-molecular da série 2

Na série 2 foram estudados 45 pacientes com PIP. História familiar positiva foi obtida em 24% dos casos. Em pacientes com DP, a frequência de história familiar positiva foi de 11,7%. Essa diferença é compatível com estudos recentes, que indicaram uma maior evidência de componente genético na etiopatogenia de PIP quando comparado com a DP. Payami *et al.* (2002) referenciaram risco relativo de 7,76 vezes em parentes de pacientes com início precoce e 2,95 nos de início tardio. Tanner *et al.* (1999) ressaltaram risco relativo de 1,39 de ocorrência de DP após os 50 anos em gêmeos mono e dizigóticos, ao passo que em PIP a concordância foi de 100% em gêmeos monozigóticos e o risco relativo foi de seis em gêmeos dizigóticos.

Seis indivíduos eram portadores de mutações nos genes *PRKN* (cinco pacientes - 11,1%) e no gene *PINK1* (um paciente - 2,2%). As mutações encontradas no gene *PRKN* foram anteriormente descritas (CLARK *et al.*, 2006a; KLEIN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006). A mutação em *PINK1* é inédita: trata-se de uma deleção homozigótica no éxon 7. A frequência de mutações na presente série é semelhante à de outras séries, como a de Clark *et al.* (2006a), que destacaram prevalência de 9,9% de mutações em *PRKN* entre 101 casos de PIP. Na série coreana de Chung *et al.* (2006), foram encontrados 5% de mutações em *PRKN* em 94 pacientes portadores de PIP, com nenhuma mutação em *PINK1*. Já Klein *et al.* (2005), em coorte italiana com 65 pacientes com PIP (62 casos esporádicos), evidenciaram mutações em 8% deles (cinco em *PRKN* e três em

PINK1). A taxa de mutação em pacientes esporádicos com PIP variou de 9 a 18% nos estudos Kann *et al.* (2002), Periquet *et al.* (2003) e Poorkaj *et al.* (2004). Em europeus com PIP, mutações em *PRKN* ocorrem em até 20% dos casos, enquanto em *PINK1* de 2 a 7%. Não há estudos brasileiros de prevalência de mutações em *PRKN* e *PINK1* em pacientes com PIP. A prevalência de mutações na presente investigação está de acordo com as séries anteriormente citadas. Apesar da maior prevalência de mutações em indivíduos com história familiar positiva e início precoce (CLARK *et al.*, 2006a), nenhum dos avaliados da presente pesquisa com PIP e história familiar positiva tinha mutações nos genes *PRKN* e *PINK1*.

O quadro clínico dos pacientes com e sem mutações não diferiu consistentemente. Não houve diferença clínica entre mutações heterozigóticas simples, compostas e sem mutação. O pequeno número de pacientes na amostra pode ser um fator limitante na interpretação dos dados. O fenótipo clínico de indivíduos com PIP é geralmente similar aos com início usual. No entanto, algumas características parecem agregar-se no grupo de início precoce quando comparado com o início tardio, tais como progressão mais lenta da doença e menor declínio cognitivo, além de complicações motoras precoces como distonia, discinesias e flutuações (SCHRAG; SCHOTT, 2006). Os pacientes avaliados tiveram o quadro clássico da doença com início precoce de distonia independentemente do tratamento, discinesia tardia, ausência de declínio cognitivo e progressão lenta da doença.

Ainda não é sabido se mutações em um único alelo participam do processo da doença. Dois levantamentos anteriores mostraram que mutações heterozigóticas únicas em *PRKN* são tão comuns em pacientes quanto em controles (KAY *et al.*, 2007; LINCOLN *et al.*, 2003). Tais dados não foram confirmados em uma terceira investigação (CLARK *et al.*, 2006a). Alguns fatos corroboram a hipótese de que mesmo sendo heterozigóticas em um único alelo, essas mutações têm alguma importância na etiologia da doença. Autores mostraram alterações parkinsonianas sutis em indivíduos anteriormente considerados assintomáticos (HEDRICH *et al.*, 2006; HILLER *et al.*, 2007; PRAMSTALLER *et al.*, 2005). Avaliações com tomografia por emissão de pósitrons enfatizaram redução de recaptção de F-

dopa no estriado de pacientes com mutação única em *PRKN* (HILKER *et al.*, 2001) e *PINK1* (KHAN *et al.*, 2002) quando comparados com controles. Algumas hipóteses justificam a associação de parkinsonismo em pacientes com mutações heterozigóticas simples: haploinsuficiência, efeito dominante negativo, fator genético associado a fator ambiental ou mesmo outra causa hereditária (KHAN *et al.*, 2002; PRAMSTALLER *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006). Entendendo-se que a frequência de mutações nos genes recessivos (*PRKN* e *PINKK1*) é maior no grupo com PIP, é possível que, de alguma forma, tais mutações influenciem na idade de início dos sintomas.

5.4 Estudo clínico-molecular da série 3

Na série 3 foram estudados pacientes de uma mesma família com fenótipos de distonia e parkinsonismo em indivíduos distintos.

A variabilidade fenotípica intrafamiliar tem sido descrita em diversas doenças hereditárias, como rins policísticos, epilepsia, ataxias espino-cerebelares, atrofia muscular espinhal, demência fronto-temporal e muitas outras (HARDING, 1982; PARANO *et al.*, 1996; PICARD *et al.*, 2000). Há diversas hipóteses para a elucidação do fenômeno - em alguns casos genes modificadores estão envolvidos no processo, assim como a herança multigênica, fatores ambientais e *imprinting*.

As famílias avaliadas na série apresentaram padrão de herança dominante (uma) e também recessiva (duas). Em uma mesma família foi observado fenótipo puro de distonia em um membro e de parkinsonismo em outro membro (famílias 6 e 8). Já na família 7 foi observado fenótipo misto de distonia parkinsonismo. Foram testados os genes conhecidos comumente causadores de PIP, DP e distonia. Em nenhum deles foram encontradas mutações. Em uma família (a 7), porém, foi possível encontrar o novo gene causador da doença (vide 5.8). Uma explicação plausível para os casos negativos para mutações estudadas seria a existência de novos genes ainda não descritos ou mesmo genes não testados. Não pode também ser descartada a possibilidade de genes modificadores, além da influência de fatores ambientais.

5.5 Estudo clínico-molecular da série 4

Segundo dados de revisão bibliográfica, este é o primeiro estudo molecular de pacientes brasileiros com distonia responsiva a dopamina. Foi identificado um heterozigoto composto em uma família (M211V e K224R) de dois irmãos em *trans* (cada alelo portador de uma única mutação). A mutação M211V foi primeiramente descrita por Bandmann *et al.* (1998) como mutação homozigótica em paciente com fenilcetonúria atípica. A mutação K224R foi descrita em vários indivíduos com as mais diversas apresentações, incluindo coréia mimetizando paralisia cerebral, distonia mioclônica, parkinsonismo e distonia dopa-responsiva (BANDMANN *et al.*, 1996a; FURUKAWA *et al.*, 1998; GARAVAGLIA *et al.*, 2004; LEUZZI *et al.*, 2002). A mutação K224R também foi encontrada em heterozigose composta com a mutação G108N (FURUKAWA *et al.*, 1998). Essas duas mutações foram descritas anteriormente ora como mutação homozigótica, ora como heterozigose composta, mas não na combinação encontrada. Os pacientes com a mutação em heterozigose composta (M211V e K224R) apresentaram forma típica e grave de distonia dopa-responsiva.

Descreveu-se uma nova mutação heterozigótica no gene *GCH1*, T209P, em duas famílias não correlatas. A ausência da variante em 368 controles, além da conservação do resíduo entre as espécies e a segregação da mutação na família, são fatores que corroboram a possibilidade de que a mesma seja variante patogênica. Em todos os casos, os pais dos pacientes foram examinados e não tinham sintomas, o que pode refletir a penetrância reduzida do gene ou o requerimento, em alguns casos, de dois alelos mutantes para causar a doença. Todos os casos, incluindo os negativos, tiveram boa e sustentada resposta com a terapia com levodopa e ausência de discinesias.

Em 57% dos pacientes com distonia dopa-responsiva foram encontradas mutações em *GCH1*. Tal prevalência parece similar em outros estudos. Bandmann *et al.* (1996b) referiram prevalência de 57%. Em outra avaliação, Bandmann *et al.* (1998) revelaram 42% de mutações em 30 pacientes, 20 com diagnóstico clinicamente definido de distonia dopa-responsiva, 10 com

diagnóstico possível e um com fenilcetonúria atípica. Hagenah *et al.* (2005) detectaram mutações em 87% de pacientes com distonia dopa-responsiva. Klein *et al.* (2002) afirmaram que a dosagem de éxons é importante para a detecção de mutações em casos negativos. Excluíram-se na presente casuística duplicações e deleções de éxons, realizando-se o *Illumina*TM nos pacientes negativos para mutações em *GCH1*. A ocorrência de distonia dopa-responsiva sem mutações em *GCH1* sugere outra causa-base indetectável por seqüenciamento para explicar a doença, um outro *locus* (como o da *Tirosina Hidroxilase* por exemplo) ou mesmo causa não genética para a enfermidade (HAGENAH *et al.*, 2005; KLEIN *et al.*, 2002).

5.6 Estudo clínico-molecular da série 5

Na série 5, foram estudados quatro pacientes com quadro clássico de neurodegeneração com acúmulo cerebral de ferro ou a anteriormente denominada doença de Hallervorden Spatz. O termo Hallervorden Spatz está atualmente em desuso e refere-se a práticas não ortodoxas dos médicos alemães Hallervorden e Spatz durante a Segunda Guerra Mundial. Durante o terceiro *Reich*, Hallervorden e Spatz participaram da implementação de “soluções biológicas”, como, por exemplo, a eutanásia. O programa nazista da eutanásia trouxe oportunidade científica para o rápido acesso a material patogênico, o que foi prontamente utilizado pelos cientistas e resultou em diversos artigos científicos no pós-guerra (SHEVELL; PEIFFER, 2001).

À exceção de uma paciente, todos os demais avaliados tinham o fenótipo progressivo de distonia, disartria, rigidez, coréia, crises convulsivas e parkinsonismo (menos freqüente), além da evidência por métodos de imagem do acúmulo de ferro nos núcleos da base. Os indivíduos com o fenótipo típico e imagem característica sempre possuíam mutações no gene *PANK2*; uma porcentagem de casos (um terço) com doença atípica, início tardio e progressão lenta tinha mutações em *PANK2* (HAYFLICK *et al.*, 2003). Valentino *et al.* (2006) acompanharam uma paciente com sinais e imagem (olho do tigre) clássicos da doença sem mutações em *PANK2*. Além do seqüenciamento, os autores usaram

marcadores na região de *PANK2* que excluíram ligação com esse *locus*. O presente estudo não identificou mutações nos pacientes típicos e com imagem típica. Entretanto, não foram realizadas avaliações de ligação ou dosagem dos éxons de *PANK2* a fim de excluir ligação com esse *locus*. A mutação aqui descrita em uma paciente com quadro considerado atípico e com imagem típica foi também relatada por Hayflick *et al.* (2003) em três indivíduos com início tardio e quadro lentamente progressivo. A idade de início desta paciente foi compatível com a média de idade de início dos atípicos mencionados por Hayflick *et al.* (2003). Os dados clínicos deste estudo em pacientes com quadro atípico mostraram rigidez, alteração de marcha com congelamento, hiperreflexia, distúrbios psiquiátricos e principalmente distúrbio de fala com disartria. A paciente da presente investigação com a mutação N294I também exibiu quadro atípico compatível com a pesquisa supracitada, com evolução lenta de distonia, parkinsonismo, hiperreflexia, distúrbio de marcha e disfonia espasmódica. Apresentou também episódios de festinação da marcha, dado até então não descrito na literatura em pacientes portadores de mutação em *PANK2*.

5.7 Estudo clínico-molecular da série 6

Foram estudados 21 pacientes com quadro de distonia generalizada precoce ou distonia familiar idiopática. Entre eles, havia cinco famílias, duas com padrão provável de herança autossômico-dominante e três com padrão de herança provavelmente autossômico-recessiva. Excetuando-se os casos de padrão de herança autossômico-recessiva, todos os outros eram clinicamente compatíveis com mutações em *DYT1*: início precoce de distonia focal (usualmente distonia de ação em pés) evoluindo, na maioria das vezes, para distonia generalizada (TARSY; SIMON, 2006). Devido à baixa penetrância do gene, alguns episódios considerados esporádicos podem ser, na verdade, familiares sem a expressão fenotípica na geração anterior. Não se encontrou paciente com mutação em *DYT1* ou *DYT13*.

Hjermind, Werdelin e Sorensen (2002) estimaram a prevalência de mutações em *DYT1* em 107 pacientes não correlatos com distonia primária de torção na

Dinamarca em 2,8%; ou 15% dos casos com início precoce de distonia em membro com generalização posterior. Essa prevalência está de acordo com os achados em pacientes europeus - 14,6% (VALENTE *et al.*, 1998). Por outro lado, existem alguns grupos que não identificaram pacientes com distonia primária de torção e mutações em *DYT1* (JAMORA *et al.*, 2006 com pacientes em Singapura e NAIYA *et al.*, 2006 com pacientes indianos). O reduzido número de pacientes na presente amostra não permite concluir que *DYT1* é incomum na nossa população.

As famílias 9 e 11 (padrão de herança autossômico-recessiva) foram avaliadas com estudos de genotipagem. Um novo gene foi então encontrado e descrito (vide item 5.8).

5.8 Análise genotípica pelo *Illumina*TM

O *Illumina*TM é um sistema altamente eficiente, com boa relação custo-efetividade para genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo ao longo de todo o DNA cromossômico por amostra de DNA e um único *chip*. Com o sistema, é possível fazer estudos de associação do genoma, assim como de perda de heterozigose e número de cópias, promovendo alta cobertura genômica.

Os estudos de *Genome wide single nucleotide polymorphism association* (GW-SNP) são hoje oferecidos principalmente por duas companhias: a *Affymetrix* e a *Illumina*. O método oferece grande potencial localizador de variações genéticas causadoras de doenças. Os fatores limitantes são o preço e a necessidade de significativa amostra (na ordem de pelo menos 1.000 controles e 1.000 afetados, a depender também de outras variáveis, como frequência da doença na população) para obter-se poder estatístico. Outra aplicação do método é a análise de traços de homozigose. Os traços de homozigose são importantes particularmente nas doenças autossômico-recessivas e na suspeita de consangüinidade. O método permite mapear essas regiões com alta resolução e cobertura genômica completa em curto período de tempo. Nas famílias em que os afetados apresentam baixo nível de consangüinidade ou quando há separação clara entre os membros afetados, o tamanho da região segregadora da doença é

menor. Nessa circunstância, a alta resolução do GW-SNP oferece expressiva vantagem sobre o tradicional estudo de ligação (GIBBS; SINGLETON, 2006). Além dessas aplicações, há ainda a análise de alterações estruturais no genoma como regiões duplicadas e deletadas em seus respectivos cromossomos.

A partir do GW-SNP foram avaliados pacientes com PIP negativos para mutações em *PRKN* e *PINK1*. Nenhum SNP estatisticamente relevante relacionado com a doença foi encontrado, nem mesmo alterações estruturais relevantes e replicáveis na presente amostra (mesmo ao se associar a amostras provenientes de outros sítios). Provavelmente, o número de indivíduos requeridos para a associação seja maior, a fim de detectar-se possível variante relacionada à doença. Segundo recentes dados da literatura, os estudos de GW-SNP têm poder para detectar o *locus* de uma doença com risco moderado a partir da amostra calculada de 1.000 casos e 1.000 controles; para a doença de risco baixo, a amostra calculada é da ordem de 10.000 casos e 10.000 controles (EBERLE *et al.*, 2007).

Pelo mapa de autozigose com alta densidade de SNP (GW-SNP), detectou-se uma região de homozigose segregadora da doença idêntica por estado (alelos aa ou alelos bb) de 274 SNPs e 1,16 Mb de extensão em seis indivíduos afetados e frutos de casamentos consangüíneos de duas famílias (famílias 7 e 9) e um caso “esporádico” (família 11). Não se considerou o caso verdadeiramente esporádico, uma vez que a paciente era também fruto de casamento consangüíneo e tinha um irmão suspeito de estar acometido pela mesma doença. Como os pais e o irmão provavelmente doente não foram examinados por terem falecido anteriormente à descoberta, a assertiva três famílias é também inadequada. As duas famílias eram aparentemente não correlatas e as cidades de origem situavam-se com distância de aproximadamente 350 quilômetros entre elas (Bom Despacho e Dores de Guanhões). A identificação de tal região segregadora da doença em uma doença bastante rara sugeria fortemente que a mutação genética residia nessa região. Após essa primeira etapa de localização genômica em uma região específica do DNA, seguiu-se a segunda etapa de seqüenciamento dos genes dessa região à procura de mutações em regiões codificadoras de proteína.

O seqüenciamento da região mostrou a mutação P222L no éxon 7 do gene *PRKRA*. Descreveu-se, então, uma nova distonia autossômico-recessiva em pacientes com síndrome distonia–parkinsonismo (distonia *plus*) em famílias brasileiras, a qual foi chamada de *DYT16*. Não foi examinada a região não codificadora ou áreas regulatórias nessas famílias, de forma que não se puderam excluir variantes não codificadoras (mutações em regiões intrônicas ou rearranjo de éxons) como causa da doença. A variante poderia não ser patogênica e estar em desequilíbrio de ligação com a doença. Entretanto, a ausência da variante P222L em homozigose em uma coorte ampla, de 1.247 controles saudáveis e 294 pacientes com PIP, fortalece a hipótese de que tal variante é a causadora da doença nas famílias. A suposição é também baseada no fato de que nenhuma região segregadora de mutação foi identificada em 457 éxons da região de homozigose comum. Os achados foram publicados na edição de março de 2008 do periódico “*Lancet Neurology*” sob o título “*DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA*” (APÊNDICE B). O artigo foi merecedor do editorial no mesmo periódico intitulado: “*DYT16: a new twist to familial dystonia*” (APÊNDICE B).

Não está claro o mecanismo pelo qual a substituição do nucleotídeo citosina na posição 665 para timidina no gene *PRKRA* resulta em patogenicidade. *PRKRA* codifica uma proteína quinase de indução de interferon dependente de ativador de RNA de dupla-fita e ativa a quinase latente PKR no caso de estresse extracelular (PATEL *et al.*, 2000). A PKR é uma proteína relacionada à transdução de sinal, diferenciação celular, proliferação celular, resposta antiviral e apoptose (PATEL *et al.*, 2000). Importante salientar, entretanto, que apesar do papel do gene na imunidade, não há evidência clínica de alteração imune nos pacientes do presente trabalho. Acredita-se, ainda, que a PKR inativa o fator de iniciação da translação 2 α (EIF2 α), o qual inibe a síntese protéica (D'ACQUISTO; GHOSH, 2001). *PRKRA* é um componente do complexo de indução de silenciamento de RNA, o qual regula a síntese protéica via clivagem do RNA mensageiro - mRNA (LEE *et al.*, 2006). A mutação P222L altera um aminoácido que é conservado entre as espécies em um resíduo entre o segundo e o terceiro motivo ligado ao RNA. A mutação pode, então, causar alteração na proteína e/ou alterar a

afinidade pelo substrato. Infelizmente, a estrutura da proteína (ou de outras relacionadas) estudada por cristalografia ainda não está disponível, de forma que ainda não se pode inferir alguma predição real do efeito mutante na conformação protéica ou na sua função.

Clinicamente, a recém-caracterizada *DYT16* deverá ser suspeitada no caso de famílias com padrão de herança recessiva com distonia generalizada e envolvimento da musculatura do pescoço e tronco mais pronunciado do que dos membros. Outras alterações comuns são o acometimento oromandibular com riso sardônico e distonia laríngea, além de parkinsonismo, embora o último seja menos importante do que os sinais distônicos. A resposta a tratamento anticolinérgico ou à levodopa é desapontadora. Alguns dados permitem diferenciar *DYT16* das outras *DYTs*. A *DYT1* tem acometimento inicial de membros que, na maioria das vezes, evolui rapidamente para outros membros e tronco; é também uma distonia pura, sem sinais parkinsonianos e padrão de herança autossômico-dominante (embora a penetrância reduzida possa mimetizar padrão recessivo). A ausência de resposta à levodopa, mioclonias e responsividade ao álcool diferencia a *DYT16* da *DYT5* e *DYT11*, respectivamente. Há melhora ocasional com anticolinérgico. Há ainda algumas similaridades entre *DYT16* e *DYT12*, como sinais bulbares proeminentes e gradiente rostro-caudal. No entanto, a *DYT12* tem início abrupto e padrão de herança autossômico-dominante. A *DYT16* pode ser facilmente distinguível dos *loci PARK* associados a parkinsonismo e distonia, como *PARK2* e *PARK9*. A distonia observada nessas doenças é usualmente focal e não progride para distonia generalizada, além do que os pacientes com mutações em *PRKN* (*PARK2*) respondem bem à levodopa. A *PARK9* está associada à demência e à paralisia supranuclear, ambas ausentes em *DYT16*.

6 CONCLUSÕES

- Causas hereditárias puderam ser identificadas em 18,8% dos casos de distonia e parkinsonismo familiares e de início precoce na presente série (n=96).
- Foram encontradas mutações novas nos genes *PINK1*, *LRRK2* e *CGH1* (parkinsonismo de início precoce, parkinsonismo familiar e distonia de início precoce), além de mutações anteriormente descritas em *PRKN*, *GCH1* e *PANK2* (parkinsonismo de início precoce e distonia de início precoce).
- Em duas famílias com quadro clínico de distonia e parkinsonismo negativos para as mutações conhecidas, foi então, identificado um novo gene causador de distonia, o DYT16, o primeiro com transmissão autossômico-recessiva.

REFERÊNCIAS

AHARON-PERETZ, J.; ROSENBAUM, H.; GERSHONI-BARUCH, R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. **N Engl J Med**, v.351, n.19, p.1972-7, Nov 4, 2004.

ASMUS, F. *et al.* Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype. **Ann Neurol**, v.52, n.4, p.489-92, Oct, 2002.

BANDMANN, O. *et al.* Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. **Hum Mol Genet**, v.5, n.3, p.403-6, Mar, 1996a

BANDMANN, O. *et al.* The GTP-cyclohydrolase I gene in atypical parkinsonian patients: a clinico-genetic study. **J Neurol Sci**, v.141, n.1-2, p.27-32, Sep 15, 1996b.

BANDMANN, O. *et al.* Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. **Ann Neurol**, v.44, n.4, p.649-56, Oct, 1998.

BARBOSA, M.T. *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov Disord**, v.21, n.6, p.800-8, Jun, 2006.

BETARBET, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, v.3, n.12, p.1301-6, Dec, 2000.

BONIFATI, V. *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v.299, n.5604, p.256-9, Jan 10, 2003.

BOWER, J.H. *et al.* Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. **Neurology**, v.52, n.6, p.1214-20, Apr 12, 1999.

BRASHEAR, A. *et al.* The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the ATP1A3 gene. **Brain**, v.130, n.Pt 3, p.828-35, Mar, 2007.

BRESSMAN, S.B. *et al.* The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. **Neurology**, v.54, n.9, p.1746-52, May 9, 2000.

BRICE, A. Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. **Brain**, v.128, n.Pt 12, p.2760-2, Dec, 2005.

BRUNO, M.K. *et al.* Genotype-phenotype correlation of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. **Neurology**, v.68, n.21, p.1782-9, May 22, 2007.

BURK, R.E. *et al.* Validity and reliability of a rating scale for the primary torsion dystonias. **Neurology**, v.35, n.1, p.73-7, Jan, 1985.

CARDOSO, F.; CAMARGOS, S.T.; SILVA JÚNIOR, G.A. Etiology of parkinsonism in a Brazilian movement disorders clinic. **Arq Neuropsiquiatr**, v.56, n.2, p.171-5, Jun, 1998.

CHINOPOULOS, C.; ADAM-VIZI, V. Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**, v.76, n.1, p.302-6, Jan, 2001.

CHUNG, E.J. *et al.* Clinical features and gene analysis in Korean patients with early-onset Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.63, n.8, p.1170-4, Aug, 2006.

CLARK, L.N. *et al.* Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.63, n.4, p.548-52, Apr, 2006a.

CLARK, L.N. *et al.* Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease. **Neurology**, v.67, n.10, p.1786-91, Nov 28, 2006b.

CORRIEL INSTITUTE FOR GENOME RESEARCH: **NINDS** Human Genetics DNA and Cell Line Repository (Acessado em 15 de dezembro de 2007, <http://ccr.coriell.org/ninds/>).

D'ACQUISTO, F.; GHOSH, S. PACT and PKR: turning on NF-kappa B in the absence of virus. **Sci STKE**, v.2001, n.89, p.RE1, Jul 3, 2001.

DANIEL, S.E.; LEES, A.J. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. **J Neural Transm Suppl**, v.39, p.165-72, 1993.

DE CARVALHO AGUIAR, P. *et al.* Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. **Neuron**, v.43, n.2, p.169-75, Jul 22, 2004.

DEFAZIO, G. *et al.* Epidemiology of primary dystonia. **Lancet Neurol**, v.3, n.11, p.673-8, Nov, 2004.

DEKKER, M.C. *et al.* A clinical-genetic study of Parkinson's disease in a genetically isolated community. **J Neurol**, v.250, n.9, p.1056-62, Sep, 2003.

DEMIRKIRAN, M.; JANKOVIC, J. Paroxysmal dyskinesias: clinical features and classification. **Ann Neurol**, v.38, n.4, p.571-9, Oct, 1995.

