

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Aspectos genéticos, ambientais e suas interações na  
suscetibilidade e farmacogenética da doença de Parkinson**

**VIVIAN ALTMANN**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz**

Porto Alegre, abril de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e CAPES.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Mara, por todo o suporte desde a minha iniciação científica, por todos os conselhos, por estar sempre disposta a me ajudar, e principalmente, pelo exemplo que é como cientista.

Ao Carlos Rieder, pelas inúmeras discussões científicas, pelo suporte e dedicação durante minha caminhada acadêmica.

Aos meus pais por todo o apoio e dedicação a mim e a minha educação. Pela preocupação constante em me ver feliz e realizada profissionalmente.

À minha irmã, por me ouvir e me apoiar em todos os momentos.

Ao Mateus, por comemorar minhas vitórias, por acreditar em mim e me incentivar a ir cada vez mais longe.

À professora Bandi e à professora Sídia que estão sempre dispostas a ajudar.

Aos meus amigos do laboratório, Ana, Angélica, Artur, Deise, Gláucia, Juliana, Luciana, Mari Rieck, Mari Bottom, Mariana, Tetê, que me ensinaram muito, dividiram problemas, e estavam sempre dispostos a ajudar.

À minha família e aos meus amigos, por estarem sempre por perto, por fazerem meus dias mais felizes.

Ao Elmo, por todo apoio logístico, por estar sempre disposto a resolver problemas de última hora.

## Sumário

Lista de Abreviaturas .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
CAPÍTULO I .....	12
<i>Introdução</i> .....	12
A doença de Parkinson .....	13
Histórico .....	13
Epidemiologia.....	13
Manifestações clínicas e patológicas.....	14
Etiologia da doença de Parkinson.....	16
Fatores Ambientais .....	16
Fatores Genéticos .....	19
Interação gene-ambiente.....	24
Tratamento farmacológico .....	28
Farmacogenética da doença de Parkinson .....	30
<i>Justificativa e objetivos</i> .....	34
CAPÍTULO III .....	37
<i>The additive effect of eight gene polymorphisms on Parkinson's disease susceptibility in a Brazilian cohort</i> .....	37
CAPÍTULO IV .....	53
<i>Occupational exposure and SV2C and PON1 interaction on idiopathic Parkinson's disease</i> 53	
CAPÍTULO V .....	70
<i>The interplay between cigarette smoking and genetic factors on Parkinson's disease susceptibility</i> .....	70
CAPÍTULO VI.....	88
<i>The variable effect of caffeine consumption on Parkinson's disease is influenced by NOS1 genotypes</i> .....	88
CAPÍTULO VII.....	105
<i>Influence of genetic, biological and pharmacological factors on levodopa dose in Parkinson's disease</i> .....	105
CAPÍTULO VIII.....	114
<i>Discussão</i> .....	114
CAPÍTULO IX.....	122
<i>Bibliografia</i> .....	122

*Anexos*.....141

## Lista de Abreviaturas

ABCB1 – glicoproteína-P

ALDH – aldeído desidrogenase

*ALDH2* – gene da aldeído desidrogenase

CL – corpos de Lewy

COMT – catecol o-metiltransferase

CYP1A1 – citocromo P 450 1A1

CYP1A2 – citocromo P 450 1A2

CYP1B1 – citocromo P 450 1B1

CYP2D6 –citocromo P 450 2D6

DAT1 – transportador de dopamina 1

DDC – dopa-decarboxilase

DP – doença de Parkinson

*GBA* – gene da glicocerebrosidade cerebral

GRIN2A – receptor inotrópico de glutamato

GWAIS – genome-wide association and interaction study

GWAS – genome-wide association study “estudos de associação genômicos ”

HAPs – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

LRRK2 – quinase rica em leucina 2

MAOA – monoamina oxidase A

MAOB – monoamina oxidase B

MAPT – proteína tau

MPTP – 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine

NOS1 – óxido nítrico sintetase

OCT1 – transportador de cátions orgânico

PON1 – paraoxonase 1

SLC6A3 – transportador de dopamina 1

SNpc – *substantia nigra pars compacta*

SNCA – alfa-sinucleína

SV2C – proteína da vesícula sináptica 2C

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na espécie humana. A etiologia da DP é multifatorial, com muitos fatores ambientais e genéticos atuando em conjunto para sua determinação. Ao nível patológico ela caracteriza-se pela destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* e pelo acúmulo de corpos de Lewy no cérebro. Em aproximadamente 90% dos casos da DP, a suscetibilidade parece ser determinada por variantes comuns no genoma que podem interagir com o ambiente. Dentre os fatores ambientais que modulam o risco para a DP estão: uso de pesticidas, exposição ocupacional a tóxicos, consumo de café e cigarro. A variabilidade na resposta à principal medicação da DP, a levodopa, parece também estar relacionada à genética do indivíduo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a melhor compreensão dos fatores genéticos e suas interações com o ambiente envolvidos na suscetibilidade à DP e no tratamento com levodopa. Pacientes com DP e seus controles foram recrutados no ambulatório de distúrbios do movimento e no ambulatório de medicina interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, respectivamente. Os resultados obtidos foram organizados em cinco artigos. No primeiro estudo, foram considerados oito polimorfismos previamente associados à DP. Na nossa população, os indivíduos que possuíam sete ou mais alelos de risco desses polimorfismos apresentaram um *odds ratio* de 2,54 quando comparados a quem possuía seis alelos ou menos (95% IC 1,66-3,89;  $P = 1,80E-05$ ). Esse ponto de corte foi escolhido porque o número médio de alelos de risco na amostra foi 7. No segundo artigo, portadores do genótipo TT do polimorfismo rs1021463 e dos genótipos TT ou GT do polimorfismo rs30196 do gene *SV2C* apresentaram um maior risco a DP quando expostos ocupacionalmente a tóxicos, quando comparado a não-expostos (respectivamente, OR 2,53; 95% IC 1,33-4,69;  $P_{\text{interação}} = 0,008$  e OR 2,30; 95% IC 1,21-4,36;  $P_{\text{interação}} = 0,033$ ). O terceiro artigo mostra uma associação em que fumantes com o haplótipo T- não G -T do transportador *ABCB1* apresentaram menor risco a DP quando comparados a portadores do