DI FONZO, A. *et al.* A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. **Lancet**, v.365, n.9457, p.412-5, Jan 29-Feb 4, 2005.

DI FONZO, A. *et al.* ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. **Neurology**, v.68, n.19, p.1557-62, May 8, 2007.

DOBYNS, W.B. *et al.* Rapid-onset dystonia-parkinsonism. **Neurology**, v.43, n.12, p.2596-602, Dec, 1993.

EBERLE, M.A. *et al.* Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. **PLoS Genet**, v.3, n.10, p.1827-37, Oct, 2007.

ENSEMBL: European Bioinformatics Institute (EBI): **Bioinformatician**. (Acessado em 15 de dezembro de 2007, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html).

FAHN, S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. **Ann N Y Acad Sci**, v.991, p.1-14, Jun, 2003.

FAHN, S.; BRESSMAN, S.B.; MARSDEN, C.D. Classification of Dystonia. *In*: FAHN, S.; MARSDEN, C.D.; DELONG, M.R. (Ed.). **Dystonia 3**. Philadelphia: Lippincott-Raven, p.1-10, 1998.

FAHN, S.; ELTON, R.L. The UPDRS development Committee. Unified Parkinson disease rating scale. *In*: FAHN, S.; MARSDEN, C.D.; CALNE, D.B. eds. **Recent developments in Parkinson's disease**. Floral Park. NJ: Macmillan, p.293-304, 1987.

FARRER, M. *et al.* A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. **Hum Mol Genet**, v.8, n.1, p.81-5, Jan, 1999.

FARRER, M. *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. **Ann Neurol**, v.50, n.3, p.293-300, Sep, 2001.

FARRER, M.J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. **Nat Rev Genet**, v.7, n.4, p.306-18, Apr, 2006.

FLETCHER, N.A.; HARDING, A.E.; MARSDEN, C.D. A genetic study of idiopathic torsion dystonia in the United Kingdom. **Brain**, v.113 (Pt 2), p.379-95, Apr, 1990.

FOUAD, G.T. *et al.* A gene for familial paroxysmal dyskinesia (FPD1) maps to chromosome 2q. **Am J Hum Genet**, v.59, n.1, p.135-9, Jul, 1996.

FUCHS, J. *et al.* Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. **Neurology**, v.68, n.12, p.916-22, Mar 20, 2007.

FURUKAWA, Y. *et al.* Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. **Ann Neurol**, v.44, n.1, p.10-6, Jul, 1998.

GARAVAGLIA, B. *et al.* GTP-cyclohydrolase I gene mutations in patients with autosomal dominant and recessive GTP-CH1 deficiency: identification and functional characterization of four novel mutations. **J Inherit Metab Dis**, v.27, n.4, p.455-63, 2004.

GEYER, H.L.; BRESSMAN, S.B. The diagnosis of dystonia. **Lancet Neurol**, v.5, n.9, p.780-90, Sep, 2006.

GIBBS, J.R. SINGLETON, A. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. **PLoS Genet**, v.2, n.10, p.e150, Oct 6, 2006.

GOLDWURM, S. *et al.* The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. **J Med Genet**, v.42, n.11, p.e65, Nov, 2005.

GOODCHILD, R.E.; KIM, C.E.; DAUER, W.T. Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. **Neuron**, v.48, n.6, p.923-32, Dec 22, 2005.

GORELL, J.M. *et al.* The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology**, v.50, n.5, p.1346-50, May, 1998.

GOTO, S. *et al.* Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. **Ann Neurol**, v.58, n.1, p.7-17, Jul, 2005.

GOWERS, W.R.. **A manual of diseases of the nervous system**. Vol. I. Diseases of the nerves and spinal cord. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Co, 1900.

GRAEBER, M.B.; KUPKE, K.G.; MULLER, U. Delineation of the dystonia-parkinsonism syndrome locus in Xq13. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.17, p.8245-8, Sep 1, 1992.

GWINN-HARDY, K.*et al.* Distinctive neuropathology revealed by alpha-synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p. **Acta Neuropathol**, v.99, n.6, p.663-72, Jun, 2000.

HAGENAH, J. *et al.* High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. **Neurology**, v.64, n.5, p.908-11, Mar 8, 2005.

HALLIWELL, B.; JENNER, P. Impaired clearance of oxidised proteins in neurodegenerative diseases. **Lancet**, v.351, n.9114, p.1510, May 16, 1998.

HAPMAP: **International HapMap Project**, 2002. (Acessado em 15 de dezembro de 2007 <http://www.hapmap.org/>).

HARDING, A.E. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the "Drew family of Walworth". **Brain**, v.105, n.Pt 1, p.1-28, Mar, 1982.

HARDY, J. *et al.* Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. **Ann Neurol**, v.60, n.4, p.389-98, Oct, 2006.

HAYFLICK, S.J. *et al.* Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. **N Engl J Med**, v.348, n.1, p.33-40, Jan 2, 2003.

HEDRICH, K. *et al.* Clinical spectrum of homozygous and heterozygous PINK1 mutations in a large German family with Parkinson disease: role of a single hit? **Arch Neurol**, v.63, n.6, p.833-8, Jun, 2006.

HILKER, R. *et al.* Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. **Ann Neurol**, v.49, n.3, p.367-76, Mar, 2001.

HILLER, A. *et al.* Phenotypic spectrum of PINK1-associated parkinsonism in 15 mutation carriers from 1 family. **Mov Disord**, v.22, n.1, p.145-7, Jan, 2007.

HJERMIND, L.E.; WERDELIN, L.M.; SORENSEN, S.A. Inherited and de novo mutations in sporadic cases of DYT1-dystonia. **Eur J Hum Genet**, v.10, n.3, p.213-6, Mar, 2002.

ICHINOSE, H. *et al.* Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. **Nat Genet**, v.8, n.3, p.236-42, Nov, 1994.

ILLUMINA: San Diego, Ca. (Acessado em 15 de dezembro de 2007, <http://www.illumina.com/>).

ISHIHARA, L. *et al.* Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. **Arch Neurol**, v.63, n.9, p.1250-4, Sep, 2006.

JAMORA, R.D. *et al.* DYT1 mutations amongst adult primary dystonia patients in Singapore with review of literature comparing East and West. **J Neurol Sci**, v.247, n.1, p.35-7, Aug 15, 2006.

JOHNSON, J. *et al.* SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with Lewy bodies. **Neurology**, v.63, n.3, p.554-6, Aug 10, 2004.

KABAKCI, K. *et al.* Mutations in DYT1: extension of the phenotypic and mutational spectrum. **Neurology**, v.62, n.3, p.395-400, Feb 10, 2004.

KACHERGUS, J. *et al.* Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. **Am J Hum Genet**, v.76, n.4, p.672-80, Apr, 2005.

KANN, M. *et al.* Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v.51, n.5, p.621-5, May, 2002.

KAY, D.M. *et al.* Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the LRRK2 G2019S mutation. **Mov Disord**, v.20, n.8, p.1077-8, Aug, 2005.

KAY, D.M. *et al.* Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. **Ann Neurol**, v.61, n.1, p.47-54, Jan, 2007.

KHAN, N.L. *et al.* Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study. **Ann Neurol**, v.52, n.6, p.849-53, Dec, 2002.

KITADA, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v.392, n.6676, p.605-8, Apr 9, 1998.

KLEIN, C. *et al.* Exon deletions in the GCHI gene in two of four Turkish families with dopa-responsive dystonia. **Neurology**, v.59, n.11, p.1783-6, Dec 10, 2002.

KLEIN, C. *et al.* PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. **Eur J Hum Genet**, v.13, n.9, p.1086-93, Sep, 2005.

KLEIN, C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.63, n.3, p.328-34, Mar, 2006.

KLEIN, C.; SCHLOSSMACHER, M.G. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. **Neurology**, v.69, n.22, p.2093-104, Nov 27, 2007.

KRAMER, P.L. *et al.* Rapid-onset dystonia-parkinsonism: linkage to chromosome 19q13. **Ann Neurol**, v.46, n.2, p.176-82, Aug, 1999.

KRUGER, R. *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, v.18, n.2, p.106-8, Feb, 1998.

KUPKE, K.G. *et al.* X-linked recessive torsion dystonia in the Philippines. **Am J Med Genet**, v.36, n.2, p.237-42, Jun, 1990.

KUPKE, K.G.; LEE, L.V.; MULLER, U. Assignment of the X-linked torsion dystonia gene to Xq21 by linkage analysis. **Neurology**, v.40, n.9, p.1438-42, Sep, 1990.

KYLLERMAN, M. *et al.* Alcohol-responsive myoclonic dystonia in a large family: dominant inheritance and phenotypic variation. **Mov Disord**, v.5, n.4, p.270-9, 1990.

LANGSTON, J.W. *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v.219, n.4587, p.979-80, Feb 25, 1983.

LEE, L.V. *et al.* Torsion dystonia in Panay, Philippines. **Adv Neurol**, v.14, p.137-51, 1976.

LEE, H.Y. *et al.* The gene for paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia encodes an enzyme in a stress response pathway. **Hum Mol Genet**, v.13, n.24, p.3161-70, Dec 15, 2004.

LEE, H.Y. *et al.* The role of PACT in the RNA silencing pathway. **Embo J**, v.25, n.3, p.522-32, Feb 8, 2006.

LEES, A.J.; SINGLETON, A.B. Clinical heterogeneity of ATP13A2 linked disease (Kufor-Rakeb) justifies a PARK designation. **Neurology**, v.68, n.19, p.1553-4, May 8, 2007.

LEROY, E. *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, v.395, n.6701, p.451-2, Oct 1, 1998.

LESAGE, S. *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. **N Engl J Med**, v.354, n.4, p.422-3, Jan 26, 2006.

LEUNG, J.C. *et al.* Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. **Neurogenetics**, v.3, n.3, p.133-43, Jul, 2001.

LEUZZI, V. *et al.* Autosomal dominant GTP-CH deficiency presenting as a dopa-responsive myoclonus-dystonia syndrome. **Neurology**, v.59, n.8, p.1241-3, Oct 22, 2002.

LINCOLN, S.J. *et al.* Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. **Mov Disord**, v.18, n.11, p.1306-11, Nov, 2003.

LOCKHART, P.J. *et al.* DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. **J Med Genet**, v.41, n.3, p.e22, Mar, 2004.

MAHLOUDDJI, M.; PIKIELNY, R.T. Hereditary essential myoclonus. **Brain**, v.90, n.3, p.669-74, Sep, 1967.

MAKINO, S. *et al.* Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. **Am J Hum Genet**, v.80, n.3, p.393-406, Mar, 2007.

MAYEUX, R. *et al.* The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. **Am J Epidemiol**, v.142, n.8, p.820-7, Oct 15, 1995.

MARTTILA, R.J.; RINNE, U.K. Epidemiology of Parkinson's disease: an overview. **J Neural Transm**, v.51, n.1-2, p.135-48, 1981.

MCNAUGHT, K.S.; OLANOW, C.W.; HALLIWELL, B. *et al.* Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.8, p.589-94, Aug, 2001.

MCNAUGHT, K.S. *et al.* Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia. **Ann Neurol**, v.56, n.4, p.540-7, Oct, 2004.

MILLER, D.W. *et al.* Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. **Neurology**, v.62, n.10, p.1835-8, May 25, 2004.

MOUNT L.A.; REBACK S. Familial paroxysmal choreoathetosis: preliminary report on a hitherto undescribed clinical syndrome. **Arch Neurol Psychiatry**, v.44, p.841-847, 1940.

NAIYA, T. *et al.* Clinical characterization and evaluation of DYT1 gene in Indian primary dystonia patients. **Acta Neurol Scand**, v.114, n.3, p.210-5, Sep, 2006.

NAJIM AL-DIN, A.S. *et al.* Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. **Acta Neurol Scand**, v.89, n.5, p.347-52, May, 1994.

NCBI: US **National Center for Biotechnology Information**, Bethesda, Md, 2002. (Acessado em 15 de dezembro de 2007, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)

NISHIOKA, K. *et al.* Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.59, n.2, p.298-309, Feb, 2006.

NOLTE, D.; NIEMANN, S.; MULLER, U. Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.18, p.10347-52, Sep 2, 2003.

NYGAARD, T.G. *et al.* Dopa-responsive dystonia: the spectrum of clinical manifestations in a large North American family. **Neurology**, v.40, n.1, p.66-9, Jan, 1990.

NYGAARD, T.G. *et al.* Localization of a gene for myoclonus-dystonia to chromosome 7q21-q31. **Ann Neurol**, v.46, n.5, p.794-8, Nov, 1999.

OLANOW, C.W. *et al.* Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. **Lancet Neurol**, v.3, n.8, p.496-503, Aug, 2004.

OLANOW, C.W.; MCNAUGHT, K.S. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. **Mov Disord**, v.21, n.11, p.1806-23, Nov, 2006.

OZELIUS, L.J. *et al.* The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. **Nat Genet**, v.17, n.1, p.40-8, Sep, 1997.

OZELIUS, L.J. *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. **N Engl J Med**, v.354, n.4, p.424-5, Jan 26, 2006.

PAISAN-RUIZ, C. *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. **Neuron**, v.44, n.4, p.595-600, Nov 18, 2004.

PARANO, E. *et al.* Molecular basis of phenotypic heterogeneity in siblings with spinal muscular atrophy. **Ann Neurol**, v.40, n.2, p.247-51, Aug, 1996.

PARKKINEN, L. *et al.* Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. **Ann Neurol**, v.57, n.1, p.82-91, Jan, 2005.

PATEL, C.V. *et al.* PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. **J Biol Chem**, v.275, n.48, p.37993-8, Dec 1, 2000.

- PAYAMI, H. *et al.* Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. **Arch Neurol**, v.59, n.5, p.848-50, May, 2002.
- PERIQUET, M. *et al.* Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. **Brain**, v.126, n.Pt 6, p.1271-8, Jun, 2003.
- PICARD, F. *et al.* Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families. **Brain**, v.123 (Pt 6), p.1247-62, Jun, 2000.
- POLYMEROPOULOS, M.H. *et al.* Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v.274, n.5290, p.1197-9, Nov 15, 1996.
- POORKAJ, P. *et al.* parkin mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson [corrected] disease. **Am J Med Genet A**, v.129, n.1, p.44-50, Aug 15, 2004.
- PRAMSTALLER, P.P. *et al.* Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. **Ann Neurol**, v.58, n.3, p.411-22, Sep, 2005.
- PRIYADARSHI, A. *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. **Environ Res**, v.86, n.2, p.122-7, Jun, 2001.
- QUINN, N.; CRITCHLEY, P.; MARSDEN, C.D. Young onset Parkinson's disease. **Mov Disord**, v.2, n.2, p.73-91, 1987.
- RAINIER, S. *et al.* Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. **Arch Neurol**, v.61, n.7, p.1025-9, Jul, 2004.
- RAJPUT, A.H. *et al.* Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. **Ann Neurol**, v.16, n.3, p.278-82, Sep, 1984.
- RAMIREZ, A. *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. **Nat Genet**, v.38, n.10, p.1184-91, Oct, 2006.
- RICHARDS, R.N.; BARNETT, H.J. Paroxysmal dystonic choreoathetosis. A family study and review of the literature. **Neurology**, v.18, n.5, p.461-9, May, 1968.
- SCHRAG, A.; SCHOTT, J.M. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. **Lancet Neurol**, v.5, n.4, p.355-63, Apr, 2006.
- SEGAWA, M. *et al.* Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. **Adv Neurol**, v.14, p.215-33, 1976.
- SHEVELL, M.I.; PEIFFER, J. Julius Hallervorden's wartime activities: implications for science under dictatorship. **Pediatr Neurol**, v.25, n.2, p.162-5, Aug, 2001.
- SIDRANSKY, E. Heterozygosity for a Mendelian disorder as a risk factor for complex disease. **Clin Genet**, v.70, n.4, p.275-82, Oct, 2006.

SINGLETON, A.B. *et al.* Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. **Science**, v.302, n.5646, p.841, Oct 31, 2003.

SUGITA, M. *et al.* Meta-analysis for epidemiologic studies on the relationship between smoking and Parkinson's disease. **J Epidemiol**, v.11, n.2, p.87-94, Mar, 2001.

SUN, M. *et al.* Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. **Arch Neurol**, v.63, n.6, p.826-32, Jun, 2006.

SVEINBJORNSDOTTIR, S. *et al.* Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. **N Engl J Med**, v.343, n.24, p.1765-70, Dec 14, 2000.

SWAIMAN, K.F. Hallervorden-Spatz syndrome and brain iron metabolism. **Arch Neurol**, v.48, n.12, p.1285-93, Dec, 1991.

TAN, E.K. *et al.* Association between caffeine intake and risk of Parkinson's disease among fast and slow metabolizers. **Pharmacogenet Genomics**, v.17, n.11, p.1001-5, Nov, 2007.

TANG, B. *et al.* Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**, v.15, n.11, p.1816-25, Jun 1, 2006.

TANNER, C.M. *et al.* Parkinson disease in twins: an etiologic study. **Jama**, v.281, n.4, p.341-6, Jan 27, 1999.

TARSY, D.; SIMON, D.K. Dystonia. **N Engl J Med**, v.355, n.8, p.818-29, Aug 24, 2006.

VALENTE, E.M. *et al.* The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe. **Brain**, v.121 (Pt 12), p.2335-9, Dec, 1998.

VALENTE, E.M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, v.304, n.5674, p.1158-60, May 21, 2004a.

VALENTE, E.M. *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. **Ann Neurol**, v.56, n.3, p.336-41, Sep, 2004b.

VALENTINO, P. *et al.* Genetic heterogeneity in patients with pantothenate kinase-associated neurodegeneration and classic magnetic resonance imaging eye-of-the-tiger pattern. **Mov Disord**, v.21, n.2, p.252-4, Feb, 2006.

VAN DEN EEDEN, S.K. *et al.* Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **Am J Epidemiol**, v.157, n.11, p.1015-22, Jun 1, 2003.

WATERS, C.H. *et al.* Neuropathology of lubag (x-linked dystonia parkinsonism). **Mov Disord**, v.8, n.3, p.387-90, Jul, 1993.

ZARRANZ, J.J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Ann Neurol**, v.55, n.2, p.164-73, Feb, 2004.

ZHOU, B. *et al.* A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. **Nat Genet**, v.28, n.4, p.345-9, Aug, 2001.

ZIMPRICH, A. *et al.* Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. **Nat Genet**, v.29, n.1, p.66-9, Sep, 2001.

Outros sites:

www.neurogenetics.nia.nih.gov.

APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO A - Lista de *Primers*

Gene: <i>DYT1</i>	Forward (5' → 3')	Gene: <i>DYT1</i>	Forward (5' → 3')
DYT15BF	AATGTGTATCCGAGTGGAAATG	DYT15BR	TGCCAATCATGACTGTCAATC

Gene: <i>ATP1a3</i>		Gene: <i>ATP1a3</i>	
Exon	Forward (5' → 3')		Reverse (5' → 3')
ATP1a3-1F	TATTGCGGAGGTCTCTGGG	ATP1a3-1R	GACCACATGGATTGGCTGG
ATP1a3-2F	GCATGGAGGGCCGGTGTC	ATP1a3-2R	GACATCTTGTGCTCTGTCTG
ATP1a3-3F	GAGGTGGCTATGGTAAGCC	ATP1a3-3R	CCTTCACCAGACCCCCAG
ATP1a3-4F	TTCTGGGGTCTGGTGAAG	ATP1a3-4R	CTCTTGTCTGGGTGATTGTGA
ATP1a3-5F	TCAGACACACCAACCCTCAT	ATP1a3-5R	CGTTCACCTGCATCTTCTCA
ATP1a3-6F	AGGAGGCCAAGAGCTCCAAG	ATP1a3-6R	GGGGCCTGGACTCCTG
ATP1a3-7F	TTCTAGCTGTGATCTCCAGG	ATP1a3-7R	GATGCCAGGGTGGCGATAC
ATP1a3-8F	CCACCAACTGTGTGGAAGG	ATP1a3-8R	TCCAGGCCTCTAGCCCCT
ATP1a3-9F	CTCATTCTTTTCCAGGCCCT	ATP1a3-9R	GCCACCCAGGTGTGCGAA
ATP1a3-10F	AGAACCGCATGACAGTCGC	ATP1a3-10R	GGGTTGTCAGAACAGGGAC
ATP1a3-11F	CGCTGGGCTCTGCAATCG	ATP1a3-11R	ATTATCATTCCCATTTTACAGAC
ATP1a3-12F	AGGTCTCTGTGAGAGAGTGT	ATP1a3-12R	AAGACGGCCAGTCAGCATTC
ATP1a3-13F	GAATGCTGACTGGCCGTCTT	ATP1a3-13R	CGTTGCCCTCAGAGATGATG
ATP1a3-14F	ACTTCACCACGGACAACCTC	ATP1a3-14R	TCCCAGAAAGAATGGGACAG
ATP1a3-15F	GTCCTCTGGCTCTCCTGG	ATP1a3-15R	TCAGACCCAGGGGTCCAG
ATP1a3-16F	GTCTGAGGGAGGAAGGTCT	ATP1a3-16R	CAGGGGAGGAAGACAGAAAA
ATP1a3-17F	AAAAAAAAAAGGACGTTGGATGA	ATP1a3-17R	CTGTCTTTCATGATGTCCG
ATP1a3-18F	CTCTGCATCGATCTGGGC	ATP1a3-18R	GTGCAGACCCCCCCCAC
ATP1a3-19F	AGGGCCAGGAGGGCATAAC	ATP1a3-19R	GGGCCATCGTAGGAAGTGG
ATP1a3-20F	AGGCCCTGAGGACCCCAT	ATP1a3-20R	GAGCTATGATTACACCACTGA
ATP1a3-21F	GGGTGTCTGCACTGTGCC	ATP1a3-21R	ATGGGGACTGCAGTGGGG
ATP1a3-22F	CACCTGTGAGCACGAAGGA	ATP1a3-22R	ACCCGTGAGAAGACAGAGTG
ATP1a3-23F	ACTCATCCTGCGCAGGAAC	ATP1a3-23R	GGAGAGAGGTTTGGGGCAG

Gene	<i>GTPCH1</i>		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
GTPCH1-1F	GTTTAGCCGCAGACCTCGAAGCG	GTPCH1-1R	GAGGCAACTCCGAAACTTCCTG
GTPCH1-2F	GTAACGCTCGCTTATGTTGACTGTC	GTPCH1-2R	ACCTGAGATATCAGCAATTGGCAGC
GTPCH1-3F	AGATGTTTTCAAGGTAATACATTGTCC	GTPCH1-3R	CTCGCAAGTTTGTGAGGC
GTPCH1-4F	GTCCTTTTTGTATGAGGAAGGC	GTPCH1-4R	GGTGTGCACTCTTATAATCTCAGC
GTPCH1-5F	GTGTCAGACTCTCAAAGTGTGCTC	GTPCH1-5R	TCACTTCTAGTGACCAATTATGACG
GTPCH1-6F	ACCAAACCAGCAGCTGTCACTCC	GTPCH1-6R	AATGCTACTGGCAGTACGATCCG

Gene: <i>PANK2</i>		Gene: <i>PANK2</i>	
Exon	Forward (5' → 3')		Reverse (5' → 3')
PANK2 1AF	TCAAGCCCTTTCTGTCTG	PANK2 1AR	GATTCCTTCTCGCCTCC
PANK2 1BF	GTCACGATAGCCTCTCATTG	PANK2 1BR	TAAGAGCCCAGTCGATCC
PANK2 1CF	GGAGGCGAGAAGGAATC	PANK2 1CR	AGGTACCGCTTTCGGAG
PANK2 2AF	AGTTGCTACTGTGGTAAGGG	PANK2 2AR	AAGCGTATAAAGTGCAGATTG
PANK2 2BF	ACCTCCAATGTGGCTTATG	PANK2 2BR	AAATTATTTACCACTTGCTAC
PANK2 3AF	GAATTTTGTCTTCTGTTGGC	PANK2 3AR	GCAGAGGATACGGATTTTTC
PANK2 3BF	ACTCAGTCGGATTCAATGG	PANK2 3BR	AATACCTGAAAACCTAGCCC
PANK2 4F	TATGTGAATATGGTTTTGGG	PANK2 4R	TCATGATCTGCCCATCTC
PANK2 5F	CATTCAAGTTCTGTTGGGC	PANK2 5R	AAACAGACGTGATGGGG
PANK2 6F	TTTGGGGTAGCTTTTATGAG	PANK2 6R	AGTTCCATGACAGTGTGACC
PANK2 7F	CAGTGGTTGGCTTTAACAC	PANK2 7R	CTTTCTCACTTTGTTTCAGG

Gene: <i>PARKIN</i>		Gene: <i>PARKIN</i>	
Exon	Forward (5' → 3')		Reverse (5' → 3')
PARKIN-1F	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA	PARKIN-1R	GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC
PARKIN-2F	ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG	PARKIN-2R	AGATTGGCAGCGCAGGCGGCATG
PARKIN-3F	ACATGTCACCTTTTGCTTCCCT	PARKIN-3R	AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC
PARKIN-4F	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	PARKIN-4R	AGGCAATGTGTTAGTACACA
PARKIN-5F	ACATGTCTTAAGGAGTACATT	PARKIN-5R	TCTCTAATTTCTGGCAAACAGTG
PARKIN-6F	AGAGATTGTTTACTGTGAAACA	PARKIN-6R	GAGTGATGCTATTTTTAGATCCT
PARKIN-7F	TGCCTTTCCACACTGACAGGTA	PARKIN-7R	TCTGTTCTTATTAGCATTAGAGA
PARKIN-8F	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG	PARKIN-8R	ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT
PARKIN-9F	GGGTGAAATTTGCAGTCAGT	PARKIN-9R	AATATAATCCCAGCCCATGTGCA
PARKIN-10F	ATTGCCAAATGCAACCTMTGTC	PARKIN-10R	TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT
PARKIN-11F	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	PARKIN-11R	CAACACACCAGGCACCTTCAGA
PARKIN-12F	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	PARKIN-12R	AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA

<i>PINK1</i>			
Gene			
Exon	Forward (5' → 3')		Reverse (5' → 3')
PINK1-1F	GCCCCAAGTTTGTGTGAC	PINK1-1R	CTCCGCTCGGCTTAGGAC
PINK1-2F	TGTTTCCCTTTTCTTGGGCC	PINK1-2R	TGGGCATTTTGAGAACATCTCC
PINK1-3F	TCGAAGGTCAGAGCCAATTCTAG	PINK1-3R	ACCAGGTGCTGAGGACATAAGTG
PINK1-4F	TTGTATCTGATGCTGGCCTCAT	PINK1-4R	GCACATGGAGGGCAGGAA
PINK1-5F	TCGTGATGTGTGGTAGCCA	PINK1-5R	TCTAGTGCCCTGGAGAGCTC
PINK1-6F	GCTATGTCTTGTGGTGGCTTTA	PINK1-6R	CAAGGCATCGAGTCTCCTGC
PINK1-7F	CAGAGTTCAGATTAGCCCAT	PINK1-7R	CAAACCTGACCTTCACTCTG
PINK1-8F		PINK1-8R	AGTTCTTCCATTTGCCAAGC

Gene: <i>DKFZp434</i>		Gene: <i>DKFZp434</i>	
Exon	Forward (5' → 3')		Reverse (5' → 3')
DKFZp434 1F	CCTGCCGGTCCCTGAG	DKFZp434 1R	TTTGCAAATGTAAGGAGGGG
DKFZp434 2F	GACTTTTCTCCCGTTTCAG	DKFZp434 2R	GCCAGTAAAACGTCTCCTTCC
DKFZp434 3F	TTGAAGAGATTCATGTTTACTGAG	DKFZp434 3R	CAAGGGGAAGGTTGTCATGTG
DKFZp434 4F	ACTACAGGGAATTAATACAATGAGAG	DKFZp434 4R	CAAGCTACCCATACTCTGATCTTC
DKFZp434 5F	CCATGGGTCTACAAACCATTTC	DKFZp434 5R	TGTGTTCTACTTTTCCAGTATAAGC
DKFZp434 6F	TCATTATGCTGCCATCTATTTACAG	DKFZp434 6R	TTTTCAATCAAAGTATGTCAATATGC
DKFZp434 7F	TTTGCTCAATCACTTCCATTG	DKFZp434 7R	CACAGGACAGAAAAGGCATTG
DKFZp434 8F	AAGCACACCTCATTCTGTTGG	DKFZp434 8R	ATGCGGCCTCCTGGATTAG
DKFZp434 9F	TTTGGCTGGAAGCCTGTTAC	DKFZp434 9R	CCTGAAGGTGATGAGATCAAAATAC
DKFZp434 10F	CTCTTGTAAGTGGAGGTGGC	DKFZp434 10R	AGGTGACAGAGTGAGACCATATC
DKFZp434 11F	ATGCTTTCTGTAATTTGGAC	DKFZp434 11R	AAATATTGATATTCTACCTGGCCC
DKFZp434 12F	ATATTGGTTCTGCCCTCCTG	DKFZp434 12R	CAGAAAAGATTTACATTTAGTCGACAG
DKFZp434 13F	CAGCATCTTAAAGCACAGCC	DKFZp434 13R	TGGCAATCAAAAAGAACTTTGC
DKFZp434 14F	TACAATGCCTGGCACAGAAC	DKFZp434 14R	TTTGCCAGCAGATGTCCAG
DKFZp434 15F	GCATTAGCTGGTGACTGGATG	DKFZp434 15R	GGGAATTACACAAACTGCTCC
DKFZp434 16F	GATAAATACTTTAAAGCACCAACCC	DKFZp434 16R	TGCAAAACACTTGCAACAGAG
DKFZp434 17F	TGGAACAAAAGGATCAACAGG	DKFZp434 17R	GATACACAATGGCAGGGCTC
DKFZp434 18aF	GAAGTTTGATTTGCCAGTCTCC	DKFZp434 18aR	CCAAGGCAAATGCTATTGTTG
DKFZp434 18bF	AGCGTTGACGATAAGCATTG	DKFZp434 18bR	TCAAAGTGGCATGAATAACCAC
DKFZp434 19F	TCTCCAGAAGCATAGCAATACG	DKFZp434 19R	TTGGGTCTATTGTTCAATGTC
DKFZp434 20F	AACCAACATGGCTTATCATCTC	DKFZp434 20R	ACATCAGGGAAATCCCTACC
DKFZp434 21F	TTCCATAATTATAAATACCATTAACC	DKFZp434 21R	ACCAAACTGCATTCTGCC
DKFZp434 22F	AGCCTGATTGCTAGGAGGTG	DKFZp434 22R	TCACCCAGTGACACAAAAGTAG
DKFZp434 23aF	ACCAGAGGTGTGTAAGGCAG	DKFZp434 23aR	CAGGTTAAACTGTTTCAGAGTTGG
DKFZp434 23bF	TTGACACATTTGGACTTGACAC	DKFZp434 23bR	GCTGGGATTATAAGGTGCG
DKFZp434 24F	TCCTCTTTGATGCTGTTCTTTG	DKFZp434 24R	TGCCACTTTTAAATCCACAAC
DKFZp434 25F	TTAAGTGACACACTATTGGTAGCTG	DKFZp434 25R	TCATGTTTCTAAAGGTTCTGTTCC
DKFZp434 26F	GGTGGTTCAACTTCAGGCTC	DKFZp434 26R	AATGGAAATTAATAAGTGACACATC
DKFZp434 27F	TTGGCAGAGCACATTTCTTC	DKFZp434 27R	TGTCCATCAAAGTCACAGAGAG
DKFZp434 28F	TTTTACAAACATTATCAACTACCC	DKFZp434 28R	GGAGAAATGAAGGGCTTTGG
DKFZp434 29F	AAAAGGATCTTGCCTGTCG	DKFZp434 29R	ACTGAAGCAATTGTTTGCCC
DKFZp434 30F	TCAACAGGAATGTGAGCAGG	DKFZp434 30R	CCCACAATTTAAGTGAGTTGC
DKFZp434 31F	CTGAATTTGCCAACCATTTG	DKFZp434 31R	GAACCGTATGGATATTCTCTCAAC
DKFZp434 32F	AAAGCCCTTGATATTTGTTT	DKFZp434 32R	GGGCGCCATCTGTTCTATG
DKFZp434 33F	AGGCCACATGGTTGCTAGAG	DKFZp434 33R	AATGATACATGTCAGTAGGAGTTTAC
DKFZp434 34F	CATTTGCTCAACAAGGTTGG	DKFZp434 34R	ATGCCATCTCCCTAATTTCTC
DKFZp434 35F	CAATCACTTGTTGTGTGCAG	DKFZp434 35R	ACCTCATACTGTCGCAAAAGC
DKFZp434 36F	ACCTTAAAGCTTTGCGACAG	DKFZp434 36R	ATAAGCCAGCATTCAAACCC
DKFZp434 37F	GGATTGGTTAGAAAGGGAGGG	DKFZp434 37R	GATTATGTGCAAAACAAATTCAG
DKFZp434 38F	TTC AATGAACAAGTAGGTCAGG	DKFZp434 38R	TTTCTACTCCACAACGAAAAGAC
DKFZp434 39F	GAAGGAGATACGTGGGTAACCC	DKFZp434 39R	AGAACCTGAGAGCAAGTCTGG
DKFZp434 40F	TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC	DKFZp434 40R	CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC
DKFZp434 41F	GCCTCCTTGGATGATGAGC	DKFZp434 41R	TCTGTTTAAAGGAATTAAGCATACAAC
DKFZp434 42F	TTTCTTTGCAATGCTCGGACC	DKFZp434 42R	GGGATGGTGAATAATATAGGAGG
DKFZp434 43F	GGGTTCCAGTTTAAACAGTTTATAGG	DKFZp434 43R	CAAAACACATTTGCTCTTGAATAC
DKFZp434 44F	CCTTTATTCTGTACAAGTTCTAGTTGC	DKFZp434 44R	TGAACAATCTTTGCTGATGC
DKFZp434 45F	AAAGTGGAGGAGAACATTAAGGC	DKFZp434 45R	AATCCATAAGAGGGGTGTG
DKFZp434 46F	TTTGAAGCACAGATTTTATGGAG	DKFZp434 46R	AAGATCTTCTTATGAATTATCAACAG
DKFZp434 47F	TCAATTCAGAATGGTTAGGGAAG	DKFZp434 47R	GAAAAGATGGTGTGAGAAGC
DKFZp434 48F	TGCATAATGGTGGTGGTGTG	DKFZp434 48R	GTGACCCCTCAAGACCATC
DKFZp434 49F	TGAATTCAGTTCCAAGGATTTG	DKFZp434 49R	CTACCAATTAATAATCCTGATTATACC
DKFZp434 50F	GCTCAACCTTAAACGAAATGTG	DKFZp434 50R	CATTCTTTCATACACAGGAC

Gene	SNCA		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
NACP 1F	GAGAAGGAGGAGGACTAGGAGG	NACP 2R	CGGCGTTCTCCAGGATTTT
NACP 3F	GTCTCACACTTTGGAGGGTTTC	NACP 3R	CACCTACCTACACATACCTCTGACTC
NACP 4F	GCTAATCAGCAATTTAAGGCTAG	NACP 4R	GATATGTTCTTAGATGCTCAG
NACP 5F	CGATGGCTAGTGGAAAGTGG	NACP 5R	CCCACAGTAAGTATCTTGCTCC
NACP 6F	CGGAGGCATTGTGGAGTTTAG	NACP 6R	CCACGTAATGAGCATGTAGAGAGC
NACP 7F	GACTGGGCACATTGGAAGTGG	NACP 7R	GCTGTCAGTGCTGATGCGTAATTG

Gene	PARKIN- quantificação		
	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
Q Parkin 1F	CCACCTACCCAGTGACCATGA	Q Parkin 1R	CGGCGCAGAGAGGCTGTA
Q Parkin 2F	TCGATTCTGACACCAGCATCTT	Q Parkin 2R	GAACCCCTGTCGCTTAGC
Q Parkin 3F	GGATCAGCAGAGCATTGTTTAC	Q Parkin 3R	TGCATTCATTTCTTGACCTTTTCT
Q Parkin 4F	TTCTTCTCCAGCAGGTAGATCAATC	Q Parkin 4R	TTTTCCCGGCTGCACTCTT
Q Parkin 5F	CCGGATGAGTGGTGAATGC	Q Parkin 5R	AGAGGAATGAATGTGACCAGGTA
Q Parkin 6F	GCACACCCACCTCTGACA	Q Parkin 6R	TGCAAGTGATGTTCCGACTATTTG
Q Parkin 7FA	CCCACACAAGGCAGGGAGTA	Q Parkin 7RA	AAGACTCAATGATCGGCAGTTT
Q Parkin 8F	TTGATTAAGAGCTCCATCACTTCA	Q Parkin 8R	TCTATCTTTATGACAGTCTGATGCA
Q Parkin 9F	CAATCTGCTTTTTGGGTTTTGC	Q Parkin 9R	AACACGCCCCCATCTG
Q Parkin 10F	TTTCCCTGGGCAGATATGGA	Q Parkin 10R	CCTCTAAGGACTCCTTTGAAAATGC
Q Parkin 11F	TGTTTCCCAGGCCTACAGA	Q Parkin 11R	GGTTTTCTTGATGGTTTCTTTGGAA
Q Parkin 12F	GAACCCACCACCTTTGTTTT	Q Parkin 12R	ATGCAGACGCGGTTCCA
B- GLOBIN F	TGGGCAACCCTAAGGTGAAG	B- GLOBIN R	GTGAGCCAGGCCATCACTAAA

Probe	Amplicon	Marcador	Seqüência
Q Parkin 1	62bp	VIC	TACGTGGGTACCTGCC
Q Parkin 2	60bp	VIC	CAGCTCAAGGAGGTGGT
Q Parkin 3	64bp	VIC	TTGTGCAGAGACCGTG
Q Parkin 4	82bp	VIC	TTTTATGTGTATTGCAAAGGCCCTGTCA
Q Parkin 5	77bp	VIC	CCACACTGCCCTGGGACTAGTGCA
Q Parkin 6	76bp	VIC	AAACATCAGTAGCTTTGCACCTGATCGCA
Q Parkin 7A	64bp	VIC	CCAAGTTGAGGGTCGTG
Q Parkin 8	92bp	VIC	ATTCTGGGAGAAGAGCAGGTGAGTGAGCA
Q Parkin 9	86bp	VIC	CCAGCAGTATGGTGACAGAGGAGTGTGTC
Q Parkin 10	86bp	VIC	CAGGGACAAGGCATG
Q Parkin 11	86bp	VIC	CGATGAAAGAGCCGCCGAGCA
Q Parkin 12	123bp	VIC	CCCCAGTGACAGGCTCGAGTG
B- GLOBIN R	68bp	FAM	CTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGC -

<i>Gene</i>	<i>OSBPL6</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon3	GATTGGGATGGTCTTAAGTG	ACATCAATGAACGTACCTACAG
Exon4	GACTGTGTTGTGTATGATTC	TGTAACCGTTATTACAGTTC
Exon5	CTTAAGAATCTGCTTTAAGTG	TGCCATATTCTTAGTTCC
Exon6	AAGCAACATTAGACCCAC	AGGCTTGACAATTACAGTG
Exon7	TGTAGTATTCCACTTCCCATAG	ATAACTCTCTGCCTACCAC
Exon8	GAGCACATCTATCATTTGAAGG	ATTACACACGTGAGCCACAG
Exon9	TTCCTCTCTTTGTTAATACG	CTCATAATTGACCTCTTCG
Exon10	CATAATTTGCATTGACCC	CCTTATATATTCATAGAACAACC
Exon11	TAAGTGTCTGTGCTCTTG	AATCTAACGCCATAAAC
Exon12	CAAGTGTGTATCAGAGAGG	ATCCAACCATTTAATCTTTC
Exon13	CCTATTTGTGAGTAAAAGTC	CTGCAAAGTGTACTATCCC
Exon14	GAGCTAAGAACATCACAGAC	ATTAAGTGTAAAAGAACTGG
Exon15	TTAAAGAGTAGAAATCTGGC	AACAAATGAAAGTAATCACC
Exon16	CTAGGACCTCTGCTTCTC	AATGCCTGTTCAATTAAGTC
Exon17	GAAAGTTATTTCCCTTCTTG	CATAATGAATTCTGGCTTAG
Exon18	ATCTAGAGGGATGAGGAAC	AACAGATTGTTATCGAAATG
Exon19	TTCAGTAAGAGAAATGGATG	AATACAGTGTCCCTTTGG
Exon20	TTCCAAAGTGTTCATAAAG	AAAGAGAAAGAAACCCCTTAC
Exon21	AAATGGGAGGAGAATGAG	ATACAGGACAGATTCACCTTG
Exon22	AGGGACTTCAAGGCTAAG	ATGACCTGATGTTCTCTTC
Exon23	GGGTAAGTCAGCTTCTTC	AAGTGATCTTCCCTCCTC
Exon24	GACTCCGTCGGTACTGTG	TAAGTGGAGTTTCTCATGGC
Exon25	ACTAACTGGCTTACAAACTG	GACCCAGAAACCACACATAG
Exon1-Tb	AGTGTCTCATTGTCTGTCTG	ATCAAGTTTCTCTCAAATG
Exon10-Tb	TTATCTTTCATCCTCCCATC	ACAGGGGAGTCATCCTTG

<i>Gene</i>	<i>PRKRA</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	CCTCGCTGGAGCAACGCAAG	GGCACGGCTTTACCCAGAATG
Exon2	TCTAAAGACCTCGCTCAC	TGAGAGGTCTCAGTTTCAG
Exon3	TGACTTTGTTTGTGTATTG	AACTGTTCACTTTGTTGC
Exon4	GAATGACAAGAGCAAAGAC	ATTAATTCCTTGTTAGCC
Exon5	GAAATGGGATCAAATTAAG	AATATTTGAAAACATTACGAC
Exon6	AAACAAAGTTATCAGGTCAG	AATCACAACCTCTGAAGTAGC
Exon7	AATGTTGTCTGTTTAAATTG	TACTATCCACAAGAATGGG
Exon8	GGTGTAGTATACCATGGAG	GAGTGTGATGGAATCTATG

<i>Gene</i>	<i>DFNB59</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	GTGCTATAGCCTGCCATTCC	AGGTAAGCCCAAATAATATCCC
Exon2	TGCCTTTCTCTAACATTTGGG	AAAATACAACCTCAATGTTTAAGC
Exon3	GGATTGCCTTGATTTACTATTAGGTG	CAACTGCAGCTCTTTCATCAG
Exon4	TGGACCAATTGGATCTCTGC	AACGGAGGGTCTTCTCAGC
Exon5	GTGGGCCAGACCTATTTG	CCACTAGTCATGAAATAATTTGGC
Exon6	GCCAAATTATTTCTAGTAGTGG	TTTAATTTAATTCATCAAAGCAAACC

<i>Gene</i> FKBP7		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	CCCTTTGTGACGCAGGAC	CAACCAATGAGGCTTCCG
Exon2	TGGGAATGATGGTTAGAGAG	GCCTCAAGTGATTCTACCAC
Exon3	AACTGTTTAACAAACAACC	AATATGCATTTGCTACGG
Exon4	TAATATGGTTATGGCAGTTC	ATTGAACAGGATGACTCAC
Exon5	TAATCTTGACATGAGTTTC	AAATAGCAAATACAACCTGG

<i>Gene</i> PLEKHA3		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	CTGCGCCTACCCCATCAC	GAAGAGGAGCCCCGACC
Exon2	AATCACAGTTTTCTATGTGG	TGAAGAACCCTTGACTATC
Exon3	ATGAAGCATCTGATACTGTG	CCTGGGATAGATACTAAAAG
Exon4	TACATTGCTCAAAGAATATG	TCATCTTATGGAATGACTG
Exon5	TGTATATGATTCCATGTAGTTG	AAATGAAACGAAAACCAC
Exon6	TTAGAGCTGCATGATTCTAC	CAAAGAACTTCCCTAGATGC
Exon7	TAAAATTCCAGTTGAGTGTG	AAATTACAGAGCCCCAC
Exon8	GAGGACTGGAGTTAATATTGAC	ATAAAGTGCAGAGTCCTAAGG

<i>Gene</i> FLJ39502		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon2	TTCAGAAAATGTAGTTTTAGG	GATTAATAGACAGCTGAACC
Exon3	AAAGCTGTATCTCTTGGG	CTCATGTTAGCCTGTGTC
Exon4	CAAATTTGCTGGAGATG	CAATTAATCAGGTAAACTGC
Exon5	AACAAATGAAAGAGTGATTG	TACTAGAAGACACAATTTGG
Exon6	ATGTGCTATAGAAATTAGGC	CATATACTAAGCAATCTGCC
Exon7	AGGTAATAGCCTACTCGTC	ATTTAGACACATGCTTTAGG
Exon8	TCAGATGCTTTGATTTATTG	CAATAATTGTGTAGTACATGC
Exon9	TCAGTATTTAATCACTAGCATC	GCTTTAAAGTTGCAAAATG
Exon10	CTTCACTGGTCAAAATTAAG	GGCTCAGTATAGATTTGTTG
Exon11	TACCTGGACTTTTCTTCTTG	CCAGAAGACATTTGATTAAC
Exon12	CCAAGTAGTTAGTGTATGGC	CAATGGACAATGACTTTAAC
Exon13_1	TTTTACTGTAATTGAACTGG	ATGTTCAAGCACTGATTCTG
Exon13_2	AACATTTTCAAGTCATTTTG	CTAACCTTTTCAAGTATGTC

<i>Gene</i> LOC728984		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	ACCCGCTGAAAATAAGGAC	CCGCTCTGCTCCCAAC
Exon2_1	CTCCGGCGCTTTGTCTG	CTGTACCGCCGTCACCC
Exon2_2	GGGAACGCTAGCGAGGTG	GGTGTCAAGTAACGGACCCTC

<i>Gene</i> LOC644776		
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1_1	ATAGGGGAGACTGAGCTAC	TTTAGCCCGTCTGTAC
Exon1_2	GTGAGGGTCCAGTTGTAG	ACTTGCTGTTTCTCCATC
Exon1_3	AGCTTCTGACTTCTGAG	AAAGTAGTTTTCCAAGTCC

<i>Gene</i>	<i>SESTD1</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	TGTAGTTGACATTTGACTTTC	ATGCATCTGTCATACTTAAC
Exon2	TTACAATCTATAAGTAGCCATTAG	AAGCAGATAAGATAGCAAAG
Exon3	ATTATGAAGAACGAAATCTG	ATGCATTTGCCATTTTC
Exon4	AGCATAATCTTGACTGTCTG	GCTTAGTAACCAATGCTG
Exon5	TTTCGTGGATTTAATAGTG	TATGCTATAATGTGGTATGC
Exon6	AAACATATCCTAGCTGGC	TTCTTTTAGCTTGCATTAAC
Exon7	ATACTTTTGTGCCCTG	ATTTAATGAACGAATCAATC
Exon8	ACTAGAATTGGGAATATTGAG	GTCACATAGTAGAAATTATAAGG
Exon9	AATAAGTTAGAATGAAAGTTTG	TATGCTACTAATTACCCACG
Exon10	TCATGTATTACTTAGTTTATCTGG	ACGTGTAGGTAAGTGTTCAG
Exon11	AACACTTTAGATGCTGATTAC	AAGTTGACTTAATTGTCTAACC
Exon12	ATATCTGATGAGACGATTTG	AGTTAAGAACGTTTTGTCTG
Exon13	CATGTACCAAATGATGATG	TTTTAGGACCATGAAAAG
Exon14	CATTTTGATACAATAAGTAAAGAG	ATTATAATCATGCAGAAAAGC
Exon15	GTGCCACTAGATTTATTCAG	TCTAAACAACCGTAACAAC
Exon16	GTGATCCTCTGAAACTGC	TGATTTCACTTTAAGACCAC
Exon17	CACTGCAGTTAATAGATTTG	GTGGCTAATGCTGTAGTATG

<i>Gene</i>	<i>ZNF533</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	TAAATCCTTCATTTCCAG	GCATATATCATTTCAGAAGC
Exon2	AACAGGCTGTATCTATTGAC	GACTTGTTCTTGCACTGTAG
Exon3	TTATTTGCTCACACTGTTG	AGATCAATCAGACTTTTAGC
Exon4	ATCCAATGTGGTGTGG	AGAGTAACATGCAACAACCTG
Exon5	TCTATGGTGATTTATCTTTG	TCTGATGGGAAAAGTTG
Exon6	TCAAGGATAAGAAAACAAAG	GAAGATACACAGTCAAGTGG
Exon7	CGTTTTACATGGAATAAGAC	GAAACCTTTTCATGACATTAG
Exon 8	TACTTATGAAAAGATGCCTG	GTGGCTTTCTTTCTCAAC

<i>Gene</i>	<i>LOC729001</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon1	AGAAAGAATCTGATTGAACC	ATCCTAAACTCTCTACCTGC
Exon2	GTGAGGGTCCAGTTGTAG	TCCTTCCCTCTTATTTTC

<i>Gene</i>	<i>TTN</i>	
Exon	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Exon2	GCCCCAGATGACCTATGGAGC	AAGCAGGGCTTAACTTGGCGTC
Exon3	AGTGGCATTCCATGCTGAAAAGC	AGAGCTGCATCTACCTCTGCCC
Exon4	GTGAGCTGGGTTCAAGGACATTC	GCATTCTTCCCAGGGCTGTGAG
Exon5-6	CCATTGGGATATCCAGAAAAATC	GGACACTGAAGAAGCGAAACC
Exon7-8	CTCTGCCTTAAAGCACTTCCAGC	GCCAAGCTCAGTGGATGGTGG
Exon9	GGATTTCCACATGTTGGCGAGGCTGG	AACAACCATGTGGCCCAAGGAAC
Exon10	TTAGTGACATCTGCAGAAAAGGGA	GACTATAAGCTACCTGCAGCTGGCTG
Exon11	ATCGTTCAACCACTAAGCATCC	GAAGAGGTGGAAGTGAAGAAGTG
Exon12-13	TTGCCTCCTTTCTTTTGACTTACGT	AAGGAATTCACATGATATGTGG
Exon14	ATCTGCCTGTCCTGATGCC	GTAAGTGAGGGCTAGCTGTGC
Exon15	CCTCACTGCTGTGGTCATCTG	AAACACACGCACACACATC
Exon16-17	GCCTGTCCTGATGCCAGGAG	CCAGAGATGCTCTGTTTCACAGG