haplótipo C-G-C (OR 0,34, 95% IC 0,15-0,72;  $P_{\text{interação}} = 0,012$ ). No quarto trabalho, foi constatada uma interação entre o gene *NOS1* e a cafeína modulando o risco da DP (OR 0,24; 95% IC 0,10-0,54;  $P_{\text{interação}} = 0,0002$ ). O último artigo trata da farmacogenética da levodopa, em que foi proposto um modelo com variáveis genéticas, biológicas e farmacológicas que explicou 23% da variabilidade na dose ( $F = 11,54$ ;  $P < 0,000001$ ). Observou-se uma redução da média de dose em aproximadamente 76 mg/dia por cada alelo C nos genótipos do polimorfismo rs30196 do gene *SV2C*. Estes trabalhos enriqueceram o conhecimento da variabilidade da DP tanto em aspectos de suscetibilidade quanto farmacogenética. Os dados obtidos serão importantes na continuação das pesquisas para identificar biomarcadores para prevenção e tratamento da DP.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in humans. PD etiology is multifactorial, due to several environmental and genetic factors. Pathologically, it is characterized by a selective destruction of dopaminergic neurons in *substantia nigra pars compacta* and by the accumulation of Lewy bodies in brain. In approximately 90% of PD cases, susceptibility seems to be driven by common variants in the genome that might interact with the environment. Among environmental factors that modulate PD risk, pesticides, occupational exposure to toxics, smoking and coffee consumption were identified. The variability in patients' response to the main medication of PD, levodopa, seems also to be related to genetics. Therefore, the present work had the objective to understand the genetic factors and their interaction with the environment involved in PD susceptibility and in the treatment with levodopa. Patients and controls were recruited at the movement disorders ambulatory and at the internal medicine ambulatory at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre respectively. The main results obtained were organized in five manuscripts. In the first, eight polymorphisms previously associated with PD were considered. In our population, individuals with 7 or more risk alleles presented an *odds ratio* of 2.54 for PD when compared to those with 6 or less alleles (95% CI 1.66-3.89;  $P = 1.80E-05$ ). This cut off was chosen because the average number of risk alleles in the sample was 7. In the second manuscript, *SV2C* rs10214163 TT genotype carriers and *SV2C* rs30196 TT/GT genotypes carriers showed a higher PD risk in subjects exposed to environmental toxics compared to those not exposed (respectively, OR 2.53; 95% CI 1.33-4.69;  $P_{\text{interaction}} = 0.008$  and OR 2.30; 95% CI 1.21-4.36;  $P_{\text{interaction}} = 0.033$ ). The third manuscript shows the association between *ABCB1* T-non G-T haplotype and smoking (OR 0.34, 95% CI 0.15-0.72;  $P_{\text{interaction}} = 0.012$ ). In the fourth manuscript, an interaction between *NOS1* gene and caffeine, modulating PD risk, was observed (OR 0.24; 95% CI 0.10-0.54;  $P_{\text{interaction}} = 0.0002$ ). The last manuscript reports a

model with genetic, biological and pharmacological variants in response to levodopa. This model explained 23% of dose variability ( $F = 11.54$ ;  $P < 0.000001$ ). The presence of each rs30196 C allele reduced the average dose in approximately 76 mg/day. All these work enriched the knowledge of the variability of PD in both susceptibility and pharmacogenetic areas. The data obtained will be important to identify biomarkers for disease prediction and treatment.

## **CAPÍTULO I**

### ***Introdução***

## **A doença de Parkinson**

### **Histórico**

Os primeiros seis casos de uma enfermidade diferente foram inicialmente descritos em 1817, em uma monografia denominada “An Essay on Shaking Palsy”, por James Parkinson. Devido aos seus primeiros relatos, a doença posteriormente levou o seu nome. James Parkinson denominou a síndrome de paralisia agitante, caracterizando-a pela presença de movimentos tremulantes involuntários, diminuição da força muscular, uma tendência à inclinação do tronco para frente e alteração na marcha (Parkinson, 1817 citado por Przedborski, 2017).

Aproximadamente meio século após a descrição da doença por James Parkinson, o neurologista Jean-Martin Charcot proporcionou importantes contribuições para o estudo desta patologia, definindo os sintomas cardinais da doença: tremor, bradicinesia e rigidez. Além disso, nomeou a doença e a delimitou como uma doença única (Teive, 1998).

### **Epidemiologia**

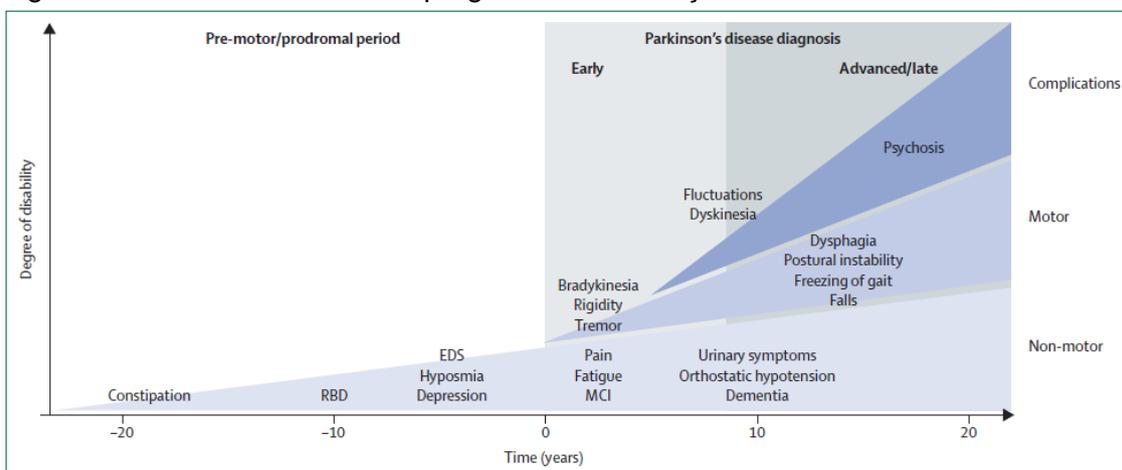
A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na espécie humana, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (Dorsey et al., 2007; Alzheimer’s Association, 2014). Sua incidência e prevalência aumentam em sincronia com a idade. Uma meta-análise com dados epidemiológicos abrangendo vários países mostrou uma prevalência de DP de 425 por 100.000 indivíduos no grupo de idade de 60 a 69 anos, chegando a 1.087 por 100.000 indivíduos no grupo de 70 a 79 anos. Esse estudo mostra também que a prevalência é dependente da região geográfica. Na América do Sul, uma prevalência de 2.180 indivíduos na faixa de 70 a 79 anos por 100.000 indivíduos foi estimada, enquanto que na Europa foi de 1.602 indivíduos e na Ásia 646 indivíduos por

100.000 na mesma faixa de idade (Pringsheim et al., 2014). No Brasil, um estudo de base populacional em Bambuí, Minas Gerais, identificou uma prevalência de 3,3% para a doença de Parkinson entre maiores de 60 anos (Barbosa et al., 2006).

## Manifestações clínicas e patológicas

Até o final do século 20, a DP era considerada uma doença puramente motora, caracterizando-se pelos sintomas descritos por J. Parkinson e J.M. Charcot como: bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos), tremor de repouso, instabilidade postural e rigidez muscular (Dauer & Przedborski, 2003). Todavia, hoje se sabe que a DP apresenta uma variedade de sintomas não motores, podendo eles se manifestar antes dos sintomas motores característicos (Figura 1). Os sintomas não motores compreendem disfunções autonômicas cardiovasculares, urogenitais e gastrointestinais, distúrbios do sono, hiposmia, transtornos de humor, psicose, ansiedade, déficit cognitivo e demência (Kalia & Lang, 2015; Jost, 2017).

Figura 1 - Sintomas clínicos e a progressão da doença



Kalia & Lang 2015

Acredita-se que os sintomas motores sejam resultantes de uma destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNpc), observada nos exames *post-mortem* dos pacientes com DP. Os núcleos dos neurônios dopaminérgicos se localizam na SNpc, e projetam suas aferências para o estriado: putamen e caudado. A diminuição desses neurônios dopaminérgicos determina uma despigmentação da SNpc, devido a falta da produção de neuromelanina, normalmente produzida por esses neurônios. Foi visto também que a perda neuronal ocorre em outras regiões cerebrais como: *locus ceruleus*, núcleo basal de Meynert, núcleo pedunculo pontine, núcleos da rafe, núcleo dorsal do vago, amígdala e hipotálamo e assim, envolvendo outros sistemas de neurotransmissores (noradrenérgico, colinérgico e serotonérgico) (Dauer & Przedborski, 2003; Lees et al., 2009).

Várias evidências sugerem que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos se inicia 6-8 anos antes dos sintomas clínicos. O início dos sintomas é tão gradual que torna difícil diagnosticar o início da doença. No momento do diagnóstico, a patologia da DP já se encontra estabelecida e os pacientes apresentam 50-60% de perda neuronal e 70-80% de depleção dopaminérgica. Essa latência entre o início da patologia e o da manifestação clínica possivelmente se deve a uma redundância das vias dopaminérgicas e mecanismos de compensação que mantêm a função dos núcleos da base estável por vários anos (Schapira & Obeso, 2006).

Outra característica clássica da DP é o acúmulo de inclusões citoplasmáticas conhecidas como corpos de Lewy (CL). Essas inclusões são formadas por material protéico. Trezentas proteínas diferentes foram identificadas nestas inclusões, predominando a alfa-sinucleína. Uma significativa perda neuronal é encontrada em sítios em que se encontram os CL, incluindo *substantia nigra*, *locus ceruleus* e núcleo basal de Meynert. Porém, esse achado não implica que os corpúsculos sejam a causa da morte celular (Wakabayashi et al., 2013).

Estudos *post-mortem* demonstraram que os CL se formam progressivamente e gradualmente afetam o sistema nervoso central. Esses estudos contribuíram para um modelo de evolução de neurodegeneração proposto por Braak et al. (2003). Neste modelo, o estágio inicial (estágio 1) apresenta CL no sistema nervoso periférico, bulbo olfatório e núcleo motor dorsal dos nervos vago e glossofaríngeo. No estágio 2 há comprometimento da ponte até chegar ao mesencéfalo, onde se localiza a SNpc, caracterizando assim o estágio 3. Depois, a neurodegeneração chega até o prosencéfalo e mesocortex (estágio 4), culminando em múltiplas regiões corticais (estágios 5 e 6) (Braak et al., 2003; Kalia & Lang, 2015). O modelo de Braak et al. ganhou muita visibilidade porque a hipótese de progressão temporal e espacial conseguiu explicar o curso clínico da DP, em que não há acometimento exclusivo do sistema dopaminérgico, mas sim, de vários outros sistemas monoaminérgicos. Estágios 1 e 2 correspondem ao início dos sintomas motores, estágio 3 se caracteriza pela apresentação dos sintomas motores, devido à depleção dopaminérgica. Nos estágios 4 a 6, com o avanço da doença, e atingindo regiões corticais, ocorrem sintomas não motores como déficit cognitivo e demência. Porém, os CL não são específicos para DP, sendo encontrados em outras doenças como demência de corpos de Lewy, Doença de Gaucher e doença de Alzheimer com CL (Wakabayashi et al., 2013).

O diagnóstico definitivo da doença só ocorre após o exame do cérebro *post-mortem*, no qual se pode observar a degeneração da SNpc e os CL. Os critérios diagnósticos clínicos atuais utilizados para a DP são baseados no Banco de cérebro de Londres, que fez uma extensa correlação clínico-patológica de cérebros de pacientes com DP e sintomas característicos (Hughes et al., 1992).

## **Etiologia da doença de Parkinson**

### **Fatores Ambientais**

No final dos anos 70 uma neurotoxina que reproduz os sintomas da DP nos indivíduos intoxicados estimulou o interesse dos pesquisadores. Essa neurotoxina, conhecida como MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine), é um produto da síntese de opióides (Przedborski, 2017). Indivíduos intoxicados com MPTP apresentaram uma degeneração específica de neurônios dopaminérgicos, porém sem a presença dos CL. Ao nível molecular, o MPTP administrado em modelos animais consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica, é convertido ao metabólito MPP+, que é transportado ativamente e seletivamente para neurônios dopaminérgicos pelos transportadores de dopamina (DAT), se acumulando nos neurônios dopaminérgicos (Blum et al., 2001). A toxicidade do MPTP é resultante de altos níveis de MPP+ que inibem o complexo I da cadeia de transporte de elétrons na matriz mitocondrial (Przedborski, 2017). Atualmente, essa substância é utilizada para produzir modelos animais para DP devido à alta similaridade neuropatológica e neurofisiológica da DP esporádica determinada nesses animais por esse composto (Winklhofer & Haass, 2010).

Após a descoberta do MPTP, várias outras substâncias foram associadas à DP sugerindo uma hipótese de que o ambiente poderia determinar ao menos em parte a DP. A influência ambiental na DP engloba tanto fatores mais gerais como industrialização, ambiente rural, mineração, utilização de água de poço, toxinas de plantas, microbiota intestinal e infecções bacterianas ou virais quanto mais específicos como alguns solventes orgânicos, medicamentos, monóxido de carbono e manganês (Bellou et al., 2015).

Muitos estudos apontam o uso de pesticidas como um dos principais fatores ambientais de suscetibilidade a DP (Nandipati & Litvan, 2016). Pesticidas compreendem uma gama de compostos desenhados para matar insetos (inseticidas), plantas (herbicidas), fungos (fungicidas) e roedores (rodenticidas). Uma meta-análise com 46 estudos mostrou um risco de 1,6 para exposição a qualquer tipo de pesticida (van der Mark et al., 2011). Os pesticidas que mais frequentemente são associados à DP são a rotenona e o paraquat. Outros pesticidas, pertencentes à classe dos organoclorados, carbamatos, organofosfatos e

piretroides, são pouco estudados e possuem poucas evidências de contribuição para a etiologia da DP (Goldman, 2014).