Exon18-19-20	GGCTCAGACTCAGTCCAAGAGGGC	AACTTATGCATTTCAACTGCCAC
Exon21	GTGGCAGTTGAAATGCATAAGTT	GGCTCCACAATGAAAGAGCCTATGC
Exon22	CCTGAATGCATAGTGGTATGACTG	AACTTGGACCTTCTAATAGCTGTG
Exon23-24	AAGTCCTCTAGATTCTTCTCCCAG	ACCTGATTCTGCTCACTGGC
Exon25-26	GTCTTCTAGATTCTTCTCCCAGC	GTTGCCAATGGTAAGTTTCTGTGCC
Exon27	GGTGCCCTTCTAATACGTGCAAGAAG	GGGATATTTATGAGGCACAATGATG
Exon28_1	GAGAAATGGCTCATGAAGGTGC	TTTCATGGGTAATCTTTTCAGC
Exon28_2	TGAACCAAGGCCTGAGTTTC	TTCTCAACCTGAGGAATGGG
Exon29	CCAAGCAATTGATCACTTTCCAC	CTTCAACAATAAGTTTAGCAGTCG
Exon30-31	GATGGACCTGTCTTTGTATTCAA	TTCTGGCTATGAAACTTATAGTCAA
Exon32-32	CAAGACATCATCTCTATCCTAAG	ATCATAACACACAAGATGAATG
Exon34	CGTGTCTGTCTATAGTGAGTC	ACAGCATAAGCAGAGGCATG
Exon35	CATGTCCAGTTGGATCCCAG	TCAACTTACTCTCCACGTGCAG
Exon36	AACCTATCACTGAATTGCTCC	TCCAATTGCCCGACCACAG
Exon37	CAGAGGTGCTGCATAAAGTGT	GGTAAAATCAAAGAGCACTTCAG
Exon38	CTGTAATCTCCTCAACAGACG	GATATCCCATCGTATGGCTATC
Exon39-40	CTTTAAATTGGTGGATTGTACAG	CTAAGCCAAGTAAGAATGAGCTG
Exon41	TCACATGCCATTGATTGAC	CTGGAACACATGAATACCATAG
Exon42-43	GGATGTATAACTAGCCAGCAAC	GTGATGGAGGAGAAGCTGAC
Exon44	CTATCATTACATTTCTTCTTGAAG	CAACAATGATTTACATGAACTCTTG
Exon45	ACAAGGACAAGGCAGTAGGAG	GGACCTAGCGGGAGTTATTG
Exon46	CTAACATGGGCAAGTGACAAAG	TGAGGATGAAATGAAGCAAGTC
Exon47	GGGGAATGTAGTTTTCTGTTGT	CCAAGCATGCGACATAGTAATAT
Exon48_1	GGATTTGTGAGATCTGTAGCATG	GAGAGCCAGTAAACCTCAGGTC
Exon48_2	GCAATTAATAGTGAAGGGTCTGC	GCCATAATTTCTTCCAGCTGTCC
Exon48_3	AATCCACATGCCCTTTCTAATC	GTGGGATTGGCATGTCATTG
Exon48_4	ACCACATGCCAGCGAATC	CTTGAGGCATTGCTTTAGGTC
Exon48_5	TGGAACCTAAAGCAATGCC	CTCTAGAAGGTATGCAACGCAC
Exon48_6	CAGCTGGTCCCTTTACTCCC	TCCTGTTGTTCCCTTTCTGTG
Exon48_7	GCAAAGAGAATCAAGATCAAGC	GGTTGGAAGTAGGGCACATG
Exon48_8	AAAGAAGTCCGACATGTACAGG	TTAGTTTCAGGAACCTCACGC
Exon48_9	AGGTTCTGAAACTAAAGACACC	TGCTCATTGGTGTACCGTC
Exon48_10	TGCTCATTGGTGTACCGTC	GAGAGATACTCCACACCTCCAGG
Exon48_11	CTCCTCAAGAAATGTCTCTGG	GGAGAGCCACGAACTAAGCAC
Exon48_12	GTGTAGGAGAGGCTATCTGTGCG	GAATTCAAATATGGTGGACCTG
Exon49_1	GCAGAAGAAGGCCATCAACTGGT	CTGCGGGACCCTTAAGGGTGTG
Exon49_2	TCAGAGGGAAGACAGTGGCCTCT	GCTCTTCTTTGAGCAGTACCTGC
Exon49_3	TAACCCTAATGGCTCTGGAAC	CACTCTTTGCTCTGTTGGTG
Exon49_4	ATCTTCCAAGTGCCATGTC	GCTCTTGGGTGATGTTTACAGC
Exon49_5	TGACAACGTGGTGTGATGCC	CCCTCAGCTTCTGTATCTTTAC
Exon49_6	GAGGGTCTAGAATTCAGCAAG	GATAGCATAGCACCCAACAGG
Exon50	AAACTGCTGTAATCCATCTCACCA	GGTAATACAAGCATTTCCACACA
Exon51	TTATGGCTCATGTCTATCTAAAGACT	ACTGACTGAATGTTTGCCAACAGT
Exon52-53	GGAACCTATTAATGCACCACAGCT	ATAGGACAAGAGAAGAAAGTACCAGT
Exon54-55	CACATGAAATAGTAGTATTGGGACA	AGGTCAATATAGAAGAGTGTCCAGT
Exon56	GCTCCTGTGAGACTACATTCAGT	AGGGTTGATCTAAGGGAAGATGAC
Exon57-58	TTGTGCAAGTTGGCTGGAGACT	CATGACATCGTACTCTTAAGACT
Exon59-60	CCACTGCAGTAGCATTGTAATAGTC	CGGTGATTGTTGCAGGTTCTGTAG
Exon61	CAAAGATGTTCTGCATTAATCTCAGT	TTATGGGATGTGACCCAGCCACT
Exon62	CAGAGAGGATTGGCATTTCATG	TAGAGGTGTCATCTTCCAAACTGA
Exon63	AATGCAGTGGGCATCTGACAGTC	ATTCCTCAGCACTAAGACTGGACT
Exon64	GTCTGGTCTCTACATCTCCTCACT	CTCCACAGGCTCAGCTCTCTGA
Exon65	TTATGTGTGTAAGCTCGAAATGAC	CTTAATGAATGATGGTGGTTCTGTGA
Exon66	CAGCTGCTCATGCAGTACTAGAGT	TGAGTTACATTGGTAACTCCACTAG
Exon67-68	GTCAGGAGTTGAGAGGTGTTATGC	ACTCTTGAAAGAGGCAATGGCTGA
Exon69	CAGCCATTGCCTTTTCCAAGAGTG	GAGTCAGGAAAGAGGAGATACAG
Exon70	CTGTGCTTTGGTTCTCTGTATTGAG	GTTGAGGTAATCAGAAATATGACACTG
Exon71-72	CCATGAGAGTGTAGTGCTGGACT	GATCAACTATGCTTTTCTCTAGAC
Exon73-74	TCACTGGGAGAAACAATCTTAGTGA	TTTGTCAACATAGATGTGCACCTGA
Exon75-76	AAATTGCAACTCCATCTGAAGC	AAGGAAGAAAGGCTCACAGTCAG

Exon77-78	GGAGCTCTGGTATCTACATTAGG	CATCTATAGATACAGGCTTGATGTC
Exon79	CACAGCAAGAGGTTTGTTCACACG	ATGTTGCCTCCAACACTAATACAC
Exon80	TAAATTTATGGGATCTTCAGCTAC	CTTTGCTAAGAGCCCAAATCAGAG
Exon81	GTCATATGATCACACCAGTCACTC	GGCCACACAAGTTATTAGTTAGGC
Exon82	GCCCCTTCCTCCTATCTGTTC	TCAAACCTCAAGAGTGAATCACTG
Exon83	CCTCAAATATTCTCTTATCCAGT	TCACGTCTTTTCAGCTTGC GGATG
Exon84	CGTCCATGTTTCTGGTGAGTA	GATGGTGGTTCTAGATATTGC
Exon85	GTCTTCATGTTTAGTCTTAGCT	CTATAAGGAGAAAACATGTGGGTA
Exon86	TCGTTACAAATGATGCTGGCAGT	GTAGTCAGCAAGTCAGTCATGCC
Exon87	GTCTTAGGTGTGTTGACAGCTAC	CAGGTGAGAAGGCATCCACAAC
Exon88	GTATTCATGCAAGGCAGACAACAG	GCAGAAACTAAATGACACCAGC
Exon89	GCTGGTGCCATTTAGTTTCTGC	GACCCTGGTCTAAACATAGCT
Exon90	TTAACTCTTCTCCTTGAAGTGCAT	CCTTTCAGTGTCTCTATAGGATG
Exon91	GTCCCTCTTAACTTCCTGTTGACT	ATAGGCTGCTAGTGATAAGACTG
Exon92	GATGAGATAATCAACTTCCTACT	TTCTACAATTGTTGCAGGCTCTG
Exon93	TTCGCCACGCTATCCGTTCTCG	GATTGAGAGATGTCGGACTCATG
Exon94	AGCCAAATGGATCTAGGGATAGTC	TTGTGAATTGTTATGACAAAACATGC
Exon95	TCCTTTGACTGTGAGAGGTCAGT	TTCTCTATGCTGTAATCATTGAGC
Exon96	GTTTGTGACAGCTGCTTCTAGAT	CAGCCAAGAGAGATAATCAATCAG
Exon97	CATACTAGGTTTGTGATGATTGCA	CTGTAATAGGATTACTTAAGCAG
Exon98	GCATATATACGTGCGTTGTAT	CTGGACCATGTCAGTTTACTG
Exon99	GTGGATTCTTAAACTTTTATTCT	GTCCAAATTGCATTTCATCATC
Exon100	GTGATTCTCTAAATGGCCATGAGT	ACACCTCCTCGGGAAGCCACAT
Exon101	TTCTGTCTACTACAGCAACAG	AGAAGATAAAGCAGCTTCTCAGAC
Exon102-3	TCTGAGAAGCTGCTTTATCTTCTG	CAGTCATCCCTCTCTATGCCTG
Exon104	TTACAATGGTCTAATCCATCTGATC	GCTGGTTAGGTATATTAATGAC
Exon105-6	GTCATTTAATATGACCTAACCAGC	TTCAGAGTCACATCCTGAAGATG
Exon107	ACATCGCTAGCGCTAAACTAACTG	GACCACTTTGGTGTGTGCTACAG
Exon108	ATTTACAGAGGAATAAGTTGTAG	GCATTCTAGATAGAATGAGAGCAT
Exon109-11	GCTCATGCTCTCATTCTATCTAG	GACTCTGCTGCAGTTTGGTGCCT
Exon112	CGACCAAACCTGCAGCAGAGTCAG	CACTAGAGGGCCAATGCGTTGTA
Exon113	CAGTGAAGATGTAAGATCACAGTAC	GACTGAGTCAAAGACGAGGGCG
Exon114	ATGAGTAGTAGTCATAGCTCCTAC	AGACCATTGCACAGAGGCAGCAT
Exon115	AGTGAAGCAGTTGGATGGATAGA	CTGCAAATCAGGTTTCATAGCATTG
Exon116	AACAACCTAAGAGAACTTACC	TATACATTGCTGCCAAAC
Exon117-18	AGAGAGAGAGAATTTAATAGG	ATGTACACATGTCATACAC
Exon119-20	GATGAAGGCTGCATGCATTGTTTG	AGTGGCTATAGGTATGCACACTG
Exon121	TCTTACAACAACATATGCC	TATAGATGGTTTACAGATGC
Exon122	TTCTCACACTGTTAGTGAAG	GCATAGTACATATGAAGATCG
Exon124-27	GCTGATGCATAGATAATCCATAACA	CTGCAAGTGAGACAATGGATCAG
Exon128	TTTGCTAGTCAAAGTGGTGTACTG	CCAAGACTGAGAAATGATACTTGAG
Exon129	TCATTGCAAGGAAAGTGGATGAGTC	AATGAGACTGGTAGATGTTCACTG
Exon130-31	TCCCACTCTTTCATTAACGCATG	TGCCTTACATATGAAGTGACACAG
Exon132	TGAACGTATTTACTGAGTATAGTC	AAAGGCAGCCATAAAGTAGTAGC
Exon135	GTCAAAGTGTATGTTTGGGCTAC	AAAGCAAGCATCTAGGCAGATGAG
Exon136	TAATCAGGCACGTTATGGTTGTC	CATATTCTTCTCCCGTTGTAAGT
Exon137	GCCTTCTAGTTCCCAATCTGAC	TTAACCATGTAAGTATGATCAC
Exon138-40	AGCTTGTCTGCTTGGATCTCTG	CATCCAACATCTGCTGACAACATA
Exon141-42	TGAAGCTCAGAATCCTTTCCACAG	TTCTTCTGGGAACAGGAACAG
Exon143-44	GATACCAGTCAAAGGTAGATGATGC	GGACTGGTGATAAAGACAAGACAC
Exon145-47	GATAGAATATCTATGCTGCTTCAG	GAAAGGCAAATATTCTGTGATCAC
Exon148	CATTAATCTGTAACAGAGCCATGGT	GGTCAATCACAGAGGGTAAAGGAT
Exon149	CATGACAGACCTGTCTTGAGCGA	GTCTGTGTGGATAGAACCACAG
Exon151	TATGTTGAAAACCTGAAAAC	GACAATAAAGACAAGGATG
Exon152	TTTTAGATATTACTGCTGATGTC	TGAGAAAAGATTGGAACAC
Exon153	CCTTACACCTCTAGGGTTCTTA	ATTACATCGTAAACACATGCACACA
Exon154-56	GATGTCCCACAGTACAGAGTGAC	ATGGGGTTTCTAATCTCCAAACTG
Exon157-58	GTACTAACGTTAGTAGTAGTGTCC	GTCATTCATAGCCATCTTGTGGCAT
Exon161-63	CCACTAATTTGCCTCTATGTGC	CTTCAGTTGGAGGATGTTCTGG
Exon164	TGTCATGTCTTTATGCCTTTGC	CTCTTGTGACTCACTGGGAC

Exon166	GCACCAGAAGCTATGAAAGAAG	CCACATTTGTTCCAGAGGTAACG
Exon167-69	GAGCTCTGTGAGGTTCTGGAG	GGTGGTCCTTTCTATCGCC
Exon170-72	CTTGTTACCACTGATCTCAGCTC	CGGATAACCTCTTTGGAAGC
Exon173-74	GGCTTCAGATGATGATCTCTTC	CCACCAAGATATTTTGGATAGCGA
Exon175	AGTGCCTGAAGTGCTGCCAC	CTTTAGGAGGTGGAGCTTCTG
Exon176-77	GCTTGGGTAAATGTGGAGTCG	CTGACATGTACCTGTAACCTGCC
Exon180	GTGCCTGAAGTCCCACAAG	CTGTAACAGGTGGAACCTCTGG
Exon181	CAGAAGATCCAATTCCTC	ATATTTTCCAGAGCACAAG
Exon184	CAATCGCTATCCAAAATATCTTGG	CAGTGATTGTGAGGGGTACAGAC
Exon190	CAGAAGATCCAATTCCTC	ATATTTTCCAGAGCACAAG
Exon191-93	GGTTCGTATTATGATGGATTACG	GTACAACCTCTTAGGAGCTTCAG
Exon200-1	TAATTCCTTTGCAGTTGAAG	AAGTTATGAAGACCATTAGG
Exon203	CTTTCAAGTGCCTGAGGCTC	CAATATCAAACACAGCACCATG
Exon204-7	GACACCCTCATGGTGCTGTGTTTG	CATGTACCTTTTGTGGTGGGAC
Exon208-11	AGCCCCAGCTTCTAAAAGGG	CAAAATATAATACAACAACAAC
Exon214-15	GCAAATGAAGAAAGCTGAGAAG	GACAAGCCACAGTTGACATGAG
Exon217	CATGTAACCTGTACTGTTCTCTCAT	CAGATATCCCGATGACGCTATC
Exon218	CATGGTTCGAATGCTGCTTGATG	CAACACTCATGAGCCAGGACCAT
Exon219-20	GGAGCAACATCCTCTACATGCAT	ATCACAGATGAAATATGAAGCCATG
Exon221-23	GAAGTGATTTAGAAGGAGAGAGCT	CCTCCGAGTTGAAATGATACCTA
Exon224	TAGCTTGAGCTCTTCAGTCTCAG	CCAGAAAACATGCTAGTTTAGTAG
Exon225-26	TATCCAGCAGGCAGCCAAGTATG	GTTATTTCCCCTTAGGTACAAGAT
Exon227-28	ATCTTGACCTAAGAGGGGAATAAC	CCCCAATCTAGGATATAGATCCTG
Exon229-30	ATGACAGGGAATTCCTGCTTACT	GGGGTTGTTTTGGTAACACTGTGA
Exon231-32	ACTCAGGCAGATTAGAATGGAATC	GCATGACTGAACTAATAAACTGCAG
Exon233-34	CTGTTGAGGGTGAGTTGCTCAAC	AAGTGGACAGTGGATGAAGTCAG
Exon235-36	CCTGATACACCCCTGCATTGATC	TAAGGAGTTGGGCTGCTTTCATGC
Exon237-38	CTCAGAACTCTGTGAGTTGTGTC	GCATCCACTCTGACTTTCACCTG
Exon239	CTCTGTGATGCTGCTAGTTGGCT	AGTGGCAAATACAAGAGAGCCAG
Exon240	GCCAGTCCTGTGGCTTCTTGAAG	CAGCAGAAATCAGGCTAAAGGCG
Exon241	ACTAACCTGCACATTGTGCACATG	TTGAGAGTTGGCATTGTTCATGAG
Exon242	TTATCAAGCTAGGTATCCATCACT	CAGGTTAGGTCAGTGCAATACTAG
Exon243	AGTGATTTCAAAGTCAGTTGTAGTC	GTGGTGACCAGAGAAGTTGTGAC
Exon244-45	CACACTATGAAGCTTTGTTGGTTGC	CTCCAGATTCAAAGTGTCTTATCATC
Exon246-47	TGCTGGCAACTACAACCTGTCGAC	ATTCACCTTGACCAGAATGTGAC
Exon248-49	CAAGCCAACTATAATGTGCTTTGAC	ATAATCTTGTGGAGGCTGATGATC
Exon250	AGAAGACAGGAAGTCTCGTGCTAG	CTCAAGACACTTACTTTGTAGTGAG
Exon251-53	TTCTCTGCTATAAAGTTACTGTAGC	CACTAAGTAAAGTAGGCACAGCTG
Exon254-56	CAGACTGTGCCTACTTTACTTAGTG	CACTCACGAGTCACTGTTAATAGTC
Exon257	GACTATTAACAGTGAAGTGTGAGTG	GGTACTTAGCAGGTACCAAGTCAG
Exon258-59	CTGCAGTTTGTATCCCTGGTCATG	CCCCTGAGCAGGCAGTACATTACG
Exon260-61	CTGCTGAATGTACTGCCTGCTCAG	GGTTCATGTTAGAAGACATGACTC
Exon262-63	GTTGATAGTAAGAGAAGTGACACTG	TTAACTGCCACACTTTAGACTG
Exon264-66	CCAGTATATTATGATAATGACCACTG	CCTCTGTATTGGTCTTCCACCATC
Exon267-69	GCGACTACACCGAAATTGAGGACT	AGTCTCCAGGTCAATTGTTGGCTT
Exon270	ATTGGTGTGAGCGAGCCATCTGA	TGTCAGTGGTATCTACCTCAAGTC
Exon271-72	TTAGTAGTTGGGAGCCAAGGATGC	CCAGAAACTTGCATCAAGTGCTA
Exon273-74	TAATCCTACAGCGGAGGCAATGAC	CTAGCATACTGTTGCTGGTAACATC
Exon275-76	GAGTACCTCTTCCGTGTAAGAGCT	CAGTTCACAGCTGGAGGCTCTG
Exon277-78	ACTGTGGCTGAACCACAAGGTAC	GAATTCCTTTAACTACTACGCTAG
Exon279-80	AAGCTTCACAGACTTACTTTCTTAG	CGGCTGGAAGGAATCAACAGA
Exon281	CACGTTGAAGTATATGGTAAGTGAC	GATGTATTGTACCTGATAGTGATC
Exon282	GATCCACTATCAGGTACAATACATCT	CTTCCGATAGTCTATGTGAACATG
Exon283-85	GACTCCAGCACTTCATCAGCTTCA	GCCTGTATGAGATCGTTTACACTC
Exon286-88	GGAGTATTTATACTACAACCTGACTG	ATGTCTACATTCAAGCCATAGTACG
Exon289-91	CTGAGCTACAAGTCTGCCTACAGT	GGCTGCAAAGAGCCAGTATACGT
Exon292	AGACCCAGCGACTGCTAGAGATC	GGAAATAACTTGGCAGGAGTTATGC
Exon293-94	AGTTAAATAGGCTGCTGGTGATGC	ATGGATGCATGTCTTCTTTAGC
Exon295	TCCAGATGTTCCAGGTCCC	TCAAGTGAATGAAATGTACGGC
Exon296-97	AAGTGCTGGCATTACCACTCCTAG	GGAGGCTTCCAAGAGATAACCATG

Exon298-99	GTGGAGAACAGTACAGGCTCTAG	GTGGCTGCCAAGTTAGATCGACT
Exon300-1	CCTGATCTTCTAGAAGGATGTCAG	ATTTCACTGACTTCCAGATCTCTAG
Exon302-3	GTGACTCCAGTTGGTAGCAAGCT	ATTTACATCTAGCTCCACGGATG
Exon304_1	GTAGATGTTGACAAGACTGAAGTC	GCTTAGTCTGCAAGATTTTCAGC
Exon304_2	CTGGCTACTATATGGAAGCTCGA	GAAATTGTACAGTTCTCTTTGGTTAC
Exon304_3	CATGGCAAGTATATCATCTCAGCT	CACTCTGTTGACAGGGACCCATC
Exon304_4	CAGTCATAGCCAAAACCAAGTATG	CGGTGCACCACCATCATAGACTG
Exon305	GGATGACCTATATTTGATTAAGTGA	TCTCCGGAGGTTCTGCAAATGAC
Exon306-7	ATACTAGGTAAGTCCTTCCCTTAGC	ATGGTATTAGTATCTTGACCTTGCTA
Exon308	GTACTIONACTACAGGTTCTATGTAC	TTTAAAAGCCACTGTTCTCTACTGT
Exon309-10	CAAGCATTAAATTTGCACCAGTATAGC	GAGATGAAGACAAGGAAGATGTGAG
Exon311	CTCCAAAGATGGTTGCCGAGT	TACTACTCTGTGTCTTGGAGTC
Exon312	CTTCTGTTGAGCTGTTACTTAGC	TTATATAGTTGCCACAGTTGTATC
Exon313	CCATTCTTGAAGAAGCAGCATATG	GAATGTCTTCTCCACATTATTCTGT
Exon314-15	CCTATGCACAGAATTATTCTTATGAC	GACTCACAGAGCTGCGAGTTGTATC
Exon316	GGACCCTCAGTGAAGTGTTCATG	TAAAGTACCCACCCAGCTCTCCTA
Exon317	CCTGGTTAAGCCTAAAGCATAGTG	CCAGGAGTATCTGGATAAATAGTAG
Exon318-19	TTGTTGTGAAAGTGCTTGGTAAGTC	TTAAGTCAAGATCAGGAGCCACTG
Exon320-21	CACTCTTGTGCCACTCACTAGC	CAGATAATGTTATCGATAAGCACATG
Exon322-23	GTATAGATACTAGCAAGAATGACTAC	CAAGGACAATTGTTGGTGCTCTG
Exon324	GCAGGTGCTATCAGTGCTCCATC	GTTCTTAGTGACATTTGATACCTCTG
Exon325	AGACAGATTTGGTATGTAGAGCATG	TTTGAAGGTGGTCTGGAGGATC
Exon326_1	GAGGCTTCCAGATTCTGTTCTGATG	CGGTGCTCTTAGTTATGTCCATGA
Exon326_2	CTACATTGTAGAGAAACGTGAAGC	GTGGCTCATGCCAGCTAATTGTCA
Exon326_3	CCAGGCATCACATCAGCATGCAT	AGTGGAGGGAACCATGATAGTAC
Exon326_4	AGATTCAACAAGAAGGGATAGTGG	CACCTCAGGTGCAGGCCCTTCC
Exon326_5	CTGGATGCTGACCTGCGCAAAGT	CAGGCGTCCCTTATTGTCAAGTAGT
Exon326_6	AGACAAGTGAAGTGCCAGTGAT	AACCTTGAATGATCACCAGCATG
Exon326_7	TAACAGCTAGAGATGAGGTAGATC	CTGAAGATCTGGTTATGTCTATGAC
Exon326_8	GCTGCTGGACTTAGTGAACCAAG	CCAGGAGGTTGTGGCACTTCTG
Exon326_9	AGAGTCACAGCTGAGAATGAGTA	GTGTAGTTCTAGCAACAGTAGCAG
Exon326_10	GCTGCCAAATCACCAACTACATTG	CATGGACATCAGCCTCAAGTCTG
Exon326_11	CTGACAGTACTGGACCAATAACTG	GACCCTGAATTCATACTCATGATC
Exon326_12	CCATGACCGTCTGTTGAAACCGT	GGCTCCCATACCAGGAAGGCAG
Exon326_13	ACAGCAGTGGATCAAAGTCTGCT	ACTGGGCCAACTGGAGGTCCAG
Exon326_14	CAGCTACCTCAACTGTTTTGCAC	GTCTTCTACAAGTCCACTCATG
Exon326_15	ACCTGCCTATGATGGTGGTAGC	TCGGTACCTCCGTCGCTACTG
Exon326_16	GAATCTGGCCTGTTACGGCCTG	TTGGTGAGTCAAGAACTCTGACG
Exon326_17	GTCGTTCTGCGTGCAAGTGTAC	GAACTGTTATGGATCCAGCACTG
Exon326_18	GACTCTTAAAGAGACAACCTAGAGTC	ACGCTGATCTTCAGTAAGTTCAG
Exon326_19	TGGAGCTAAGATCACAGGATACAT	TTACACGCCACCATCTTAGGCTA
Exon326_20	CTATGACACTTTGCTGGTCAAGAC	AAAGCATTAAAGTGAATAACGACTA
Exon327	TGTGGGAGCCTTGGTTGGTTCAG	CCAGCTCTAACATATACAGTGTGAC
Exon328	TCCTGTTCTTATTAAGGAGCAACTAG	GATGGTGGTCCAGGTGTTGCTAC
Exon329-30	TGTGACTGTCAAACCTACCATACAGT	TTTCCTCAGACTCCAGCTAGTC
Exon331-32	TTAAGTCCCTGCACAACCTCACAGTC	AAGCATATGCACAGGTTAGCGTAG
Exon333-34	TGTTCTTGAAAGAATGCGAACATC	CAATCTCTGGTGCCTCTGTAGAC
Exon335_1	ACCTATAGAAATGAATGAACCTGTAC	TGGTACTTCAGCAGCCTTCACTG
Exon335_2	GGAGAAGACTCCATTCTTCTTTCAG	CACACTGCATTATCAAGAATAACAGT
Exon335_3	ATTAAGAATGCCAAGAAGGAGCATG	CAAGAAGATATGTAAGAAGGTGATGC
Exon336	GACCAATATGAGTTTGGGAGATTGA	AGAAAGACATAATTATCCACTTAGC
Exon337-38	TGGCCTTGATATGGCACTACTG	GTTATGTTGCTAGGTTCTGGAATGC
Exon339_1	CAGGCCACTTGATTCTGATCCAGT	ATTTCCATGCCACCATCAAACACTG
Exon339_2	CTGCAAGTGGCATCTCAAGACTCA	ACTTTCACGGTGAATGTGATTGACT
Exon339_3	GATATCCATACAACAGATTCCTTTCAG	CTCTGGGTTCACTATAGCCAGCAT
Exon339_4	CACACCAACAGCTAACTTTCACAGT	TGGCAGACACATGGTAGACCTCAG
Exon340	CTAGAATCAGCACCAATAATTGCTGA	TACTGTTGATCTTGTGACATCTGTCA
Exon341	AAGCTTCAAGACCTATAATGGCTCA	GGCTTTGGGTGGAGCTGTGACT
Exon342-43	CTGTCACTTGGCAGATGAATACG	CAGTCCCAACTTCTCAGGTATGC
Exon344	CAATTGTAGCCAGAACTCATTGAGT	ATGATCATGCAAATAAGCATGTGCT