A rotenona é um composto derivado de planta que inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, no mesmo local atacado pelo MPP+. É utilizada como inseticida há décadas na agricultura e jardinagem (Goldman, 2014). Estudos epidemiológicos mostram que quem aplica rotenona profissionalmente tem um maior risco à DP em relação a quem nunca aplicou (Dhillon et al., 2008; Tanner et al., 2011). Em ratos, a administração de rotenona desencadeou sintomas de bradicinesia, instabilidade postural e rigidez, com resposta à dopamina. Eles também apresentaram morte neuronal na *substantia nigra* e estriado (Nandipati & Litvan, 2016).

O paraquat é outro composto frequentemente associado a risco da DP. Ele é um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Tanner et al., 2011). Sua estrutura é muito similar ao MPTP. A maioria dos estudos caso-controles mostra que o paraquat confere risco à DP, embora com resultados conflitantes (Elbaz et al., 2009; Tanner et al., 2011; Kamel et al., 2014).

Em contrapartida, existem dois fatores que mostraram consistentemente conferir proteção à DP: o café e o cigarro. Ambos parecem ser protetores de maneira dose-dependente (Wirdefeldt et al., 2011).

É importante ressaltar que fumar cigarro, consumir tabaco sem a fumaça ou expor-se à fumaça do tabaco no ambiente estão associados a um menor risco de DP (Ma et al., 2017). Duas meta-análises mostraram que indivíduos fumantes possuem um risco de DP 40 a 50% menor do que não fumantes (Hernán et al., 2002; Ritz et al., 2007). Além disso, um grande estudo de coorte prospectivo realizado por Hernán et al. (2001) mostrou a relação inversa dose-dependente entre fumar cigarro e risco de DP, com riscos relativos de 0,8, 0,6, 0,5, e 0,4, para 1-9, 10-24, 25-44, e 45 ou mais maços/ano, respectivamente.

A exposição à fumaça do cigarro foi associada a um risco de DP 64% menor comparado a não expostos, sendo que nos fumantes passivos, o risco era inversamente

proporcional aos anos expostos à fumaça (Nielsen et al., 2012). Entretanto, o efeito do cigarro não parece influenciar na progressão da DP (Golbe, 1986; Alves et al., 2004; Kandinov et al., 2007).

Uma das hipóteses que explica a razão de cigarros conferirem proteção à DP é de que há uma menor resposta à nicotina na fase prodrômica da DP. Com isso, pacientes parariam de fumar antes do início da DP. E o parar de fumar seria um aspecto da DP pré-clínico. Porém essa hipótese não explicaria o baixo risco dos que nunca fumaram quando comparados aos que já fumaram, encontrado em vários estudos (Ascherio & Schwarzschild, 2016). Outra hipótese é que o tabaco e seus derivados possuem efeitos neuroprotetores, mas ainda não há evidências na literatura de quais mecanismos confeririam essa neuroproteção (Ascherio & Schwarzschild, 2016; Delamarre & Meissner, 2017).

Assim como o cigarro, o café é um fator protetor para a DP. Bebidas cafeinadas, como chá, café e chimarrão, contêm uma mistura de várias substâncias, dentre elas, a cafeína é a mais estudada. Meta-análises mostraram uma relação linear inversa entre dose de cafeína e risco de DP (Costa et al., 2010; Qi & Li, 2014). Apesar de se pensar que o consumo de cafeína e tabaco são altamente correlacionados, o efeito protetor da cafeína é visto mesmo em indivíduos que nunca fumaram cigarro (Kiebertz & Wunderle, 2013; Ascherio & Schwarzschild, 2016).

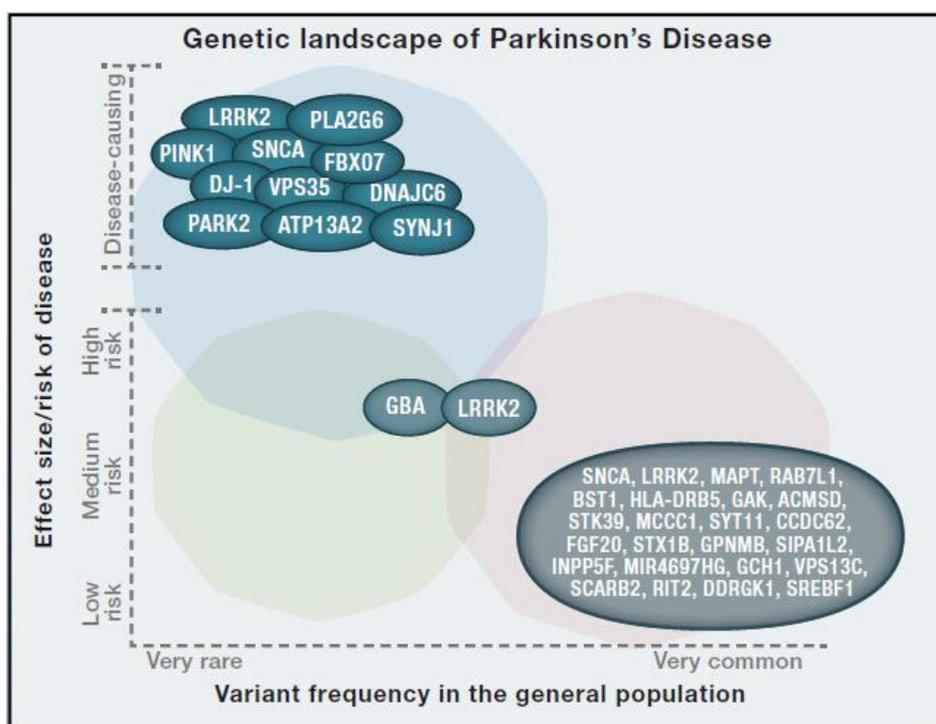
O efeito neuroprotetor na *substantia nigra* pode ser devido à inibição competitiva da cafeína e adenosina aos receptores de adenosina A2A neste local. Este processo de antagonismo que a cafeína produz parece diminuir a liberação de glutamato e atenua a citotoxicidade (Kolahdouzan & Hamadeh, 2017). Porém, os estudos ainda são incipientes, e não se sabe se a cafeína possa também atuar por outras vias.