Exon345-46	AAGAGCAATAATGCCTTTGTGAGTC	CATAGTTCCTTTCTAGAGAGGTGATC
Exon347	GACCTATGATTGATCACCTCTCTAG	AGAAAGATCGATTGTTGGCAACACT
Exon348-49	TGTACAAGACCTCAGAGGTATGTAC	GTTTAGAAACCTTAGAAAGACCACAG
Exon350	AGGAGGACTGGCAATGTTATAGTG	AAACGGACACAAGGGAACTTTACG
Exon351	GTTAACAGTCCGTTTCAACAACCTCA	TCTGATGACGCCACCTTGCCCTTAC
Exon352	GAAATGCTTGGTGAGACATATGATC	AAGCACACATGTATTAGAATACAGTC
Exon353	CCCTTGAAATCTGAGGAACCAGTC	AGGTTTCTCCCACTGTAGAGTGAC
Exon354	TCTGAACCAGTTGTTTGCAAAGATC	CTTGTCAATTTCTGTGTGTAC
Exon355	CTACATAAAATGTGACGATGTGCTCA	AGTTCTTCAATAGAGCTTCGATCAC
Exon356	GGAACAGTTGATGCCATCCTTGATG	ACTTGTACTTTATCTGAATCTTTGCTA
Exon357	AGCAAAGATTCAGATAAAGTACAAGTG	TGTATCTTAGCTGGAACGTATCAG
Exon358_1	ATCATCAAGTTGAGGCTAAATGAGT	ACTCACACGCCCAAGATCTTCAG
Exon358_2	GAAGATAAGACCAGAGCTATGAAC	GAGAGCCTCCGATGCTGTACG
Exon358_3	CCAACAGATCATTGAGAATATCATG	CCCTTGTCTGACTCAAATGTGTAC
Exon358_4	GACAGCTTATGTAGGTGAAAATGTC	GGTCTTCTTCTATGGTAGTCTGC
Exon358_5	CGGCTGTAAGCACCAAGACTGT	GTTTCGCTTTTGTATTCTGAGAGATG
Exon358_6	GCTAGTACAAGTTATGCAGAACTG	CACTGTCATCAGTATGACAGTCCAG
Exon358_7	GCTCGCACAGGTACCATGTG	GACTCTTGGTGGTATGTCACAG
Exon358_8	GAGATCTCTTCAGTCCAGGCTTC	CCTCCTTGTGTAATGGCCTGTAG
Exon359	TGCAGTTAAGGCTACTGGAGAAC	ATGTGTGTTTCTGCTTTGGGTAC
Exon360-61	CCTACATTGCATGAAGAAGTTGACT	GAATTCACATCAGTTGGCTGTCC
Exon362-63	CTGTAAGTCAGCGTCATATGTCATC	CAGTTCAGAAAGATTAGTCCCGTGTG

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

COEP- ETIC 580-4

Pesquisa: Parkinsonismo e Distonia Familiares

1. Introdução

O objetivo do nosso estudo será avaliar, a partir de questionário, exame neurológico e estudo molecular, as características clínicas e genéticas do parkinsonismo e da distonia familiares. Este estudo é um projeto de pesquisa da Clínica de Distúrbios do Movimento da UFMG e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais que se situa na Av Afredo Balena 110, 1º andar. Os responsáveis pelo projeto são o Prof. Dr. Francisco Cardoso e a Dra. Sarah Teixeira Camargos.

2. Procedimento:

Caso o Sr.(a) aceite participar, irá se submeter à seguinte rotina:

- ◆ Proceder às perguntas de praxe da consulta, ao exame neurológico, além da coleta de 05 mL de sangue em veia anticubital com material estéril.

3. Benefício

Os dados coletados servirão para definir melhor as características dessas doenças, tentar determinar causadores genéticos e, com melhor conhecimento desses dados, melhorar a terapêutica e oferecer aconselhamento genético.

4. Possíveis riscos

A pesquisa consistirá em algumas perguntas no exame neurológico, além da coleta de 5 mL de sangue venoso. Os riscos são aqueles inerentes ao processo de coleta de sangue para exame: formação de hematomas e leve dor local. Esses riscos serão minimizados por pessoal experiente na coleta.

Uso do material:

O uso do material biológico (sangue) será exclusivamente para esta pesquisa, não sendo utilizado para qualquer outro fim.

5. Confidenciabilidade

Os dados obtidos neste estudo serão divulgados na forma de números por análise estatística e os nomes dos pacientes serão mantidos em estrito sigilo.

6. Participação

A sua participação é voluntária e não lhe acarretará ônus. Se o(a) Sr(a) não desejar fazer parte deste grupo, não haverá qualquer mudança na sua relação com o seu médico. Na eventualidade de ocorrerem dúvidas, entre em contato com um dos médicos responsáveis pelo projeto, pelo número 3248.9540 ou no Ambulatório Bias Fortes, situado na Alameda Álvaro Celso, 6º andar.

Caso aceite participar, pedimos para assinar e datar este documento

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__

Paciente

Testemunha

APÊNDICE B – Publicações

Your article (# 21842) from "Movement Disorders" is available for download

=====

Movement Disorders Published by John Wiley & Sons, Inc.

Dear Author,

Your page proofs are now available in PDF format, and are ready for your corrections. John Wiley & Sons has made this article available to you online for faster, more efficient editing. Please follow the instructions below to make your corrections as soon as possible.

Alternatively, if you would prefer to receive a paper proof by regular mail, please contact Teresa Beard (e-mail: beardt@cadmus.com; phone: 1-800-238-3814 (ext. 602) or 717-721-2602). Be sure to include your article number.

First, make sure you have a copy of Adobe Acrobat Reader software. This is free software and is available on the web (<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>). Or, if you have the Notes annotation tool (not contained within Acrobat reader), you can make corrections electronically and return them to Wiley as an e-mail attachment (see the Notes tool instruction sheet).

Open your web browser, and enter the following web address:

<http://rapidproof.cadmus.com/RapidProof/retrieval/index.jsp>

You will be prompted to login, and asked for a password. Your login name will be your email address, and your password will be ----.

Example:

Login: your e-mail address

Password: ----

The site contains one file, containing:

- Author Instructions Checklist
- Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet
- Reprint Order form
- Return fax form
- A copy of your page proofs for your article

Print out this file, and fill out the forms by hand. (If you do not wish to order reprints, please mark a "0" on the reprint order form.) Read your page proofs carefully, and:

- indicate changes or corrections in the margin of the page proofs
- answer all queries (footnotes A,B,C, etc.) on the last page of the PDF proof
- proofread any tables and equations carefully
- check that any Greek, especially "mu", has translated correctly
- Check your figure legends for accuracy

You will receive hard copies of your color figure proofs by regular mail, and will be asked to check these for quality and color-matching. If the quality of the figures is unacceptable at that point, good quality hard copies (not electronic copies) of your original figures must be sent back to me.

Within 48 hours, please fax, email or mail to the address given below:

- 1) Page proofs with corrections
- 2) Hard copy figures and/or TIFF or EPS files of figures for correction (if necessary)
- 3) Reprint Order form
- 4) Return fax form

Return to:

Steven Kyritz
Associate Production Editor
John Wiley & Sons
111 River Street
Hoboken, NJ 07030

Tel: (201) 748-6808
Fax: (201) 748-6182
e-mail: skyritz@wiley.com

Technical problems? If you experience problems downloading your file or any other problem with the website listed above, please contact:

Teresa Beard (beardt@cadmus.com, or 1-800-238-3814 (ext. 602) or 717-721-2602).

Questions regarding your article? Please don't hesitate to contact me with any questions about the article itself, or if you have trouble interpreting any of the questions listed at the end of your file. **REMEMBER TO INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (# 21842) WITH ALL CORRESPONDENCE.** This will help both of us address your query most efficiently.

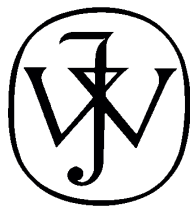
As this e-proofing system was designed to make the publishing process easier for everyone, we welcome any and all feedback. Thanks for participating in our new e-proofing system!

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Steven Kyritz
Associate Production Editor
John Wiley & Sons
111 River Street
Hoboken, NJ 07030

Tel: (201) 748-6808
Fax: (201) 748-6182
e-mail: skyritz@wiley.com



WILEY

Publishers Since 1807

111 RIVER STREET, HOBOKEN, NJ 07030

ELECTRONIC PROOF CHECKLIST, MOVEMENT DISORDERS

IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

- This will be your only chance to review these proofs.
- Please note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only.

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

- Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY (Color figures will be sent under separate cover.)

- Check size, numbering, and orientation of figures.
- All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.
- Review figure legends to ensure that they are complete.
- Check all tables. Review layout, title, and footnotes.

COMPLETE REPRINT ORDER FORM

- Fill out the attached reprint order form. It is important to return the form even if you are not ordering reprints. You may, if you wish, pay for the reprints with a credit card. Reprints will be mailed only after your article appears in print. This is the most opportune time to order reprints. If you wait until after your article comes off press, the reprints will be considerably more expensive.

RETURN

- PROOFS**
 REPRINT ORDER FORM
 CTA (If you have not already signed one)

**RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO Steven Kyritz at
201-748-6182**

QUESTIONS?

Steven Kyritz, Associate Production Editor

Phone: 201-748-6808

E-mail: skyritz@wiley.com

Refer to journal acronym and article production number (i.e., MDS 20000 for *Movement Disorders* ms 20000).

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users – NOTES tool

NOTE: ADOBE READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 6.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.
2. Go to Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 6.0) or Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 7.0) check “Always use login name for author name” option. Also, set the font size at 9 or 10 point.
3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox (Acrobat 6.0) and click to display note text to be changed, or Comments/Add Note (in Acrobat 7.0).
4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**
5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.
6. When you have completed the corrections to your article, go to Document/Export Comments (in Acrobat 6.0) or Comments/Export Comments (in Acrobat 7.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**
7. **When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.**
8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to Document/Import Comments and import the NOTES file you saved. Make changes and reexport NOTES file keeping the same file name.
9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.



REPRINT BILLING DEPARTMENT • 111 RIVER STREET • HOBOKEN, NJ 07030
 PHONE: (201) 748-8789; FAX: (201) 748-6326; E-MAIL: reprints@wiley.com

Please complete this form even if you are not ordering reprints.

This form MUST be returned with your corrected proofs and original manuscript. Your reprints will be shipped approximately 4 weeks after publication. Reprints ordered after printing are substantially more expensive.

JOURNAL: MOVEMENT DISORDERS Volume: _____ Issue: _____

TITLE OF MANUSCRIPT: _____

MANUSCRIPT NUMBER: _____ No. pages: _____ 1st Author: _____

REPRINTS 8 1/4 X 11

No. of pages	100 Reprints	200 Reprints	300 Reprints	400 Reprints	500 Reprints
	\$US	\$US	\$US	\$US	\$US
	\$US	\$US	\$US	\$US	\$US
1-4	336	501	694	890	1052
5-8	469	703	987	1251	1477
9-12	594	923	1234	1565	1850
13-16	714	1156	1527	1901	2273
17-20	794	1340	1775	2212	2648
21-24	911	1529	2031	2536	3037
25-28	1004	1707	2267	2828	3388
29-32	1108	1894	2515	3135	3755
33-36	1219	2092	2773	3456	4143
37-40	1329	2290	3033	3776	4528

REPRINTS ARE ONLY AVAILABLE IN LOTS OF 100. IF YOU WISH TO ORDER MORE THAN 500 REPRINTS, PLEASE CONTACT US AT (201) 748-8789 FOR A PRICE QUOTE.

COVERS

100 Covers:	\$90	200 Covers:	\$145	300 Covers:	\$200
400 Covers:	\$255	500 Covers:	\$325	Additional 100s:	\$65

- Please send me _____ reprints of the above article at \$ _____
 Please send me _____ Generic Covers of the above journal at \$ _____

Please add appropriate State and Local Tax {Tax Exempt No. _____}

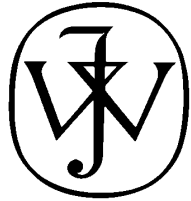
Please add 5% Postage and Handling

TOTAL AMOUNT OF ORDER**

**International orders must be paid in US currency and drawn on a US bank

- Please check one: Check enclosed Bill Me Credit Card
 If credit card order, charge to: American Express Visa MasterCard Discover
 Credit Card No. _____ Signature: _____ Exp. Date: _____

BILL TO: Name: _____ Address/Institution: _____
SHIP TO: Name: _____ Address/Institution: _____
 Phone: _____ Fax: _____
Purchase order no: _____ **E-mail:** _____



WILEY

Publishers Since 1807

Movement Disorders

111 RIVER STREET, 8TH FLOOR, HOBOKEN, NJ 07030

Telephone Number:

☎ Facsimile Number:

To: Steven Kyritz

Fax: 201-748-6182

From: _____

Date: _____

Re: _____

Pages (including
cover sheet) _____

Message:

AQ: 1

Brief Reports

Novel *GCHI* Mutation in a Brazilian Family with Dopa-Responsive Dystonia

AQ: 2

Sarah Teixeira Camargos,¹ Francisco Cardoso,¹
 Parastoo Momeni,^{2,3} Juliana Gurgel Gianetti,¹
 Andrew Lees,⁴ John Hardy,^{2,5} and Andrew Singleton^{2*}

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Clinical and Neurological Sciences, Movement Disorders Group, Brazil; ²Laboratory of Neurogenetics, National Institutes on Aging, National Institutes of Health, Maryland, USA; ³Department of Neurology, Texas Tech University Health Sciences Center, Texas, USA; ⁴Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies, University College London, London, United Kingdom; ⁵Department of Molecular Neuroscience, Institute of Neurology, Queen Square, London, United Kingdom

Abstract: Dopa responsive Dystonia (DRD) was first described in 1971 and typically begins at childhood with gait dysfunction caused by foot dystonia progressing to affect other extremities. There is marked diurnal fluctuation and sustained improvement of symptoms with low dose levodopa therapy. Heterozygous mutation of the gene *GCHI* has been shown to cause DRD. We studied *GCHI* in nine patients with DRD from six families of Federal University of Minas Gerais Movement Disorders Clinic. We identified three mutations; two affected siblings carried a novel T209P mutation and two siblings from another family were compound heterozygous carriers of Met211Val and Lys224Arg mutations. To our knowledge this is the first report of *GCHI* mutations underlying DRD in patients from Brazil. © 2007 Movement Disorder Society

Key words: dopa-responsive dystonia; Segawa disease; *GCHI*; GTP-cyclohydrolase; Brazilian families.

In 1971, Segawa et al.¹ described a novel dystonia distinct from other types of dystonia and Parkinson's disease. Commonly, the disease begins at childhood with gait dysfunction caused by foot dystonia, which in sev-

eral years spreads to other extremities. Notably, the disorder affects more women than men and there is diurnal fluctuation in addition to a marked and sustained response to low therapeutic doses of levodopa. Both familial and sporadic cases of dopa responsive dystonia (DRD) have been described. The familial form of the disease usually manifests in an autosomal dominant mode of inheritance with a mutation penetrance of ~35%.² DRD is typically caused by heterozygous mutations in *GCHI* located at 14q22.1-22.2. The protein product of *GCHI*, GTP cyclohydrolase I, is the rate-limiting enzyme involved in the conversion of GTP to tetrahydrobiopterin, a cofactor for tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine synthesis. It has been suggested that the quantitative reduction of the enzyme is responsible for the dominant negative inheritance in DRD.^{3,4} The lack of dopamine due to the enzyme deficiency can produce a broad phenotypic spectrum including DRD, parkinsonism, spastic paraplegia, and severe athetosis mimicking cerebral palsy.⁵

In an attempt to define the role of *GCHI* mutations in DRD cases from Brazil, we sequenced the coding exons of this gene in a series of 6 families with this disease. Patients and families were recruited with approval of the ethical committee and informed consent. We assessed DNA from 7 typical DRD patients (2 females and 5 males) from 6 unrelated families (Table 1). The average age at onset was 5.1 ± 2 years. All patients exhibited diurnal fluctuation and exceptional L-dopa response (180 ± 100 mg daily). Imaging studies were normal. In all cases, the first symptom was walking disability progressing to generalized dystonia. DNA was extracted from peripheral lymphocytes drawn from these subjects using routine procedures. Amplification of *GCHI* exons by polymerase chain reaction was performed using primer pairs previously described.⁶ Each PCR amplification reaction was performed in a total volume of 15 μ L containing 20 ng of genomic DNA, 5 pmol of forward and reverse primers, 5U of FastStart TaqDNA polymerase (Roche) containing all of the required buffers and dNTPs. Thermal cycling was performed using a standard 60–50 touchdown PCR program. Five microliters of each PCR product was electrophoresed on a 2% agarose gel containing ethidium bromide and visualized by UV transillumination. Following confirmation that the nega-

T1

*Correspondence to: Andrew Singleton, Laboratory of Neurogenetics, National Institutes on Aging, National Institutes of Health, MD
 E-mail: singleta@mail.nih.gov

Received 3 May 2007; revised 17 July 2007; accepted 15 October 2007

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/mds.21842

TABLE 1. Clinical and genetic data of the Brazilian patients

ID	Age at onset (yr)	Localization of first symptom	Progression	Consanguinity	Family history	Image	L-dopa dose/day (mg)	Mutation
ENSC25	4	Right foot	Hemidystonia	No	Negative	MRI – normal	375	—
JBOF37	7	Feet, hands, and slurred speech	Generalized	No	One sister affected	MRI – normal	125	Met211Val, Lys224Arg
JCO59	4	Feet and slurred speech	Generalized	No	One brother affected	MRI – normal	250-625	Met211Val, Lys224Arg
TAS58	8	Feet	Generalized	No	Negative	CT scan – normal	125	Thr209Pro
TCF64	4	Feet	Generalized	Yes	Negative	CT scan – normal	250	Thr209Pro
SA65	7	Feet	Generalized	No	Two brothers affected	CT scan – normal	125	—
MSC115	2	Atethosis?	Generalized	No	No	MRI – normal	30	—

tive control was clean, the PCR products were purified by filtration on 96 well plates (Millipore). The product was then used as template in a dye-terminator sequencing reaction performed as per the manufacturer’s protocol (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA). Each product was sequenced in both forward and reverse directions with the primers used for initial amplification. The resulting products were filter purified as above and run on an ABI3730XL; all data was analyzed using Sequencher (GeneCodes Corporation). Mutation of the genes encoding parkin and torsinA was ruled out by direct sequencing and gene dosage (parkin) and restriction digest (torsinA) (unpublished data).

We identified a novel mutation c.625A>C in exon 5 in two siblings (*TAS58* and *TCF64*), which resulted in an amino acid change, Thr209Pro (all nucleotide positions based on NCBI GI:66932966; all protein positions based on NCBI GI:4503949). In a separate family, we identified two coding mutations in two affected siblings, *JBOF37* and *JCO59*. Both mutations (c.631A>G and c.671A>G) were located within exon six and they resulted in amino acid substitutions Met211Val and Lys224Arg (see Fig. 1). In an attempt to define whether these mutations were in *cis* or in *trans*, we digested the PCR product with the restriction enzyme *PmII* (New England BioLabs) following the manufacturers instructions. We ran the digested product in a 3% agarose gel, extracted the bands using QIAquick Gel Extraction Kit and sequenced each allele. These experiments showed that the c.631A>G and c.671A>G mutations are on *trans* alleles (Fig. 1). Sequence analysis of *GCHI* exon 6 in 184 neurologically normal control samples (panels *NDPT002* and *NDPT009* from the NINDS Neurogenetics Repository at Coriell Research Laboratories) failed to reveal the presence of the c.625A>C, c.631A>G or c.671A>G mutations.

To our knowledge this is the first molecular study of Brazilian DRD cases. We identified a compound heterozygous mutation (Met211Val and Lys224Arg) in one family (brother and sister). Met211Val was firstly described by Bandmann et al. as a homozygous mutation in a patient with atypical phenylketonuria.⁷ The Lys224Arg mutation has been described in several subjects, with clinical presentations including athetoid cerebral palsy, myoclonus dystonia, Parkinson’s disease, and typical DRD.^{8–11} The Lys224Arg mutation has also been found as a compound heterozygous mutation with a Gly108Asp *GCHI* mutation.¹⁰ Thus these two mutations have both previously been described as components of homozygous or compound heterozygous mutations; but not previously in combination. Our patients who possessed both the Lys224Arg and Met 211Val mutations present with a typical, but severe, DRD phenotype. The presence of previously reported mutations raises the possibility

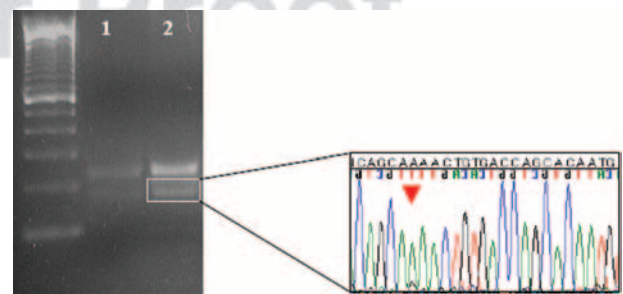


FIG. 1. Analysis of exon 6 PCR products (lanes 1 and 2) from affected family member *JBOF37*. Restriction enzyme digestion of this product with *PmII* cut the c.631G allele (the 211Val mutant) at base pair 60 of a 216 bp PCR product. The 156 bp product was excised from an agarose gel (bounded by a white box) and sequenced. This showed the presence of the wild type allele Lys224 (c.671A; noted by the red arrow), demonstrating that the Met211Val and Lys224Arg mutations exist *in trans*.

that either these mutations have arisen independently or that the current patients and those described previously share a common founder.

We also report a novel heterozygous *GCH1* mutation, Thr209Pro, in two apparently unrelated families. The absence of this mutation in 368 control chromosomes, the conserved nature of the affected residue across species and the segregation with disease within a family all support the notion that this is a true pathogenic variant.

We have found *GCH1* mutations in 57% of typical DRD patients examined; a prevalence similar to that reported by others.^{7,14} In all cases, the parents of affected subjects were examined and found to be free of neurological symptoms; this absence of symptoms reflects either the well described reduced penetrance of DRD or the requirement, in some cases, of two *GCH1* mutations to cause disease. All cases, including both *GCH1* mutation positive and negative subjects, showed excellent and sustained response to L-dopa treatment and an absence of dyskinesias. The occurrence of DRD patients without missense *GCH1* mutations suggests that the underlying cause in these cases may be either other mutations within *GCH1* that are undetectable by sequencing,^{12,13} mutation at other loci, or that these cases are not caused by genetic lesion.

AQ: 3
Acknowledgments: We thank the families for taking part in this research. This work was supported in part by the Intramural Program of the National Institute on Aging, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, USA. This study used samples from the NINDS Repository (at Coriell, <http://ccr.coriell.org/ninds/>) as well as clinical data. NINDS Repository sample numbers are listed in the methods.