## **Fatores Genéticos**

Apesar de as primeiras evidências de fatores ligados a DP sejam de origem ambiental, nos últimos vinte anos, variantes genéticas vem ganhando espaço no cenário de

suscetibilidade para a DP. A contribuição genética na DP parece abranger um amplo espectro (contínuo), onde a DP monogênica e a esporádica estariam em extremidades opostas, como pode ser visto na Figura 2. Mutações mendelianas estão ligadas à DP monogênica, que é caracterizada por um início mais precoce nos indivíduos. A DP monogênica é pouco frequente, abrangendo 5 a 10% dos casos de DP (Lill, 2016). Enquanto que à forma mais comum da doença (90% dos casos), é a DP esporádica. Essa forma está associada a variantes mais comuns da doença. Cada uma dessas variantes confere um efeito baixo no risco para desenvolver a DP. A presente tese detalha a seguir os principais genes desse espectro.

Figura 2 – Espectro de risco genético da DP



(Brás et al., 2015)

A primeira mutação ligada a DP, encontrada há mais de 20 anos, é de herança autossômica dominante, a Ala53Thr no gene da alfa-sinucleína (*SNCA*) (Polymeropoulos et al., 1996). Depois disso, mais quatro mutações já foram identificadas em estudos de ligação, entre elas, Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln e Gly51Asp (Trinh & Farrer, 2013). Mutações

nesse gene são raras e altamente penetrantes, apesar da alta variabilidade clínica observada nos pacientes portadores de mutação (Singleton et al., 2013). Duplicações e triplicações do *SNCA* também são frequentes na DP monogênica, chegando a 1 a 2 % dos casos, sendo descrita também em casos esporádicos da DP (Nuytemans et al., 2010; Singleton et al., 2013). Essas cópias a mais parecem adiantar o início da doença e agravar seus sintomas (Trinh & Farrer, 2013). Porém, alguns estudos mostraram que portadores dessas duplicações ou triplicações eram assintomáticos, portanto sua penetrância é reduzida. Biologicamente, a proteína *SNCA* mutante assim como a super-expressão do *SNCA* selvagem parecem ter uma maior propensão a não realizar um correto dobramento das mesmas. Esse processo gera o acúmulo de *SNCA* que se mostrou neurotóxico (Nuytemans et al., 2010).

Mutações no gene da quinase rica em leucina 2 (*LRRK2*) são as causas mais comuns da forma familiar da DP, chegando até 10% dos casos de herança dominante e 2% nos casos esporádicos (Nuytemans et al., 2010; Spatola & Wider, 2014). *LRRK2* possui 51 exons e codifica uma proteína com duas subunidades enzimáticas, GTPase e quinase. Essa proteína está envolvida em vias celulares que regulam a formação e crescimento de dendritos neuronais, endocitose, autofagia e imunidade. Quase 80 mutações foram descritas, mas somente sete (Asn1437His, Arg1441Cys/Gly/His, Tyr1699Cys, Gly2019Ser e Ile2020Thr) parecem ser confirmadas como patogênicas a partir de suas análises de cosegregação e sua ausência em controles (Singleton et al., 2013). A mutação mais comum é a que determina uma substituição p.G2019S, descrita tanto em formas familiares (4 a 6,6% dos casos) quanto esporádicas da doença (1 a 4,2% dos casos) (Di Fonzo et al., 2005; Gilks et al., 2005; Healy et al., 2008; Cornejo-Olivas et al., 2017). No Brasil, esta mutação foi encontrada em 4,2% de casos com DP familiar e 1,4% em casos esporádicos (Abreu et al., 2016; Cornejo-Olivas et al., 2017). Dessa forma, pode ser considerada uma mutação de médio efeito/risco para PD e de frequência não tão rara (Figura 2). Pacientes com esta

mutação foram indistinguíveis tanto na forma esporádica quanto na familiar em relação aos dados clínicos, apresentando boa resposta à levodopa (Healy et al., 2008).

Outros genes descritos na literatura foram identificados em menor número de casos. Seus efeitos na doença podem variar em relação aos sintomas, idade de início ou progressão da doença e as mutações causais podem ser recessivas ou dominantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes de herança mendeliana ligados à doença de Parkinson.

<b>Gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Função</b>	<b>Herança</b>
<b><i>PARK2/Parkin</i></b>	6q25.2-q27	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitocôndria</li> <li>• Ubiquitinação</li> <li>• Sinapses</li> </ul>	AR
<b><i>PINK1</i></b>	1p36	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitocôndria</li> </ul>	AR
<b><i>DJ-1</i></b>	1p36.23	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema inflamatório</li> <li>• Mitocôndria</li> </ul>	AR
<b><i>PLA2G6</i></b>	22q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitocôndria</li> </ul>	AR
<b><i>FBX07</i></b>	22q12.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ubiquitinação</li> <li>• Mitocôndria</li> </ul>	AR
<b><i>VPS35</i></b>	16q12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autofagia</li> <li>• Lisossomo</li> <li>• Endocitose</li> </ul>	AD
<b><i>ATP13A2</i></b>	1p36	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitocôndria</li> <li>• Autofagia</li> <li>• Lisossomo</li> </ul>	AR
<b><i>DNAJC6</i></b>	1p31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinapses</li> <li>• Endocitose</li> </ul>	AR
<b><i>SYNJ1</i></b>	21q22.2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinapses</li> <li>• Endocitose</li> </ul>	AR

AD: autossômico dominante, AR: autossômico recessiva

A observação clínica de que pacientes com a doença de Gaucher e seus familiares possuíam sinais de parkinsonismo mais frequentemente do que o esperado levou a identificação de variantes genéticas no gene da glicocerebrosidade cerebral (*GBA*) em casos de DP (Lill, 2016). A *GBA* é uma enzima lisossomal responsável pela lise de glicocerebrosídeos em glicose e ceramida. Mutações em homozigose na *GBA* são responsáveis pela principal doença de depósito lisossomal, a doença de Gaucher. Quase

300 mutações foram descritas em pacientes com a doença de Gaucher, porém as mais frequentes na população brasileira são N370S e L444P (Rozenberg et al., 2006; Sidransky et al., 2009; Siebert et al., 2012). A heterozigose para essas mutações no *GBA* parecem ser um importante fator de risco para a DP. O risco acumulado para indivíduos portadores de mutações nesse gene foi estimado em 2,2% e 10,9% aos 65 anos e 85 anos, respectivamente (Rana et al., 2013). Em uma meta-análise de nove populações, verificou-se que as mutações N370S e L444P possuíam um *odds ratio* de 3,96 e 6,73 respectivamente para desenvolver a DP. Em uma amostra brasileira de São Paulo, com 65 indivíduos, 3% dos pacientes com DP apresentaram uma dessas duas mutações (Spitz et al., 2015). Os dados de mutações em *GBA* fazem com que este gene seja o fator de risco genético mais comum para a DP até o momento. Além disso, pacientes com DP que apresentam mutações no *GBA* parecem ter tremor, bradicinesia, rigidez em menor frequência, e alterações cognitivas em maior frequência (Sidransky et al., 2009; Alcalay et al., 2012; Spitz et al., 2015).

O gene da MAPT codifica a proteína tau que estabiliza microtúbulos, sendo essencial para o transporte axonal em neurônios (Garcia & Cleveland, 2001). Mutações nesse gene foram primeiramente encontradas em famílias com demência fronto-temporal com parkinsonismo ligado ao cromossomo 17 (FTD17) (Dumanchin et al., 1998; Hutton et al., 1998). Investigações sobre o papel de variantes genéticas no MAPT na DP foram motivadas pelas características compartilhadas entre a DP e outras doenças como doença de Alzheimer (Huang & Mucke, 2012), Paralisia Supranuclear Progressiva (Litvan et al., 1996) e degeneração cortico basal (Dickson et al., 2002). Todas essas doenças, também chamadas de taupatias, apresentam agregação intraneuronal de proteína tau hiperfosforilada. Dois haplótipos foram descritos nas populações caucasianas: H1 e H2. O H1 foi associado ao maior risco de DP (Golbe et al., 2001; Maraganore et al., 2001; Martin et al., 2001; Farrer et al., 2002). Interessantemente, indivíduos da população asiática são monomórficos para o

haplótipo H1, porém nenhuma associação a DP foi encontrada nessas populações (Satake et al., 2009).

Os estudos de associação genômicos (GWAS) forneceram uma nova dimensão na busca de variantes relacionadas às doenças comuns. Ao invés de se concentrar em genes candidatos, o genoma é rastreado sem qualquer preferência para regiões específicas, genes ou suas variantes, sendo descrito como uma abordagem "sem hipótese *a priori*" (Kitsios & Zintzaras, 2009). Os GWAS ofereceram a oportunidade de superar dificuldades e obstáculos impostos pela compreensão incompleta da fisiopatologia e etiologia da DP e de outras doenças. Em 2014, Nalls et al. geraram a maior meta-análise de dados genômicos da DP. Vinte e oito loci independentes foram associados à DP. Dentre eles, puderam-se confirmar genes que mesmo antes da "era GWAS" já tinham sido associados à DP, como SNCA, LRRK2, GBA e MAPT. Já os genes MCCC1, TMEM175 e RIT2 foram identificados como novos genes associados à DP. Polimorfismos nesses genes foram fortemente associados com DP nessa análise. Embora os estudos de GWAS tenham ajudado a identificar e estabelecer variantes de risco para a DP, as funções dos genes identificados permanecem não esclarecidas.

### **Interação gene-ambiente**

Visto que a maioria dos casos de DP é esporádica e os fatores genéticos explicam pouco do risco para a doença, estudos de interação gene-ambiente começaram a ser propostos na busca de explicações para sua patogênese. Genes que afetam a absorção, metabolismo e excreção dos xenobióticos foram os mais estudados (Tsuboi, 2012; Ritz et al., 2016). Apesar do número considerável de estudo de interação gene-ambiente na DP disponíveis na literatura, eles ainda são muito controversos, heterogêneos e possuem pequeno tamanho amostral.

A família das enzimas do citocromo P450 é conhecida por metabolizar uma gama de xenobióticos. O CYP2D6 é um exemplo de enzima responsável por metabolizar xenobióticos no fígado, incluindo pesticidas. A interação do gene do CYP2D6 com a exposição a pesticidas mostrou um risco maior em pacientes com DP portadores de alelos de baixa metabolização (Deng et al., 2004; Elbaz et al., 2004). O CYP1A1 é um dos maiores metabolizadores de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) como o benzopireno presente na fumaça do cigarro e no café (Kim et al., 1998). O CYP1A2 participa da metabolização de vários pró-carcinogênicos derivados da fumaça do cigarro e de algumas comidas. É responsável por metabolizar aproximadamente 95% da cafeína ingerida (Butler et al., 1989; Matthaei et al., 2016). Três meta-análises de GWAS apontaram regiões nos genes *CYP1A1* e *CYP1A2* associadas a um maior consumo de café (Cornelis et al. 2011; Sulem et al. 2011; Amin et al. 2012). Na DP, o efeito da interação de variantes no gene *CYP1A2* e da cafeína ainda é controverso. Um estudo mostrou uma interação *CYP1A2* e cafeína (Popat et al., 2011), enquanto que outros três estudos não observaram essa interação (Tan et al. 2007; Facheris et al. 2008; Hill-Burns et al. 2011). Apesar de ser um forte gene-candidato, não foram descritos na literatura estudos de interação gene-ambiente envolvendo o *CYP1A1* na DP.

O CYP1B1 está envolvido na ativação dos componentes da fumaça do cigarro, como os HAPs. Sua expressão é induzida com ativação de HAPs por meio dos receptores de hidrocarbonetos aromáticos (Christou et al., 1995). Uma variante nesse gene, CYP1B1\*3 (rs1056836), foi associado a maior atividade da enzima (Shimada et al., 1999). O único estudo que avaliou a interação CYP1B1 e tabaco não encontrou efeito de variante CYP1B1\*3 na DP (De Palma et al., 2010).

A enzima da monoamina oxidase B (MAOB) é responsável pela degradação da dopamina na fenda sináptica (Riederer et al., 1989). A evidência de que fumantes tinham 40% menor atividade da MAOB do que não fumantes (Fowler et al., 1996), levou a uma série de estudos de interação relacionados à DP. A primeira investigação relatou uma

interação entre o polimorfismo rs1799836 e fumo na suscetibilidade a doença (Checkoway et al., 1998). Depois, se constatou uma diferença de gênero na interação do fumo e esse polimorfismo da *MAOB* (Kelada et al., 2002). Contudo, outros quatro estudos não apoiam esses achados (Hernán et al., 2001; Tan et al., 2003; De Palma et al., 2010; Gu et al., 2010).

A glicoproteína-P (*ABCB1*), também conhecida como proteína de multirresistência a drogas (*MDR1*), é um transportador de várias substâncias para dentro e fora da célula e através da barreira hematoencefálica, com mais de uma centena de substâncias descritas (Amin, 2013). Dentre elas estão os compostos derivados do cigarro e pesticidas. Um haplótipo derivado dos polimorfismos rs1045642 e rs2032582 do *ABCB1* está associado a menor expressão da proteína (Hitzl et al., 2004). Os dois polimorfismos parecem ser modificadores do risco de DP em caso de exposição a pesticidas organoclorados (Dutheil et al., 2010; Narayan et al., 2015). Também foi constatada uma interação do polimorfismo rs1045642 e consumo de bebida alcoólica na DP (Kiyohara et al., 2013).