REFERENCES

1. Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation *Adv Neurol* 1976;14:215–233.
2. Nygaard TG, Trugman JM, de Yebenes JG, Fahn S. Dopa-responsive dystonia: the spectrum of clinical manifestations in a large North American family. *Neurology* 1990;66:66–69.
3. Ichinose H, Ohye T, Yokochi M, Fujita K, Nagatsu T. GTP cyclohydrolase I activity in mononuclear blood cells in juvenile parkinsonism. *Neurosci Lett* 1995;190:140–142.
4. Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, Ichinose H. Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase. I. Relationship to etiology of dopa-responsive dystonia. *J Neurochem* 1999;73:2510–2516.
5. Bandmann O, Nygaard TG, Surtees R, Marsden CD, Wood NW, Harding AE. Dopa-responsive dystonia in British patients—new mutations of the GTP cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1996;5:403–406.
6. Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 1994;8:236–242.
7. Bandmann O, Valente EM, Holmans P, et al. Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. *Ann Neurol* 1998;44:649–656.
8. Bandmann O, Daniel S, Marsden CD, Wood NW, Harding AE. The GTP-cyclohydrolase I gene in atypical parkinsonian patients: a clinico-genetic study. *J Neurol Sci* 1996;141:27–32.
9. Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, Cardona F, Artiola C, Antonozzi I. Autosomal dominant GTP-CH deficiency presenting as a dopa-responsive myoclonus-dystonia syndrome. *Neurology* 1998;51:1241–1243.
10. Furukawa Y, Kish SJ, Bebin EM, et al. Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Ann Neurol* 1998;44:10–16.
11. Garavaglia G, Invernizzi F, Agostoni Carbone ML, et al. GTP-cyclohydrolase I gene mutations in patients with autosomal dominant and recessive GTP-CH1 deficiency: identification and functional characterization of four novel mutations. *J Inher Metab Dis* 2004;27:455–463.
12. Klein C, Hedrich K, Kabakci K, et al. Exon deletions in the *GCH1* gene in two of four Turkish families with dopa-responsive dystonia. *Neurology* 2002;59:1783–1786.
13. Hagenah J, Saunders-Pullman R, Hedrich K, et al. High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive *GCH1* screening. *Neurology* 2005;64:908–911.

Author Proof

AQ1: Kindly provide the degrees/educational qualifications of all the authors.

AQ2: Kindly check whether the short title is OK as given.

AQ3: Reference 14, cited here, is not detailed in the list of references (there being a total of only 13 reference citations in entire manuscript). So kindly provide the same, but also renumber the citations as well as the list of references so that they are sequential.

T1



Author Proof

DYT16, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress-response protein PRKRA



Sarah Camargos, Sonja Scholz, Javier Simón-Sánchez, Coro Paisán-Ruiz, Patrick Lewis, Dena Hernandez, Jinhui Ding, J Raphael Gibbs, Mark R Cookson, Jose Bras, Rita Guerreiro, Catarina Resende Oliveira, Andrew Lees, John Hardy, Francisco Cardoso, Andrew B Singleton

Summary

Background Dystonia and parkinsonism may present as part of the same genetic disorder. Identification of the genetic mutations that underlie these diseases may help to shed light on the aetiological processes involved.

Methods We identified two unrelated families with members with an apparent autosomal recessive, novel, young-onset, generalised form of dystonia parkinsonism. We did autozygosity mapping and candidate gene sequencing in these families.

Findings High-density genome-wide SNP genotyping revealed a disease-segregating region containing 277 homozygous markers identical by state across all affected members from both families. This novel disease locus, designated *DYT16*, covers 1.2 Mb at chromosome 2q31.2. The crucial interval contains 11 genes or predicted transcripts. Sequence analysis of every exon of all of these transcripts revealed a single disease-segregating mutation, c.665C>T (P222L), in the stress-response gene *PRKRA*, which encodes the protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator.

Interpretation We describe a mutation within the gene *PRKRA* that segregates with a novel, autosomal recessive, dystonia parkinsonism syndrome. These patients have progressive, generalised, early-onset dystonia with axial muscle involvement, oromandibular (sardonic smile), laryngeal dystonia and, in some cases, parkinsonian features, and do not respond to levodopa therapy.

Introduction

Dystonia is defined by the presence of sustained involuntary muscle contraction, often leading to abnormal postures. The aetiology of dystonia is complex and the underlying cause may be a molecular or an anatomical abnormality. To date, 15 genetic loci have been associated with dystonia (*DYT1–DYT15*) and the underlying genetic mutations have been identified in six of these loci (*DYT1*, *DYT3*, *DYT5*, *DYT8*, *DYT11*, and *DYT12*).^{1–6} The identification of the associated genes and subsequent work aimed at defining the molecular pathways affected by dysfunction at these loci have implicated dopaminergic systems and stress-response pathways in the disease process.

The association of dystonia with dopaminergic dysfunction, such as that seen in patients with *GCH1* mutations (*DYT5*) in whom dystonic symptoms are remarkably amenable to low-dose levodopa therapy, for dystonias in which parkinsonism is a prominent feature (X-linked recessive dystonia parkinsonism, *DYT3*; rapid-onset dystonia parkinsonism, *DYT12*), or for patients with young-onset Parkinson's disease (PD), in whom dystonia is a common feature, suggests that parkinsonism and dystonia may be biochemically or anatomically related.

The application of genome-wide single nucleotide polymorphism (GWSNP) genotyping assays gives us the opportunity to do fast and accurate genotyping; in the

context of monogenic diseases, the coverage of these approaches is particularly suitable for autozygosity mapping in recessive diseases.⁷ With this approach in mind we present the results of GWSNP genotyping in patients from Brazil with young-onset generalised dystonia parkinsonism. The pattern of inheritance and family structure suggest an autosomal recessive mode of inheritance in these families.

Methods

Participants and procedures

Families DYT16-1 and DYT16-2 were identified by two investigators (FC and SC) at the Movement Disorders Clinic at the Federal University of Minas Gerais (FUMG), Brazil. These families shared singular dystonic features (table); both families stated parental consanguinity. Family members were questioned about the presence of additional affected members outside the nuclear family; however, no additional affected family members were reported and building of a family tree failed to link these two families genealogically. Because the inheritance pattern observed in these families was consistent with an autosomal recessive mode of inheritance and because several affected members were available from both families, these individuals were selected for autozygosity mapping.

In addition, FC and SC collected blood samples from 45 patients with young-onset PD (age at onset 18–40 years),

Published Online
February 4, 2008
DOI:10.1016/S1474-4422(08)70022-X

See Online/Reflection and
Reaction
DOI:10.1016/S1474-4422(08)70023-1

Laboratory of Neurogenetics,
National Institute on Aging,
National Institutes of Health,
Bethesda, Maryland, USA
(S Camargos MD, S Scholz MD,
J Simón-Sánchez MS,
C Paisán-Ruiz PhD,
D Hernandez MS, J Bras MS,
R Guerreiro MS,
A B Singleton PhD, P Lewis PhD,
M R Cookson PhD, J Ding PhD,
J R Gibbs BA); Movement
Disorders Clinic, Neurology
Service, Hospital das Clínicas,
Belo Horizonte, and
Department of Internal
Medicine, Faculty of Medicine,
Federal University of Minas
Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil
(S Camargos, F Cardoso MD);
Institute of Neurology,
London, UK (S Scholz,
C Paisán-Ruiz, P Lewis, J R Gibbs,
A Lees MD, J Hardy PhD); and
Center for Neuroscience and
Cell Biology, University of
Coimbra, Coimbra, Portugal
(J Bras, R Guerreiro,
C Resende Oliveira MD)

Correspondence to:
Andrew B Singleton,
Laboratory of Neurogenetics,
National Institute on Aging,
National Institutes of Health,
35 Convent Drive
20892 Bethesda, MD, USA
singletona@mail.nih.gov

	Family	Age at onset (years)	First symptom	Generalised dystonia	Burke-Fahn-Marsden scale score	Parkinsonism	UPDRS motor score	Pyramidal signs
Patient 2035-1	DYT16-1	11	Lower limb dystonia	Severe	96	Absent	0	No
Patient 2035-2	DYT16-1	12	Lower limb dystonia	Moderate	58	Present	21	Yes
Patient 2035-3	DYT16-1	2	Lower limb dystonia	Moderate	36	Absent	0	Yes
Patient 2035-11	DYT16-2	11	Upper limb dystonia	Severe	64	Present	21	No
Patient 2035-12	DYT16-2	2	Spasmodic dysphonia	Slight	14	Present	30	No
Patient 2035-119	DYT16-2	18	Lower limb dystonia	Moderate	44	Present	18	No
Patient 2035-61	..	7	Upper limb dystonia	Severe	103	Absent	19	Yes

UPDRS=Unified Parkinson's disease rating scale.

Table: Summary of clinical characteristics in PRKRA mutation-positive patients

12 apparently unrelated patients with young-onset dystonia (age at onset 8–42 years), and 83 Brazilian neurologically healthy controls (age at sampling 25–50 years) from the FUMG Movement Disorders Clinic.

439 North American neurologically healthy controls and 249 North American caucasian patients with early-onset PD were selected from DNA sample plates at the US National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) neurogenetics repository (control sample plates NDPT002, NDPT006, NDPT009, NDPT022, NDPT023, and NDPT024, age at sampling 55–95 years; case sample plates NDPT014, NDPT015, and NDPT016, age at onset 7–52 years).

738 samples from the Human Genome Diversity Project DNA panel were also used. The samples assayed included 44 Brazilian samples, and the remaining samples represented diverse populations from across this panel (sample details available on request).

426 Portuguese neurologically healthy control samples (age at sampling 29–85 years) were collected from the Coimbra University Hospital in Portugal. Each patient was examined by a neurologist before sample collection.

All patients from families DYT16-1 and DYT16-2 had a CT scan. An MRI scan was done in patient 2035-1 from DYT16-1 and patient 2035-11 from DYT16-2. MRI scans were done on a 0.2 T system (Magnetom P8, Siemens, Erlanger, Germany). The study protocol included a sagittal and axial T1 turbo spin-echo, coronal T1 gradient echo, coronal and axial T2 turbo spin-echo, double-echo PD-T2-weighted, and an axial and coronal T1 turbo spin-echo after gadolinium contrast injection. The parameters of conventional MR imaging were as follows: 256×192 matrix, 25 cm field of view, and 5 mm slice thickness with 1 mm intersection gap.

All genomic DNA samples collected were extracted from whole blood by use of standard methods.

All participants gave their informed consent and each study was approved by a local ethics board.

Genetic analyses

On the basis of the number of affected family members and DNA availability, two families (DYT16-1 and

DYT16-2) were selected for autozygosity mapping from a collection of Brazilian patients with generalised dystonia. Genomic DNA from all available family members was extracted from whole blood by use of standard methods, and genotyped with the HumanHap550 SNP genotyping chips (version 1 and version 3; Illumina Inc, San Diego, CA, USA), which can assay more than 555 000 individual SNPs. Genomic DNA from patient 2035-61 was also assayed with this method. Genotyping was done according to the manufacturer's protocol (Illumina Inc) by use of 750 ng genomic DNA. Data was analysed with BeadStudio v3 (Illumina Inc). Raw genotype data were processed and stored in the GERON Genotyping database (see margin link), which is an intranet genotype data repository designed to handle SNP genotypes produced on the Illumina platform. Initial autozygosity mapping was done using Tracker (version 0.99), an in-house tool developed to help visualisation of contiguous tracks of homozygosity segregating with disease. After the identification of all homozygous tracks within affected individuals, genotypes were exported from BeadStudio (Illumina Inc.) and compared for identity by state (ie, stretches of identical genotype) across all six affected family members.

Affected family members from both families (DYT16-1 and DYT16-2) were screened for missense mutations in *PRKN* (linked to young-onset PD), *ATPIA3* (linked to rapid-onset dystonia parkinsonism; *DYT12*), and *GCH1* (linked to levodopa-responsive dystonia; *DYT5*) by direct sequencing of exons and flanking intronic sequence, as previously described.^{8–10} The *TOR1A* ΔGAG mutation (linked to primary torsion dystonia; *DYT1*) was screened in both families by the sequencing of this exon in *TOR1A*.¹¹ Copy number mutations in *PRKN* (alias *PARK2*) were screened by real-time polymerase chain reaction, as previously described.¹⁰ An affected family member of DYT16-2 had previously been screened for missense mutations in *LRRK2* (alias *PARK8*), *PINK1* (alias *PARK6*), and *SNCA* (alias *PARK1*), in addition to whole-gene multiplication mutation of *SNCA*.¹²

Genes and predicted transcripts between flanking recombinant markers rs1434087 and rs10497541 and

For more on sample ascertainment and preparation see the Coriell Institute website <http://ccr.coriell.org/ninds/>

For the Human Genome Diversity Project see <http://www.cephb.fr/HGDP-CEPH-Panel/>

For the GERON Genotyping database see <http://neurogenetics.nia.nih.gov>

between rs1518709 and rs10930936 were identified by the mining of the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Ensembl datasets (figure 1). Primers were designed to allow amplification and sequencing of all coding exons and at least 30 bp of flanking intronic sequence. The coding exons for *OSBPL6*, *PRKRA*, *DFNB59*, *FKBP7*, *PLEKHA3*, *TTN*, *FLJ39502*, *SESTD1*, *LOC728984*, *LOC644776*, *ZNF533*, and *LOC729001* were sequenced (webtable 1).

We analysed the c.665C>T (P222L) mutation by direct sequencing of *PRKRA* exon 7. The exon was amplified and sequenced with primer pair x7F-*PRKRA* 5'AATGTTGTCTTGTGTTAAATTG3' and x7R-*PRKRA* 5'TACTATCCACAAGAATGGG3'. PCR amplification was done in 15 μ L aliquots and contained 25 ng genomic DNA, 10 pmol forward and reverse primers, and 6 μ L FastStart PCR Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). This exon was sequenced in 439 North American caucasian neurologically healthy controls (plates NDPT002, NDPT006, NDPT009, NDPT022, NDPT023, and NDPT024 from the NINDS neurogenetics repository), 426 Portuguese neurologically healthy controls, 83 Brazilian neurologically healthy controls, 738 population samples of the Human Genome Diversity Project DNA panel (including 44 Brazilian participants), 249 North American white patients with early-onset PD from the NINDS neurogenetics repository, 45 patients with young-onset PD from Brazil, and 12 apparently unrelated patients from Brazil with young-onset generalised dystonia. In addition, all coding exons of *PRKRA* were sequenced in these 12 patients, as described above.

Role of the funding source

The sponsor of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Patient 2035-1 (family DYT16-1) was 32 years old. Until 11 years of age he was described as neurologically healthy; he then developed a gait disturbance and pain in the lower limbs. After 2 years, the symptoms spread, causing a swallowing disturbance. He was placed on medication (biperiden up to 24 mg daily and levodopa/carbidopa 125 mg/12.5 mg three times daily) without significant improvement. Physical examination showed mildly high blood pressure. Neurological examination showed a marked generalised dystonia with severe retrocollis and opisthotonic posture. At the time of this study, the patient scored 96 on the Burke-Fahn-Marsden scale, with a disability score of 26.¹³ Botulinum toxin injection of the muscles of the neck (splenii capitis) was attempted with no response. There were no corticospinal tract signs or parkinsonism.

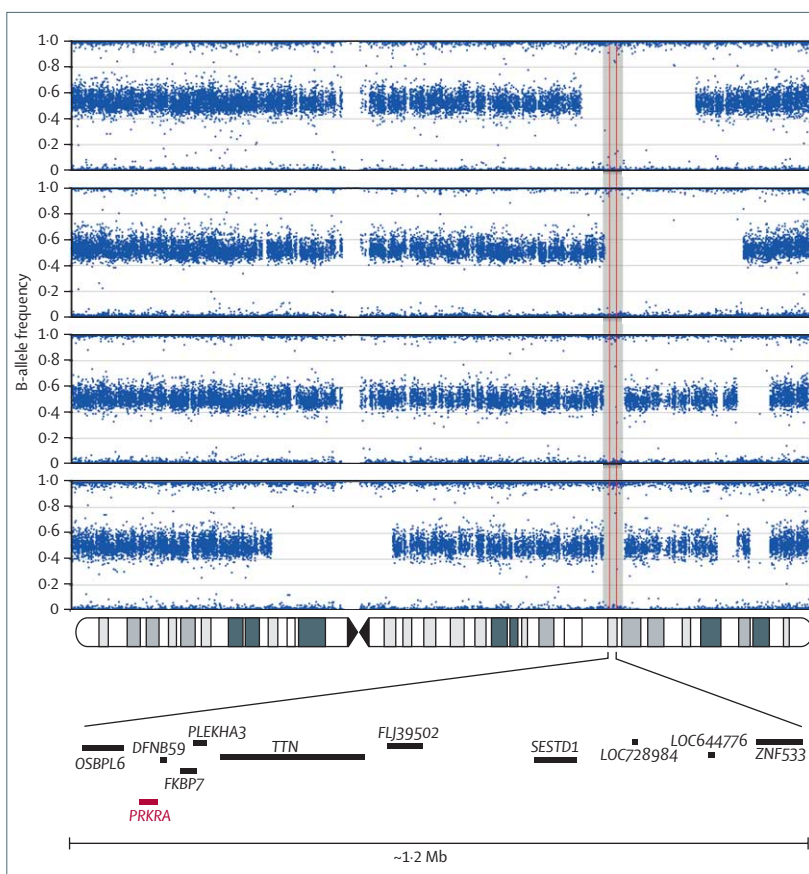


Figure 1 The disease-segregating homozygous region identified in six affected members of families DYT16-1 and DYT16-2

Each SNP can occur in two alternative forms (designated allele A and allele B). The B-allele frequency metric calculates the probability that both alleles are B alleles. Homozygosity for the A allele, therefore, has a B-allele frequency 0, homozygosity for the B allele has a frequency of 1, and heterozygous SNPs cluster at a B-allele frequency of 0.5. Upper panels show the B-allele frequency metrics across chromosome 2 for two affected individuals from each family, DYT16-1 (2035-1 and 2035-2) and DYT16-2 (2035-11 and 2035-12). Stretches of homozygosity are denoted by a contiguous stretch of genotypes where AA and BB genotypes are called but where there is a lack of AB genotype calls (ie, B-allele frequency of 0.5). The lower panel shows an ideogram of chromosome 2, the primary candidate interval that is identical by state between families DYT16-1 and DYT16-2 (rs1434087 to rs10497541; 1.2 Mb in size), and the genes in this primary critical interval.

Patient 2035-2 (family DYT16-1) was aged 35 years, and had an uneventful early childhood, although he did not start to speak until age 2 years. A movement disorder began at 12 years of age, with pain in the lower limbs and involuntary leg adduction when walking. Shortly thereafter, his voice became spasmodic and he developed oromandibular dystonia, laterocollis, and upper limb dystonia. Reflexes were brisk with ankle clonus. Bradykinesia was marked with a Unified PD Rating Scale (UPDRS; part III) score of 21.¹⁴ The patient scored 58 on the Burke-Fahn-Marsden scale, with a disability score of 23. His generalised dystonia was mainly characterised by involvement of legs, hands, and voice. The outcome with anticholinergic drugs (biperiden 24 mg daily) and levodopa/carbidopa (375 mg/37.5 mg daily) treatment was poor, although the bradykinesia had mild improvement with levodopa.

For the NCBI dataset see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>

For the Ensembl dataset see http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html

See Online for webtable 1

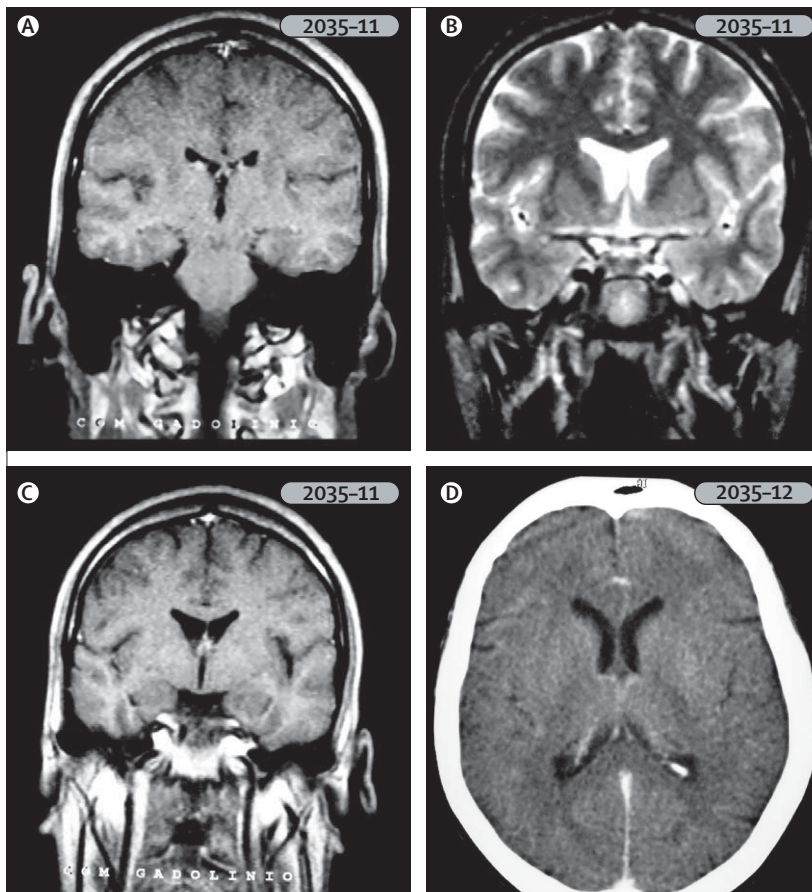


Figure 2: MRI and CT scans
(A, B) Coronal T1-weighted MRI after gadolinium contrast injection in patient 2035-11. (C) Coronal T2-weighted MRI in patient 2035-11. (D) CT scan of patient 2035-12. No specific abnormalities can be appreciated.

Patient 2035-3 (family DYT16-1) was 19 years old. Despite no prepartum or postpartum complications, this patient had delayed developmental motor and cognitive milestones. He started to walk at age 2 years, when relatives noted feet inversion and knee flexion, suggestive of spasticity. He has never had intelligible language, and his speech is apparently affected by a spasmodic dysphonia. Lower limb dystonia spread to superior limbs and orofacial muscles and trunk. At age 14 years, when seen at the FUMG Movement Disorders Clinic, his behaviour was normal despite the mention of occasional outbursts of aggressiveness by his relatives. The neurological examination showed generalised dystonia characterised by involvement of legs, hands, trunk, and voice, with a Burke-Fahn-Marsden scale score of 36 on the objective section and 16 on the disability part. He had severe bradykinesia but no tremor. His deep tendon reflexes were brisk. Treatment with levodopa/carbidopa (375 mg/37.5 mg daily for 6 months) and biperiden (24 mg daily) did not improve the dystonia, but there was moderate improvement of the bradykinesia without significant UPDRS change.

Patient 2035-119 (family DYT16-2) was 64 years old and had only been followed up at the FUMG Movement Disorders Clinic for a year. He had no recollection of any neurological symptom until the age of 18 years, when he noticed an involuntary contraction of the left leg during walking. The symptoms progressed slowly, involving the right leg and the left arm. 10 years later, the patient developed a right laterocollis and a dysarthric speech. The trunk at this time also developed contractions in the same direction of the neck. Neurological examination showed right laterocollis, right laterotrunk, spasmodic dysphonia, extension of the left leg when walking, slight bradykinesia, but normal tendon reflexes. He had been treated with anticholinergic drugs (biperiden 12 mg daily) and baclofen (30 mg daily) with modest, if any, improvement.

Patient 2035-11 (family DYT16-2) was 34 years old and had been followed up for 14 years. His mother reported no problems during pregnancy or delivery. There was, however, a slight delay in the developmental milestones (he started to walk at age 18 months and did not speak before 5 years of age). At the age of 11 years he noticed an involuntarily closing of the left hand and he needed to use his right hand to open the left. In the same year, the movement disorder deteriorated, with involuntary pushing of the left shoulder backwards and downwards. At age 13 years, his right shoulder was also involved and there was hoarseness of the voice. 3 years later, the patient reported that his neck moved backwards involuntarily. The symptoms ameliorated when he touched his head. At this time, aged 20 years, he began to display impaired walking with right foot inversion and academic problems; at this point he sought medical assistance. Neurological examination showed no Kayser-Fleischer ring, a brisk mentonian reflex, and facial grimacing. His voice was dysarthric, with tongue dystonia. He had retrocollis and a laterocollis with contraction of both splenius capitis and scapular elevator. There was protrusion of left shoulder, hyperextension of left elbow, hyperflexion of the left wrist and fingers, and hyperextension of the right wrist. His gait was dystonic with inversion of the right foot. Deep tendon reflexes, cerebellar tests, and sensitivity were normal. There was no response to levodopa/carbidopa (375 mg/37.5 mg daily for 6 months). Baclofen (60 mg daily for 4 months) and anticholinergic drugs (24 mg biperiden daily) also failed to provide meaningful benefit. In 1993, at 20 years of age, the patient underwent botulinum toxin injection with excellent improvement of laterocollis and retrocollis. Despite this treatment, the dystonia of the inferior limbs and voice worsened. 1 year later the patient developed opisthotonic posturing and writer's cramp. At age 29 years, the movement disorders deteriorated, rendering the patient unable to walk, dress, and feed without assistance. He lost weight, and the dystonia of the arm and the trunk worsened. When the patient was

31 years old, speech was mostly unintelligible and he had moderate neck pain caused by the dystonia. He continued to receive periodic injections of botulinum toxin but increasing dosages (maximum of 600 units per session) were necessary to alleviate the retrocollis. Even during the peak of the effect, and despite an improvement in the neck contractions at rest, there was intense overflow with return of dystonic posturing of the neck during gait. The only side-effect was worsening of dysphagia. His score on the Burke-Fahn-Marsden scale during botulinum toxin treatment was 64 on the objective part and 21 on the disability section.

Patient 2035-12 (family DYT16-2) was 48 years old and had been followed up for 3 years. She was born by natural delivery, after an uneventful pregnancy. Motor development was normal, but her mother mentioned that she only started to speak at age 2 years and that her speech has always been difficult to understand. At age 10 years, her mother noticed slowness of the hands, although the patient did not become aware of this symptom or of tremor in the hands until she was 20 years old. 1 year later she noticed involvement of the right leg. Since then, the movement disorder has slowly worsened. The patient mentioned freezing of her gait and writing, and dysphagia. Neurological examination at age 45 years showed facial grimacing, severe hypomimia, and a slight oromandibular dystonia. Her voice was characterised by a combination of lower volume and strangled character suggestive of a mixed form of spasmodic dysphonia. The patient also had dystonic posturing in the hands at rest (flexion of the fingers) and when writing (flexion of the wrist), and left foot eversion when walking. She had bradykinesia, slight postural tremor of the arms, and rigidity in the upper and lower limbs. There was no abnormality of deep tendon reflexes, cerebellar, or sensory functions.

Patient 2035-61, a 42 year-old woman, had been followed up for 12 years at the FUMG Movement Disorders Clinic. Her symptoms began at the age of 7 years with difficulty in writing. 5 years later she developed gait disturbance (extension of the left leg) followed by rapid spread to upper limbs, trunk, face, and voice. One of her brothers was reported to have had similar symptoms with onset at age 8 years. Unfortunately, he died at the age of 34 years from pneumonia before we could examine him. At the time of his death, he was severely disabled and wheelchair bound. The parents were cousins and died from cardiac problems. Neurological examination of our patient at age 30 years showed generalised dystonia with facial grimacing, protrusion of tongue and lips, anarthria, left scoliosis, extension of both wrists with flexion of fingers, and flexion of knees with feet inversion. Deep tendon reflexes were brisk, but there were no parkinsonian features. The Burke-Fahn-Marsden scale score was 103, with a disability score of 19. Levodopa/carbidopa (375 mg/37.5 mg daily), baclofen (30 mg

daily), and trihexyphenidyl (20 mg daily) resulted in no improvement. However, botulinum toxin injection in the submental area consistently improved the dysphagia.

Screening for mutations in *PRKN*, *LRRK2*, *SNCA*, *GCH1*, *TOR1A*, *ATP1A3*, and *PINK1* were negative in all patients. Serum and urine copper and ceruloplasmin tests ruled out Wilson's disease. Brain CT scans of all affected family members of DYT16-1 and DYT16-2 and brain MRI scans on family members 2035-1 and 2035-11 of DYT16-1 and DYT16-2, respectively, showed no specific abnormalities (figure 2).

Analysis of high-density GWSNP genotyping done in affected family members of DYT16-1 and DYT16-2 revealed three regions of the genome that were homozygous at greater than 50 contiguous SNPs and identical by state between all affected family members both within and between the families (webtable 2). These regions encompassed over 1.2 Mb (from rs1434087 to rs10497541, containing 278 SNPs), 0.13 Mb (from rs13405069 to rs7581560, containing 67 SNPs), and 0.4 Mb (from rs1518709 to rs10930936, containing 78 SNPs), and all three regions were in chromosome 2, situated close together across a total distance of 2.44 Mb. 277 of those 278 SNPs in the first region were homozygous and identical by state within all affected family members. A single SNP (rs4897088), 0.23 Mb from the telomeric edge of the crucial region, although homozygous in all affected members, was genotype AA in affected members from family DYT16-1 and genotype GG in affected members from family DYT16-2. Resequencing of the region containing this SNP from a PCR fragment that was also designed to amplify the two most closely flanking SNPs showed that the genotypes were indeed correct and suggested that the localisation of this SNP was correct. Although we felt this result was perplexing, because it is not consistent with an ancestrally identical genomic segment, and perhaps only explained by a gene-conversion event or complex structural rearrangement, we felt that this large track of homozygous SNPs that are identical across families still implicated this region as a good candidate to contain the disease-causing mutation.

The primary candidate region (rs1434087 to rs10497541) contains 11 genes or predicted transcripts (figure 1); the second candidate region (rs13405069 to rs7581560) contains a portion of *ZNF533*, also located in the primary candidate region; and the third candidate region (rs1518709 to rs10930936) contains a single transcript, *LOC729001*. Although we felt the causal genetic mutation was likely to reside in the primary candidate region, given that this region was three times larger than the next largest region of contiguous homozygosity, we sequenced all 12 genes and transcripts in the three largest candidate intervals.

Sequence analysis of all coding exons and immediate flanking intronic sequence of all 12 genes (458 exons)

See Online for webtable 2

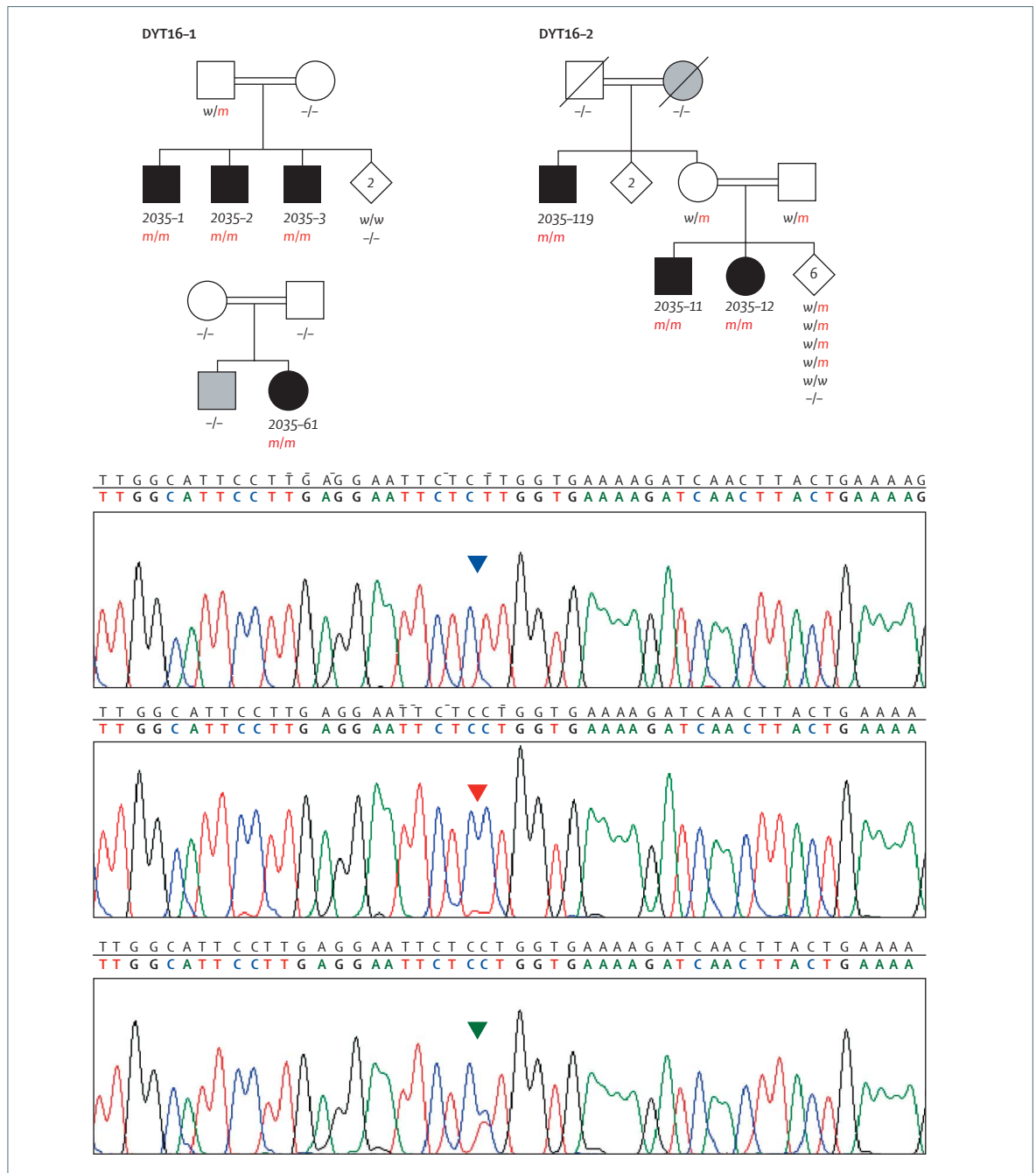


Figure 3: Pedigrees of families DYT16-1, DYT16-2, and patient 2035-61

A black symbol indicates an affected family member, an open symbol indicates an unaffected family member, and a grey symbol indicates a family member reported as affected by history but unexamined. Squares are males, circles are females. Multiple siblings are denoted by a diamond; the number of individuals is indicated in the diamond. Chromatograms show the mutation in *PRKRA*; the blue arrow in top panel indicates mutant homozygote, the red arrow in middle panel indicates wild-type sequence, and the green arrow in bottom panel indicates heterozygous mutation. w=wild-type (c.665C); m=mutant (c.665T); -/=genotyping not possible, or attempted but failed.

revealed a single segregating homozygous variant (c.665C>T) in exon 7 of *PRKRA* (P222L) in all affected family members of DYT16-1 and DYT16-2 (figure 3). Sequencing of exon 7 of *PRKRA* in the 1992 samples described above revealed the c.665C>T mutation in a

single sample from a Brazilian patient with generalised dystonia (patient 2035-61); this mutation was homozygous in this patient. The entire coding region of *PRKRA* was sequenced in all 12 Brazilian patients with dystonia, but no additional mutations were

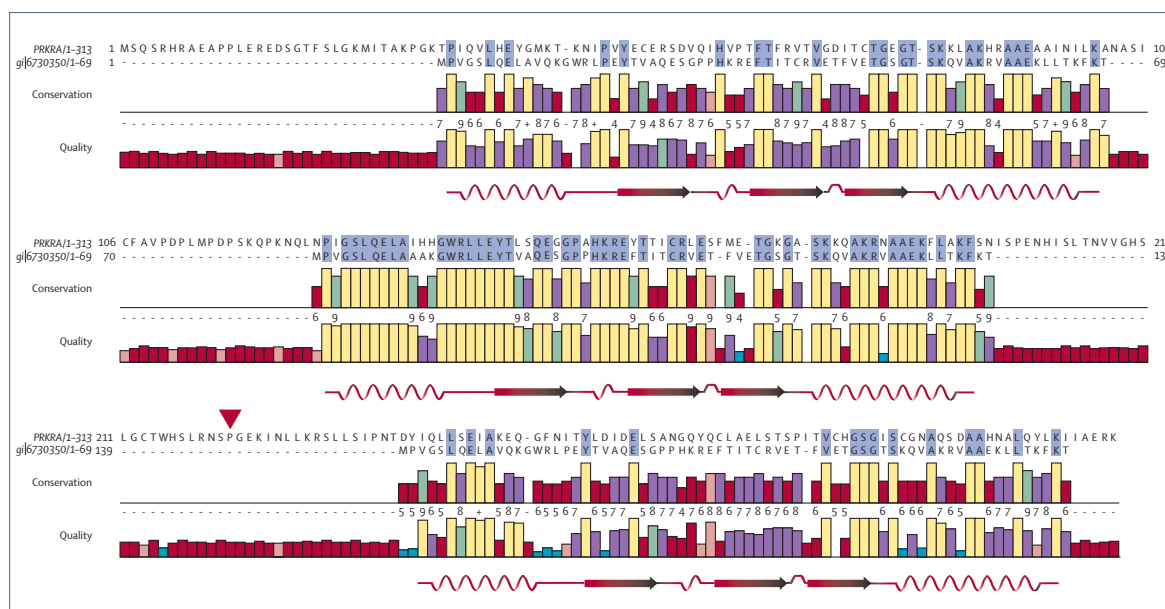


Figure 4: Sequence analysis of PRKRA

Sequence analysis predicts that PRKRA encodes three copies of a double-stranded (ds) RNA-binding motif (DSRM). DSRM is a conserved domain in various proteins, including dsRNA-dependent protein kinase PKR, RNA helicases, *Drosophila melanogaster* staufer protein, *Escherichia coli* RNase III, RNases H1, and dsRNA-dependent adenosine deaminases. Upper panel shows the sequence-to-structure alignment between PRKRA sequence and the three-dimensional structure of a dsRNA-binding domain (gi:670350, NCBI Structure database). The yellow-brown bar plot shows conservation and alignment quality. The red swirl ribbons and arrowed ribbons show the α -helix and β -strand, respectively, in the three dimensional structure of DSRM motif. The location of the P222L mutation is indicated with a red arrow.

identified. To examine the region surrounding *PRKRA* in patient 2035-61, we genotyped DNA from this sample by use of the Illumina Infinium HumanHap550 SNP genotyping platform. This work revealed a region identical by state with all other affected members positive for the c.665C>T mutation between markers rs6738749 to rs10497541, limiting the disease-segregating interval on the centromeric side by 12 SNPs (0.04 Mb).

Discussion

We identified two families from southeast-central Brazil with a distinct young-onset movement disorder, most commonly presenting with dystonia, but also with some parkinsonism. The two families, DYT16-1 and DYT16-2, were apparently unrelated and resided in two cities approximately 200 miles apart. Autozygosity mapping with a high-density GWSNP analysis revealed a large disease-segregating region of homozygosity identical by state in all six affected family members. Sequence analysis of genes and predicted transcripts from this interval and two smaller disease-segregating intervals revealed a single disease-segregating mutation, c.665C>T (P222L), in exon 7 of the gene *PRKRA* (position based on NCBI accession numbers NM_003690 and NP_003681). This mutation was not identified in the NCBI SNP database or by sequence similarity search of the human nucleotide collection at NCBI (figure 3). Of note, in family DYT16-2, affected members have been confirmed in two generations. In addition, an

affected family member (mother of patient 2035-119) was also reported to be affected, which may suggest additional parental consanguinity. However, this member was not examined, and we therefore cannot rule out the possibility of phenocopy or inaccurate reporting of the affected status. This mutation was identified as a homozygous change in an additional patient with generalised dystonia from Brazil. Screening for this mutation failed to reveal any carriers in 11 other Brazilian dystonia cases, 294 young-onset PD cases, 948 neurologically normal controls, or 738 samples from diverse human populations. Analysis of the genomic region in the mutation-positive cases shows a disease-segregating interval 274 SNPs long, stretching 1.16 Mb in length, which is identical by state among all affected individuals. The identification of such a segregating region, in a single rare disorder, strongly suggests that the genetic mutation causing this disease resides in this genomic region.

We have not examined 5' or 3' untranslated regions, or the predicted regulatory regions in these families, and we therefore cannot rule out non-coding variability as a cause of disease; however, the absence of the specific P222L mutation identified here from a large cohort of control samples supports the notion that this variant is the underlying causal mutation in these families. This supposition is bolstered by the fact that no other segregating mutations were identified in the 457 other known and predicted coding exons in this region; however, to be absolutely confident that

For the NCBI SNP database see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
For more on sequence similarity search see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

mutations in *PRKRA* underlie this disease, independent identification of disease-segregating mutations is required.

The biological mechanism by which the c.665C>T mutation in *PRKRA* may cause dystonia-parkinsonism is not clear. *PRKRA* encodes protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-dependent activator (aliases PACT, RAX, HSD14). In response to extracellular stresses, *PRKRA* activates the latent protein kinase PKR, a protein involved in signal transduction, cell differentiation, cell proliferation, antiviral response, and apoptosis.¹⁵ More specifically, PKR is thought to inactivate the eukaryotic translation initiation factor 2 α (EIF2 α), which in turn inhibits protein synthesis.¹⁶ Of note, wild-type *PRKRA* is a component of the human RNA-induced silencing complex, which also regulates protein synthesis via cleavage of mRNA.¹⁷ The P222L mutation alters an aminoacid that is conserved across mammalian species at a residue between the second and third RNA-binding motifs (figure 4). This mutation may cause structural alteration of *PRKRA* and/or affect substrate affinity. Unfortunately, the crystal structure of this or related proteins has not been solved and thus we cannot make any confident predictions about the likely effect of this variant on protein conformation or function.

On the basis of our data, *DYT16* disease should be considered when a patient presents with an apparent or suspected recessive pattern of inheritance of generalised dystonia, with involvement of the muscles of the neck and trunk to a greater extent than that of the limbs. Other typical features are oromandibular (sardonic smile), laryngeal dystonia, and parkinsonism, although the latter is less important than the dystonic features. All patients examined thus far have presented spasmodic dysphonia and sardonic smile. All patients failed to improve with any pharmacological treatment, including levodopa and high-dose anticholinergics. In contrast to *DYT16*, patients with *DYT1* first have limb involvement that rapidly spreads to other limbs and the trunk, ultimately becoming severe; furthermore, *DYT1* is a pure dystonia with an autosomal dominant mode of inheritance (although it is worth noting that the reduced penetrance could lead to suspicion of recessive inheritance).¹⁸ The lack of response to levodopa in patients with *DYT16*, the absence of myoclonus, and sensitivity to alcohol differentiate this disease from *DYT5* and *DYT11*, respectively.¹⁸ There are many similarities between *DYT16* and *DYT12*, such as prominent bulbar signs and rostro-caudal gradient; however, *DYT12* has an abrupt onset and a clear autosomal dominant mode of inheritance.⁸ *DYT16* may also be easily differentiated from the *PARK* loci associated with parkinsonism and dystonia such as *PRKN* and *PARK9*-linked disease. The observed dystonia in *PRKN* disease is usually focal in nature and does not progress to a generalised dystonia, and patients with

PRKN disease are usually responsive to levodopa therapy. *PARK9* disease is associated with both dementia and a supranuclear gaze palsy,¹⁹ both of which are absent in *DYT16* disease.

In summary, we have described a novel autosomal recessive dystonia-parkinsonism syndrome in Brazilian patients that we have designated *DYT16*. Using high-density SNP genotyping arrays, we have identified a genetic locus associated with disease. The homozygous track of SNPs shared between all mutation-positive samples clearly shows that this region is derived from a common ancestor. After complete sequence analysis of all coding regions within the locus, we show a single disease-segregating mutation within the gene *PRKRA*. This mutation was present in three of 14 probands with generalised dystonia from the Brazilian population, representing 21.4% of independent cases. The P222L variant might be not pathogenic, and could be in linkage disequilibrium with the actual disease-causing variant. However, the absence of the mutation in such a large series of controls and our inability to identify other mutations, despite screening all other genes in the identified region, clearly supports our assertion that mutation in *PRKRA* is the causative genetic mutation in *DYT16*.

Contributors

SC, SS, JS-S, and CP-R contributed equally. FC and AS contributed equally. SC, SS, JS-S, CP-R all participated in laboratory based genotyping, sequencing and data analysis, and revision of the manuscript. SC and FC characterised the Brazilian patients. JD, JRG were responsible for data management, statistical analysis and revision of the manuscript. RG, JB performed sequence analysis in Portuguese samples. CRO collected DNA samples. MC, PL, DH participated in the data analysis and revision of the manuscript. AL and JH undertook revision of the manuscript. AS supervised the study and drafted the manuscript.

Conflicts of interest

We have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank all the patients for taking part in this study. This study was supported in part by the intramural programme of the National Institute on Aging, US National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, USA. Samples and clinical data were obtained from the NINDS repository (<http://ccr.coriell.org/ninds/>; sample numbers are listed in the Methods) and from the HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel (<http://www.cephb.fr/HGDP-CEPH-Panel/>).

References

- de Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT, et al. Mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase alpha3 gene *ATP1A3* are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* 2004; **43**: 169–75.
- Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 1994; **8**: 236–42.
- Nolte D, Niemann S, Muller U. Specific sequence changes in multiple transcript system *DYT3* are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10347–52.
- Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, et al. The early-onset torsion dystonia gene (*DYT1*) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 1997; **17**: 40–48.
- Rainier S, Thomas D, Tokarz D, et al. Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Arch Neurol* 2004; **61**: 1025–29.

- 6 Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, et al. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001; **29**: 66–69.
- 7 Gibbs JR, Singleton A. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genet* 2006; **2**: e150.
- 8 Brashear A, Dobyns WB, de Carvalho Aguiar P, et al. The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the *ATP1A3* gene. *Brain* 2007; **130**: 828–35.
- 9 Camargos ST, Cardoso F, Momeni P, et al. Novel GCH1 mutation in a Brazilian family with dopa-responsive dystonia. *Mov Disord*, in press.
- 10 Dogu O, Johnson J, Hernandez D, et al. A consanguineous Turkish family with early-onset Parkinson's disease and an exon 4 parkin deletion. *Mov Disord* 2004; **19**: 812–16.
- 11 Clarimon J, Brancati F, Peckham E, et al. Assessing the role of DRD5 and DYT1 in two different case-control series with primary blepharospasm. *Mov Disord* 2007; **22**: 162–66.
- 12 Johnson J, Hague SM, Hanson M, et al. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004; **63**: 554–56.
- 13 Burke RE, Fahn S, Marsden CD, Bressman SB, Moskowitz C, Friedman J. Validity and reliability of a rating scale for the primary torsion dystonias. *Neurology* 1985; **35**: 73–77.
- 14 Fahn S, Elton RL, UPDRS Development Committee. Unified Parkinson disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, eds. *Recent developments in Parkinson's disease*. Floral Park, NJ: Macmillan, 1987; 293–304.
- 15 Patel CV, Handy I, Goldsmith T, Patel RC. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37993–98.
- 16 D'Acquisto F, Ghosh S. PACT and PKR: turning on NF-kappa B in the absence of virus. *Sci STKE* 2001; 2001: RE1.
- 17 Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 2006; **25**: 522–32.
- 18 de Carvalho Aguiar PM, Ozelius LJ. Classification and genetics of dystonia. *Lancet Neurol* 2002; **1**: 316–25.
- 19 Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *ATP13A2*, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; **38**: 1184–91.

DYT16: a new twist to familial dystonia



The expanding list of DYT is an assortment of 14 (*DYT5* and *DYT15* are the same forms) different clinically and genetically heterogeneous forms of dystonia, which are characterised by involuntary twisting and repetitive movements that result in abnormal postures. Despite the identification of several genes linked to dystonia, and the observation of a positive family history in a large subset of patients, a monogenic cause has only been found in a minority of patients with dystonia.¹

In this issue of *The Lancet Neurology*,² Camargos and colleagues report *DYT16*, a new, recessively inherited form of early-onset generalised dystonia that is associated with a homozygous missense mutation in *PRKRA*, the gene that encodes protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator (*PRKRA*). Affected members from three unrelated Brazilian families have the same P222L mutation in *PRKRA*, which was inherited from a common founder and absent in almost 1000 neurologically healthy controls.

Advances in research often create new lines of enquiry, and, accordingly, the finding of this mutation raises three important questions: what is the phenotype associated with mutations in *PRKRA*; what is the role of mutations in *PRKRA* in early-onset dystonia and related movement disorders; and what can mutations in *PRKRA* teach us about the pathophysiology of dystonia?

In other familial movement disorders, such as monogenic parkinsonism or autosomal dominant ataxias, it is difficult to distinguish different types of PARKS or SCAs on clinical grounds. For the dystonias, however, knowledge of important “red flags” can lead to the correct diagnosis of a specific genetic form before molecular testing. These phenotypic clues include diurnal variation of symptoms and response to levodopa in dopa-responsive dystonia (*DYT5*); the combination of dystonia with myoclonus, which are ameliorated by alcohol intake in myoclonus dystonia (*DYT11*); or abrupt onset of severe dystonia and parkinsonism in rapid-onset dystonia parkinsonism (*DYT12*). In the case of *DYT16*, six of the seven patients presented with early-onset limb dystonia mostly affecting the lower extremities, which is commonly seen in patients with *DYT1* and *DYT5* dystonia. Although craniofacial involvement is rare in

DYT1 and *DYT5* dystonias, it is typical of *DYT6* dystonia and some forms of focal dystonia, such as embouchure dystonia and neuroleptic-induced dystonia/dyskinesia. *DYT16* is characterised by prominent bulbar involvement, with dysphonia, dysarthria, and even dysphagia, which is similar to the acute phase of rapid-onset dystonia parkinsonism (*DYT12*). Parkinsonism is a less prominent feature of *DYT16*.² Indeed, the four patients who showed parkinsonism lacked three of the four cardinal features (ie, resting tremor, rigidity, and postural instability). Rather, a diagnosis of parkinsonism is based on the finding of levodopa-resistant bradykinesia that might be related to the severe generalised dystonia and thus results in high Unified Parkinson’s Disease Rating Scale motor scores. Importantly, the recessive mode of inheritance distinguishes *DYT16* dystonia from most other known dystonias; so too does the mild delay in early developmental milestones that has been described in four of the seven carriers of the mutation. At present, all phenotypes need to be interpreted with caution because they are based on a small number of patients who carry an identical founder mutation.

Likewise, it is impossible to fully appreciate the role of the P222L mutation in *PRKRA* as a putative, more general cause of dystonia. The absence of the mutation in the large control group and the conservation of the amino acid residue in mammalian species support its potential pathogenicity. Although unlikely, it is also

Published Online
February 4, 2008
DOI:10.1016/S1474-
4422(08)70023-1
See Online/Articles
DOI:10.1016/S1474-
4422(08)70022-X



Computer-generated display of DNA sequence

conceivable that the 665C→T mutation is in linkage disequilibrium with another mutation that might have been overlooked by sequencing of the coding regions of candidate genes: mutations in non-coding regions or exon rearrangements.