A paraoxonase 1 (*PON1*) participa da detoxificação de pesticidas no soro. Essa enzima hidroliza o composto oxon dos organofosfatos, presente em vários pesticidas (Gan et al., 1991; Androutsopoulos et al., 2011). O gene da *PON1* foi o mais investigado nos estudos de interação com pesticidas. De uma forma geral os resultados são controversos e não conclusivos (Ritz et al., 2016). Estudos funcionais revelaram que duas variantes L55M e Q192R determinam menor metabolização dos substratos nos homocigotos “MM” ou “QQ” (Garin et al., 1997; Li et al., 2000; O’Leary et al., 2005). Um estudo de exposição, definido pelo local de residência, aos organofosfatos diazinon, clorpirifos e paration foi conduzido na Califórnia, EUA, e descreveu que indivíduos expostos aos organofosfatos com genótipos de metabolizadores rápidos da *PON1* mostraram um risco menor de DP quando comparados aos metabolizadores lentos (Lee et al., 2013). Porém, outros dois estudos não observaram o efeito dessas variantes no risco para DP em pacientes com exposição ocupacional a pesticidas (Fong et al., 2005; Dick et al., 2007).

Alguns pesticidas específicos, pertencentes às classes ditiocarbamato, imidazol, dicarboximida, e organoclorados que possuem a propriedade de inibir a aldeído desidrogenase (ALDH) também foram investigados. Um estudo com o gene da ALDH (ALDH2) mostrou um aumento no risco de DP de 2 a 5 vezes em pacientes portadores do alelo C do polimorfismo rs737280 e com exposição a essas classes de pesticidas (Fitzmaurice et al., 2014).

A NOS1 codifica a enzima óxido nítrico sintetase, que produz o óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina. No cérebro, o óxido nítrico possui propriedades de neurotransmissor e está associado às doenças neurodegenerativas (Echeverri et al., 2010). O uso de café parece alterar os níveis de óxido nítrico na circulação. Um estudo *in vitro* mostrou que metabólitos do café aumentam a atividade da NOS1 de maneira dose-dependente (Huang et al., 2004). Além disso, foi sugerido que a NOS1 e pesticidas poderiam agir sinergisticamente para aumentar o risco de DP, uma vez que ambos contribuem para o dano neuronal (Dauer & Przedborski, 2003; Paul et al., 2015). O uso de pesticidas em associação com três polimorfismos da NOS1 foi observado em famílias com casos de DP. Paul et al. (2015) na tentativa de reproduzir esse achado, relataram a interação entre pesticidas e o polimorfismo rs2682826 da NOS1 associado a casos de DP esporádica, porém na direção oposta ao previamente publicado.

Estudos de associação ao nível genômico, com interação com o ambiente ainda são pouco realizados. Há dois estudos de GWAIS (genome-wide association and interaction study) que evidenciaram genes que não tinham sido relacionados à DP. Um de interação com a cafeína obteve como maior sinal um polimorfismo no gene *GRIN2A* (rs4998386) em associação a DP. Portadores do alelo T possuem menor risco de DP comparados ao genótipo CC (Hamza et al., 2011). E o outro de interação com o fumo identificou o gene do *SV2C*, que codifica a proteína da vesícula sináptica 2C (Hill-Burns et al., 2013). Esse achado foi corroborado em uma análise de expressão gênica em *Drosophila melanogaster* utilizadas como modelo para DP. Quando as moscas eram tratadas com nicotina, o efeito

mais benéfico foi proporcionado por um gene análogo ao SV2C nesses animais. Pouco se sabia sobre o SV2C até o GWAIS publicado por Hill-Burns et al. (2013), somente que era altamente expresso na *substantia nigra* e que mediava a entrada de neurotoxinas como a neurotoxina botulínica A nos neurônios (Mahrhold et al., 2006; Dardou et al., 2011).

### **Tratamento farmacológico**

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc provoca um déficit de dopamina no estriado, e esse fenômeno é o responsável pelos sintomas motores da DP. O tratamento da DP mais efetivo é pela reposição farmacológica do neurotransmissor dopamina, a partir de seu precursor, a levodopa. A levodopa é a principal medicação para o controle dos sintomas motores. Ela é administrada oralmente, sendo absorvida no duodeno, passa a barreira hematoencefálica e é convertida a dopamina nos neurônios da *substantia nigra*. Os efeitos adversos agudos da levodopa são náusea, vômitos e hipotensão postural, e se devem a sua conversão periférica para dopamina, através da enzima dopa-decarboxilase. Por essa razão, a levodopa é administrada juntamente com inibidores dessa enzima, para impedir a degradação periférica da droga e reduzir a intolerância gastrointestinal, assim permitindo a entrada da levodopa em maior concentração no cérebro (Kostrzewa et al., 2005). A levodopa é disponível em várias formulações e o manejo da medicação é feito de forma a obter menos efeitos adversos e a melhor resposta motora do paciente.

No início do tratamento essa medicação se mostra extremamente eficaz, reduzindo os sintomas da doença. Entretanto, o uso continuado da levodopa pode provocar o surgimento de fenômenos indesejados, como a flutuação motora, a discinesia e a alucinação. Foi estimado que aproximadamente 35% e 40% dos pacientes irão desenvolver flutuações motoras e discinesias, respectivamente, em 4 a 6 anos de tratamento dopaminérgico (Connolly & Lang, 2014). A flutuação motora é uma alternância da resposta

clínica da levodopa. O paciente no estado “on” apresenta boa resposta à medicação, com controle do tremor, da rigidez e da bradicinesia. No estado “off” ele não apresenta efeito da medicação. Esses estados podem ser imprevisíveis e iniciar de maneira abrupta nas flutuações motoras (Fox & Lang, 2008). A discinesia é complicação do estado "on", mais precisamente quando há um pico de dose, caracterizada por movimentos involuntários anormais e excessivos, podendo afetar qualquer parte do corpo (Sorbo & Albanese, 2008). Essas complicações motoras alteram a qualidade de vida do paciente com DP, aumentam os custos do tratamento e são um desafio ao médico assistente, uma vez que deverá utilizar outras medicações ou esquemas posológicos mais complexos (Oertel & Schulz, 2016).

O tratamento a partir de outros medicamentos como agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAOB e da catecol o-metiltransferase (COMT), amantadina e anticolinérgicos, administrados sozinhos ou em conjunto com a levodopa, também é realizado.

Os agonistas dopaminérgicos atuam diretamente no neurônio pós-sináptico no estriado. Dez agonistas dopaminérgicos estão disponíveis para tratamento da DP, sendo cinco derivados do ergot (bromocriptina, cabergoline, lisurida e pergolida) e cinco não derivados do ergot (piribedil, pramipexole, ropinirol, apomorfina e rotigotina). Normalmente são recomendados no início do tratamento como uma monoterapia ou conjuntamente com a levodopa para minimizar flutuações motoras (Olanow et al. 2009; Oertel & Schulz, 2016).