No mutations in *PRKRA* were found in, admittedly, a small number of patients with generalised dystonia. At present, there are a number of different possible scenarios, which range from the P222L mutation being a rare variant that is restricted to a small Brazilian founder population—comparable to X-linked dystonia parkinsonism (*DYT3*) in the Philippines—to mutations in *PRKRA* being an important cause of generalised dystonia and possibly other forms of dystonia or parkinsonism. Of note, there is parent-to-child transmission of the disease in one of the two *DYT16* families, which could indicate a second consanguinity loop, the coincidental presence of a second mutation, a phenocopy or, alternatively, a role for heterozygous mutations in *PRKRA* as a susceptibility factor (eg, as seen for genes linked to recessive parkinsonism).³

Little is known about the function of *PRKRA*: it binds to double-stranded RNA and can also be activated by cellular protein activators, such as PACT.⁴ Similarly, another

dystonia protein, TorsinA, which is encoded by *DYT1*, has a role in response to stress.⁵ Although not discussed by Camargos and colleagues, functional studies will be the natural extension of their work. Likewise, mutational analyses of large samples of patients with dystonia who are from different ethnic backgrounds are needed to evaluate the frequency of mutations, the phenotypic and mutational spectrum, and, more generally, the significance of *DYT16* dystonia in clinical practice.

Christine Klein

Department of Neurology, University of Lübeck; Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany
christine.klein@neuro.uni-luebeck.de

I have no conflicts of interest.

CK is supported by a Lichtenberg grant from the Volkswagen Foundation.

- 1 Gonzalez-Alegre P. The inherited dystonias. *Semin Neurol* 2007; **27**: 151–88.
- 2 Camargos S, Scholz S, Simon-Sanchez J, et al. *DYT16*, a novel young-onset dystonia-parkinsonism disorder: identification of a segregating mutation in the stress response protein *prkra*. *Lancet Neurol* 2008; **7**: 207–15.
- 3 Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, et al. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; **6**: 652–62.
- 4 Patel RC, Sen GC. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* 1998; **17**: 4379–90.
- 5 Hewett J, Ziefer P, Bergeron D, et al. TorsinA in PC12 cells: localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J Neurosci Res* 2003; **72**: 158–68.

Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian Movement Disorders clinic: Phenotypic characterization and frequency of SNCA, PARK2, PINK1 and LRRK2 mutations

Journal:	<i>Movement Disorders</i>
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Camargos, Sarah; The Federal University of Minas Gerais, Internal Medicine Dornas, Leonardo; The Federal University of Minas Gerais, Internal Medicine Momeni, Parastoo; Texas Tech University Health Sciences Center, Neurology Lees, Andrew; Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies, Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies; Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies, Neurological Studies Hardy, John; National Institute of Aging, Neurogenetics Laboratory Singleton, Andrew; National Institutes of Health, Laboratory of Neurogenetics, NIA, Cardoso, Francisco; UFMG, Neurology
Keywords:	LRRK2, PINK1, PARK2, SNCA, Parkinson's Disease



1
2
3
4
5 **Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian Movement Disorders clinic: Phenotypic**
6
7 **characterization and frequency of *SNCA*, *PARK2*, *PINK1* and *LRRK2* mutations**
8

9 *Sarah Teixeira Camargos, MD*¹; *Leonardo Oliveira Dornas MD*¹, *Parastoo Momeni, PhD*³, *Andrew Lees, MD, PhD*⁴, *John*
10 *Hardy, PhD*^{4,5}, *Andrew Singleton, PhD*², *Francisco Cardoso, MD, PhD*¹
11

12
13
14 ¹Movement Disorders Group, Neurology Service, Internal Medicine Department, The Federal University of Minas Gerais
15

16
17
18 ²Laboratory of Neurogenetics, National Institutes on Aging, National Institutes of Health, MD, USA
19

20 ³Department of Neurology, Texas Tech University Health Sciences Center, TX, USA
21

22 ⁴Reta Lila Weston Institute of Neurological Studies, University College London, London, UK
23

24 ⁵Department of Molecular Neuroscience, Institute of Neurology, Queen Square, London, UK
25

26
27 Corresponding author: Francisco Cardoso cardosofe@terra.com.br
28

29
30 Av Pasteur 89/1107. Belo Horizonte, MG, Brazil Fax 55-31-32134951 Zip code- 30150-290
31

32
33 Number of figures and tables- 2 and 3
34

35 Number of pages- 20
36

37
38 Keywords- early onset Parkinson disease, familial Parkinson disease.
39
40
41
42
43
44
45

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the frequency and to perform phenotypic and genotypic characterization of familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease (EOPD) in a Brazilian movement disorder unit. We performed a standardized clinical assessment of the patients followed by sequencing of the genes *PARK2*, *PINK1*, *SNCA* and *LRRK2*. During the period of study (January through December, 2006) we examined 575 consecutive patients of whom 226 (39.3%) met the diagnosis of Parkinsonism and IPD in 202 of the latter. Of the IPD cases 45 (22.3%) had EOPD; of the remaining cases, 13 (8%) reported a family history of parkinsonism. The age at onset in the EOPD cases was 34.8 ± 5.4 years (mean \pm standard deviation); 11 (24.5%) had a positive family history of for PD, 8 of whom with autosomal recessive transmission. The age at onset in the late-onset PD patients was 52.3 ± 12.2 years; six with autosomal recessive transmission and seven patients described a family history of autosomal dominant transmission. In the early-onset cases, we identified five known mutations in *PARK2* (P153R, T240M, 255Adel, W54R, V3I) and one novel mutation in *PINK1* (homozygous deletion of exon 7). In the familial cases (late onset), one patient had a novel mutation of *LRRK2*, Q923H, but no *SNCA* mutations were identified. In our population, we have demonstrated that EOPD accounts for a high frequency (21.9%) of IPD cases. *PARK2* was the most commonly mutated gene but we also identified two novel mutations in *PINK1* and *LRRK2*.

Key words: *LRRK2*, *PINK1*, *PARK2*, *SNCA*, Brazil, Parkinson's disease, mutation

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Idiopathic Parkinson's disease (IPD) is the most frequent cause of Parkinsonism, being diagnosed in up to 86% of cases¹. Early onset PD (EOPD), defined by age of onset between 20 and 40 years of age², accounts for 4-10% of all patients with PD. Recent epidemiologic studies have indicated a more readily evident genetic component in EOPD in contrast to late-onset IPD^{3,4}. Several familial forms of PD have been described and mutation in the genes *SNCA*, *PARK2*, *PARK7*, *PINK1*, *LRRK2* and *GBA* have been associated with genetic forms of PD⁵⁻¹¹. There is clear evidence that etiologic factors may vary depending on the geographic and ethnic background of the studied population and in particular the prevalence of monogenic forms of PD and specific disease causing mutations can vary considerably between populations¹². In the current study we describe the frequency of PD, including EOPD and familial forms of PD in cases ascertained within a movement disorders clinic in Brazil; furthermore we have searched EOPD and cases reporting a positive family history of parkinsonism for mutations in *SNCA*, *PARK2*, *PINK1* and *LRRK2*.

METHODS

During the year of 2006 we screened all consecutive patients seen at the Movement Disorders Clinic of the Federal University of Minas Gerais, a tertiary referral center located in the southeast of Brazil, covering an area with a population of 20 million people. All patients with parkinsonism, defined by the presence of bradykinesia and at least one of the following: rigidity, tremor or postural instability, entered the study. IPD was diagnosed according to the UK Brain Bank criteria¹³. Patients were classified as EOPD if the age at onset of parkinsonism was ≤ 40 years and ≥ 20 years¹⁴. Careful pedigree evaluation and a detailed neurological exam including the application of the UPDRS were performed for each patient¹⁵. We have calculated the rate of progression of motor disability using the formula: median of UPDRS motor score (when patient is on) within a year minus the basal motor score. Psychiatric problems were diagnosed using DSM- IV criteria¹⁶. Patients were recruited with their prior written informed consent and ethical committee approval.

DNA was extracted from peripheral lymphocytes according to routine procedures. Amplification of the protein coding exons of *PARK2*, *PINK1*, *SNCA* and *LRRK2* was performed by polymerase chain reaction in a total volume of 15 μ l containing 20ng of genomic DNA, 5pmol of forward and reverse primers, 5U of FastStart TaqDNA polymerase (Roche) containing all of the required buffers and dNTPs (details available upon request). Thermal cycling was performed using a standard 60-50 touchdown PCR program. Following confirmation of amplification on a 2% agarose gel, PCR products were purified by filtration on 96 well plates (Millipore). The product

1
2
3
4
5 was then used as template in a dye-terminator sequencing reaction performed as per the manufacturer's protocol (BigDye[®] Terminator
6
7 v3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA). Each product was sequenced in both forward and reverse directions with the primers used
8
9 for initial amplification. The resulting products were filter purified as above and run on an ABI3730XL; all data was analyzed using
10
11 Sequencher (GeneCodes Corporation).
12
13

14
15 To assay for genetic dosage alterations, quantitative duplex PCR of genomic DNA samples was performed on the ABI Prism 7900
16
17 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Protein coding exons of *PRKN* and exon 7 of *SNCA* were each
18
19 co-amplified with β globin, which served as an endogenous standard. PCR was carried out with TaqMan Universal PCR Master Mix
20
21 using 25 ng genomic DNA, 900 nmol/L primers, and 250 nmol/L probes in a total reaction volume of 20 μ L (Applied Biosystems).
22
23 Primers and probes as well as PCR conditions are as previously published^{17,18}. The cycle in the log phase of PCR amplification at
24
25 which a significant fluorescence threshold was reached (Ct) was used to quantify each amplicon. The dosage of each amplicon
26
27 relative to the reference gene and normalized to control DNA was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. To be considered valid, the
28
29 requirements were SDs < 0.16 and threshold values reached before cycle 28. A value was considered a heterozygous deletion between
30
31 0.4 and 0.6, normal between 0.8 and 1.2, a heterozygous duplication between 1.3 and 1.7, and a triplication or homozygous
32
33 duplication between 1.8 and 2.2.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

RESULTS

During the year of 2006 we examined 575 patients, of whom 226 met the diagnosis of Parkinsonism. IPD was diagnosed in 202 with 45 early onset Parkinson disease cases. Eight late onset familial cases were included in this study. The number of patients, gender distribution, age at onset and familial history data are shown in Table 1.

Age at onset of the EOPD group was 34.8 ± 5.4 years (mean \pm standard deviation); eight reported a positive family history for IPD, of whom seven showed a pattern of inheritance consistent with autosomal recessive transmission; the remaining patient reported a family history suggestive of an autosomal dominant mode of inheritance. The age at onset of the late-onset PD group was 52.3 ± 12.2 years; four had a pattern of inheritance consistent with autosomal recessive transmission and four patients reported a family history suggestive of autosomal dominant disease.

For the early onset cases, we identified 13.3% of patients with mutations: five previously reported mutations in *PARK2*: P253R (2.2%), exon 5 duplication (2.2%), T240M (4.4%), 255AdeI (4.4%), W54R (2.2%), V3I (2.2%) and one novel mutation in *PINK1*, a homozygous deletion of exon 7 (*FIG 2*) (2.2%). Clinical data of these patients are found in Tables 2 and 3. For the familial late onset cases, only one patient (5.5%) had a mutation of the screened genes: a novel *LRRK2* mutation (Q923H) (*FIG 1*).

DISCUSSION

In a previous study at our clinic, IPD was identified in 70% of 338 patients followed up from 1993 to 1995. During 2006, we have diagnosed 89.5% of all 230 consecutive patients with Parkinsonism. In our series, 22% of all IPD cases met criteria for EOPD. This is certainly more than expected for the general population, but, as is well recognized, in a tertiary center atypical patients are often over represented¹⁹. Nevertheless, this EOPD frequency is not very different than what was found in a community-based study, where it accounted for 17% of all parkinsonian patients²⁰. Bower and colleagues found an incidence of EOPD of 0.8 cases per 100,000 per year in those aged 0–29 years, rising to 3.0 per 100,000 per year in those aged 30–49 years²¹.

In a Korean series of EOPD, 5% of 94 patients had *PARK2* mutations and none had *PINK1* mutations²². The frequency of those mutations within an Italian early onset group of patients was 8% (65 patients, 62 of them sporadic)²³. In a recent study, Clark et al, showed a *PARK2* mutation prevalence of 9.9% among 101 early onset cases²⁴. The range of mutations in sporadic cases in previous studies varied between 9 and 18%²⁵⁻²⁷. According to Klein et al., mutation of *PARK2* occurs in 20% of European early onset cases, while *PINK1* mutations occur in 2% to 7%²³. Our data are also in agreement with such studies (*PARK2*, 11.1% and *PINK1*, 2.2% of cases) in EOPD. Our findings suggest that despite the genetic heterogeneity of contemporary Brazilian population, a result of mixture of people of European (mostly Portuguese but also Italian, German and other nationalities), African and Native origins the frequency of these genetic mutations does not differ substantially from populations from other geographic areas. Surprisingly since mutations in

1
2
3
4
5 *PARK2* are highly correlated with lower age of onset and positive familial history²³, none of the familial early onset cases had
6
7 mutation of the screened genes. One possible explanation for this finding is the small sample size.
8
9

10
11 The clinical picture of patients with and without mutations was similar in the studied population. Two patients carrying single
12
13 heterozygous mutations of *PARK2* did not differ from the three compound heterozygous subjects or from those patients without
14
15 mutations. Whether these single heterozygous mutations play a role in the disease process remains to be determined. Two previous
16
17 studies showed that single heterozygous mutations in parkin are as common as in controls^{28,29}. This was not confirmed in a third
18
19 study³⁰. Some individuals carrying a heterozygous mutation in *PARK2* or *PINK1*, considered as “asymptomatic patients” had some
20
21 minor but unequivocal parkinsonian features³¹⁻³³. PET scan studies of *PARK2* heterozygous mutant carriers showed reduction of
22
23 striatal F-Dopa uptake³⁴. Haploinsufficiency, a dominant negative effect or a risk factor associated to an environmental or another
24
25 genetic cause have been used as hypotheses supporting the role of a single recessive mutation in promoting parkinsonism in these
26
27 patients^{33,35,36}. Since the frequency of Parkin mutations is higher in the EOPD group, is possible that mutations in this gene might
28
29 diminish the age at onset.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1
2
3
4
5 We did not find mutations or gene dosage alterations on *SNCA*. This confirms the findings of several other authors that *SNCA*
6
7 mutation is a rare cause of parkinsonism, regardless of the age of onset of the patients. Considering the rarity of such mutations in
8
9 several studies, our prevalence agrees with previous studies^{37, 38}.
10

11
12
13
14 Within an American population (Genetic Epidemiology of PD Study) outside of those known to have a large North African Arab or
15
16 Ashkenazi Jewish component, one study with 504 PD cases (of whom were 245 EOPD cases) and 341 controls have shown a *LRRK2*
17
18 mutation frequency of ~1% (sporadic cases) to ~5% (in familial cases)³⁹; although as these studies primarily screen a single
19
20 exon/mutation, they are likely an underestimation of the true prevalence. We tested all exons of *LRRK2* only in familial cases and we
21
22 found one mutation carrier within eight cases. We did not identify the common G2019S mutation in our series, although given the
23
24 relatively small sample series this is perhaps not surprising. We found, however, a new variant, Q923H located on exon 21 in a typical
25
26 PD case with a clear autosomal dominant inheritance. The new variant was not found in 192 healthy controls. Cross species
27
28 comparison reveals a reasonable conservation of this residue. Although these findings support a pathogenic effect of this novel
29
30 mutation, this result must be interpreted with caution. We were not able to study disease segregation in this family since the patients
31
32 parents were deceased and thus we feel it remains to be determined if this variant is pathogenic.
33
34
35
36

37
38 Prevalence studies of known genes in a larger number of patients are needed to provide a better view about the role of these mutations
39
40 in the Brazilian population, whether it influences clinical features and age at onset.
41
42
43
44
45

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients for taking part in this study. This work was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute on Aging, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services. The NIH project number associated with this work is Z01 AG000957-05.

REFERENCES

- 1- Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann Neurol*. 1984 Sep;16(3):278-82.
- 2- Quinn, N.; Critchley, P. Marsden, C.D. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1987; 2 (2):73-91.
- 3- Payami H, Zareparsis S, James D, Nutt J. Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. *Arch Neurol*. 2002 May;59(5):848-50.
- 4- Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med*. 2000 Dec 14;343(24):1765-70.
- 5- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.
- 6- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):605-8.
- 7- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256–259.
- 8- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ,

- 1
2
3
4
5 Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*.
6 2004 May 21;304(5674):1158-60.
7
- 8
9 9- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N,
10 Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW,
11 Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004 Nov
12 18;44(4):595-600.
13
- 14
15 10- Zimprich A, Müller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne
16 DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T.
17 The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-
18 containing interval. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):11-9.
19
- 20
21 11- Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in
22 Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004;351:1972-1977.
23
- 24
25 12- Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol*.
26 2006 Oct;60(4):389-98.
27
- 28
29 13- Daniel SE, Lees AJ. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *J Neural Transm Suppl*.
30 1993;39:165-72.
31
- 32
33 14- Quinn N, Critchley P, Marsden CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1987;2:73-91.
34
- 35
36 15- Fahn S, Elton RL, the UPDRS development Committee. Unified Parkinson disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD,
37 Calne DB, eds. *Recent developments in Parkinson's disease*. Floral Park, NJ: Macmillan, 1987: 293-304.
38
- 39
40 16- American Psychiatric Association. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition Text Revision*.
41 Washington DC: American Psychiatric Association; 2000. 943p.
42
43
44
45
46
47
48
49

- 1
2
3
4
5 17- Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, et al. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in
6 early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2001;10(16):1649-56.
7
8
9 18- Johnson J, Hague SM, Hanson M, et al. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with
10 Lewy bodies. *Neurology* 2004;63(3):554-6.
11
12 19- Cardoso F, Camargos ST, Silva Junior GA. Etiology of parkinsonism in a Brazilian movement disorders clinic. *Arq*
13 *Neuropsiquiatr.* 1998 Jun;56(2):171-5.
14
15 20- Dekker MC, van Switen JC, Houwing-Duistermaat JJ, et al. A clinical-generic study of Parkinson's disease in a genetically
16 isolated community. *J Neurol* 2003;250(9):1056-1062.
17
18 21- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County,
19 Minnesota, 1976–1990. *Neurology* 1999; 52: 1214–20
20
21 22- Chung EJ, Ki CS, Lee WY, Kim IS, Kim JY. Clinical features and gene analysis in Korean patients with early-onset Parkinson
22 disease. *Arch Neurol.* 2006 Aug;63(8):1170-4.
23
24 23- Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schafer N, Scaglione C, Marchese R, Kock N, Schule B, Hiller A, Lohnau T, Winkler S,
25 Wieggers K, Hering R, Bauer P, Riess O, Abbruzzese G, Martinelli P, Pramstaller PP. PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in
26 Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur J Hum Genet.* 2005 Sep;13(9):1086-93.
27
28 24- Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B,
29 Frucht S, Ottman R, Marder K. Case-Control Study of the Parkin Gene in Early-Onset Parkinson Disease. *Arch Neurol*
30 Volume 63(4), April 2006, p 548–552.
31
32 25- Periquet M, Latouche M, Lohmann E, et al. *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism.
33 *Brain.* 2003;126:1271-1278.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

- 1
2
3
4
5 26- Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, et al. Role of *parkin* mutations in 111 community based patients with early-onset
6 parkinsonism. *Ann Neurol*. 2002;51:621-625.
7
8
9 27- Poorkaj P, Nutt JG, James D, et al. *Parkin* mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson's disease. *Am J Med*
10 *Genet A*. 2005;139A:56.
11
12 28- Lincoln SJ, Maraganore DM, Lesnick TG, et al. *Parkin* variants in North American Parkinson's disease: cases and controls.
13 *Mov Disord* 2003;18(11):1306-11.
14
15 29- Kay DM, Moran D, Moses L, et al. Heterozygous *parkin* point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's
16 patients. *Ann Neurol* 2007;61(1):47-54.
17
18 30- Clark LN, Afridi S, Karlins E, et al. Case-control study of the *parkin* gene in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol*
19 2006;63(4):548-52.
20
21 31- Hedrich K, Hagenah J, Djarmati A, et al. Clinical spectrum of homozygous and heterozygous *PINK1* mutations in a large
22 German family with Parkinson disease: role of a single hit? *Arch Neurol* 2006;63(6):833-8.
23
24 32- Hiller A, Hagenah JM, Djarmati A, et al. Phenotypic spectrum of *PINK1*-associated parkinsonism in 15 mutation carriers from
25 1 family. *Mov Disord* 2007;22(1):145-7.
26
27 33- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, et al. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 *Parkin*
28 mutation carriers. *Ann Neurol* 2005;58(3):411-22.
29
30 34- Hilker R, Klein C, Ghaemi M, et al. Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in
31 familial parkinsonism associated with mutations in the *parkin* gene. *Ann Neurol* 2001;49(3):367-76
32
33 35- Khan NL, Valente EM, Bentivoglio AR, et al. Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in *PINK1*-linked
34 parkinsonism: an 18F-dopa PET study. *Ann Neurol* 2002;52(6):849-53.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

- 1
2
3
4
5 36- Sun M, Latourelle JC, Wooten GF et al. Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson
6 disease: the GenePD study. Arch Neurol. 2006 Jun;63(6):826-32.
7
8
9 37- Johnson J, Hague SM, Hanson M, et al. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with
10 Lewy bodies. Neurology. 2004;63(3):554-6
11
12 38- Klein C. Implications of Genetics on the Diagnosis and Care of Patients With Parkinson Disease. Arch Neurol. 2006
13 Mar;63(3):328-34
14
15 39- Clark LN, Wang Y, Karlins E, et al. Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease. Neurology
16 2006;67:1786 –1791.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

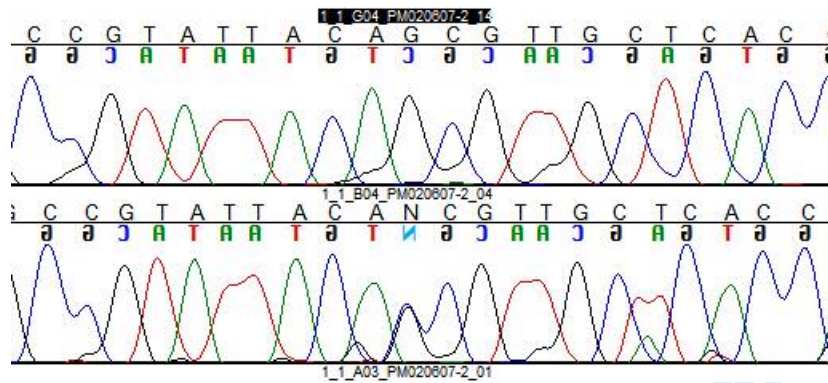


Figure 1- Novel mutation in *LRRK2* - Q923H

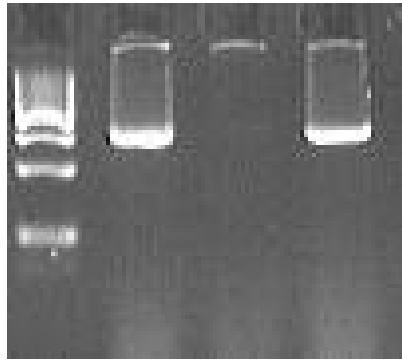


Figure 2- *PINK1* exon 7 homozygous deletion

For Peer Review

Table 1 – Demographic Features of the Population

Diagnosis	N	Age at onset	Male/Female	Familial History
Parkinsonism	226	55.2 ±14.6	127/99	29
IPD	202	52.4 ±13.2	113/89	29
Typical PD cases	157	58 ±9.62	88/69	18
Early onset PD	45	35 ±5.5	25/20	11

Table 2 – Clinical Features of Patients with Mutations

Patient	2035-21	2035-23	2035-46	2035-49	2035-76	2035-112	2035-43
Gene	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PARK2</i>	<i>PINK1</i>	<i>LRRK2</i>
Mutation	W54R	255Adel	T240M	P253R	255Adel	Ex7 del	Q923H
Gender	V3I Male	Female	Male	Dup exon5 Male	T240M Male	Ex7 del Female	Female
Current Age	54	52	38	46	64	43	51
Age et Onset	40	40	33	40	22	24	46
First symptom	Bradikynesia	Lower limb tremor	Tremor	Bradikynesia	Tremor	Tremor	Tremor
Follow up (years)	7	7	2	4	11	14	2
Family History	Negative	Negative	negative	negative	negative	negative	Positive (father and one brother)
UPDRS –III (On)	50	12	17	54	36	10	52
Progression rate (on motor score/year)	+2.5/year	+0.3/year	+1/year	+4/year	+0.8/year	+0.5/year	+5/year
Type	Rigid-akinetic	Tremor-dominant	Tremor- dominant	Rigid-akinetic	Tremor- dominant	Tremor- dominant	Rigid-akinetic
Neuroimaging	Normal CT scan	Normal MRI	Normal MRI	Normal CT scan	Normal CT scan	Normal MRI	Normal MRI
Time for Ldopa use (from the first symptom)	5 years	*	*	1 year	15 years	6 years	4 years
Time to develop dyskinesias	2 years	-----	-----	4 years	1 year	7 years	-----
Dyskinesias – (UPDRS score)	1-1-2-0	0	0	1-0-0-0	1-2-2-1	1-0-0-0	0
Surgery	No	No	No	No	Palidotomy	No	No
Psychiatric Symptoms	None	Generalized Anxiety Disorder	Depression	Anxiety	None	Anxiety	Depression

* Patient haven't been using Ldopa

Table 3 - Clinical Comparison Between EOPD With and Without mutations

	With Mutation	Without Mutation
N	6	39
Age at onset (years)	33.1±7.6	35±5.4
Male x female	4 x 2	20 x 19
Familiar history	all negative	8
Type of parkinsonism		
Rigid-akinetic	59%	33.3%
Tremor dominant	41%	66.6%
Response to Idopa		
Not using	15.4 %	33.3%
Good response	76.9 %	66.6%
Intolerance	7.7 %	0
Dyskinesias	66 %	76.9%