Inibidores de enzimas que degradam a dopamina, a MAOB e a COMT, prolongam o efeito da dopamina na fenda sináptica. Inibidores da MAOB podem ser usados no início da doença com monoterapia ou em conjunto com a levodopa para manejo das complicações motoras. Já os inibidores da COMT são mais utilizados quando há flutuações motoras (Factor, 2008; Olanow et al., 2009).

A amantadina é geralmente indicada em fases iniciais de casos de DP com sintomas leves em monoterapia e para reduzir discinesias em fases mais tardias. Eventualmente pode causar efeitos adversos como delírio, alterações cognitivas, agitação psicomotora e

mioclonias. Seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, mas parece ter efeitos anticolinérgicos, bloqueio da recaptação dopaminérgica, aumento da liberação de dopamina e estímulo dos receptores dopaminérgicos (Hubsher et al., 2012).

Os anticolinérgicos são os medicamentos mais antigos para tratar DP. O uso destes foi muito reduzido depois da descoberta da levodopa. Ocasionalmente esses medicamentos são utilizados em pacientes mais jovens, os quais apresentem o tremor como principal sintoma e que não tenham algum déficit cognitivo. Os anticolinérgicos são de uso limitado, principalmente nos pacientes mais idosos, devido a seus efeitos adversos: perda de memória, confusão e alucinação (Olanow et al., 2009).

### **Farmacogenética da doença de Parkinson**

Embora muitos medicamentos sejam utilizados no tratamento da DP, nenhum deles parece diminuir ou parar a neurodegeneração ou a progressão dos sintomas. À medida que a DP progride, a eficácia dos fármacos vai diminuindo, necessitando de doses mais altas ou mudanças no esquema posológico (Payami, 2017). A resposta individual a levodopa e outros medicamentos antiparkinsonianos é muito variável, podendo ser em parte explicada por fatores genéticos. Nesse contexto, estudos de farmacogenética começaram a ser realizados, visando ao tratamento personalizado de acordo com o perfil genético individual. A maioria dos estudos de farmacogenética da DP é direcionada aos efeitos adversos da levodopa: discinesias, alucinações e flutuações motoras. Apenas 13% dos estudos focam na dose ideal de levodopa, e uma minoria foca em outros medicamentos antiparkinsonianos (Schumacher-Schuh et al., 2014a). Nesse tópico, serão abordados apenas os principais estudos farmacogenéticos relacionados à dose de levodopa já que esse foi o objetivo da presente Tese.

Lee et al. (2001), Contin et al. (2005) e Moreau et al. (2015) realizaram desafio oral agudo de levodopa nos pacientes, e não encontraram diferença na resposta motora em relação aos genótipos do polimorfismo Val158Met da COMT. Bialecka et al. (2004) constataram uma associação do genótipo Met/Met do mesmo polimorfismo com doses menores de levodopa nos primeiros cinco anos da doença. O mesmo grupo também encontrou um haplótipo de quatro polimorfismos da COMT, cujos alelos possuem maior atividade enzimática, associado a maiores doses de levodopa (Bialecka et al., 2008). Já Cheshire et al. (2013) observaram em sua amostra que somente genótipos de alta atividade da COMT em conjunto com genótipo de alta atividade da monoamina oxidase A (MAOA) estavam associados a maiores doses equivalentes de levodopa.

A levodopa parece ser substrato dos transportadores de cátions orgânicos (OCT1), envolvidos em transportar compostos endógenos como a dopamina e outros medicamentos antiparkinsonianos no intestino, fígado e cérebro (pramipexol e amantadina). O alelo C do polimorfismo rs622342 no gene do OCT1 foi associado a menores doses de fármacos antiparkinsonianos em geral (Becker et al., 2011).

A enzima dopa-decarboxilase também foi alvo de estudo de farmacogenética, uma vez que possui um importante papel, degradando a dopamina nas vias periféricas. Devos et al. (2014) avaliou a resposta motora em relação ao desafio oral de uma dose única de levodopa com benzerazida (inibidor da dopa-decarboxilase) em 39 pacientes genotipados para dois polimorfismos do gene da dopa-decarboxilase (*DDC*). A resposta motora foi inferior em indivíduos que possuíam o alelo C do rs921451 ou eram portadores de uma deleção no polimorfismo rs3837091. Esse achado não foi corroborado pelo estudo do desafio oral de levodopa/benzerazida de Moreau et al. (2015), que avaliou os mesmos polimorfismos rs921451 e rs3837091, mas não encontrou diferença na resposta motora dos pacientes.

O transportador de dopamina possui ação central na ação deste neurotransmissor por ser responsável pela sua recaptação pré-sináptica, regulando temporal e espacialmente a quantidade de dopamina na fenda sináptica. O gene desse transportador (*DAT1* ou *SLC6A3*) possui dois polimorfismos associados à eficácia da medicação dopaminérgica (rs3836790 e rs28363170) (Schumacher-Schuh et al., 2013; Moreau et al., 2015). No estudo de Schumacher-Schuh et al., o alelo de 9 repetições do rs28363170 estava associado a menores doses equivalentes de levodopa. Enquanto que no estudo de Moreau et al., melhor resposta motora após desafio oral de levodopa foi vista com o haplótipo de 6 e 10 repetições dos polimorfismos rs3836790 e rs28363170 respectivamente. Portanto, esse estudo sugere que os pacientes com genótipos 6/6 do rs3836790 ou 10/10 do rs28363170 exigiriam menores doses de levodopa e/ou teriam maior intervalo entre as doses.

O entacapone é um dos potentes inibidores da COMT. O efeito do polimorfismo Val158Met da *COMT* sobre o entacapone é controverso na literatura. Corvol et al. (2011) realizaram um ensaio clínico para observar o efeito da administração de levodopa em conjunto com entacapone ou placebo. Pacientes com genótipo Val/Val possuíam uma resposta motora mais duradoura, com mais tempo “on”. Já dois outros estudos realizaram ensaios parecidos, com mesmo tempo de administração de entacapone, e detectaram um maior tempo “on” independente dos genótipos da *COMT* (Lee et al., 2002; Seon et al., 2011).

Estudos com o pramipexol, um agonista dopaminérgico, mostraram que a resposta motora é dependente do polimorfismo Ser9Gli no gene *DRD3*. Liu et al. (2009) observaram que pacientes Ser/Ser tratados prospectivamente por dois meses com pramipexol, possuíam melhores taxas de resposta ao medicamento que pacientes portadores do alelo Gli. Em concordância, Xu et al. (2017), descreveram que pacientes com genótipos Ser/Ser e Ser/Gli utilizavam menores doses de pramipexol do que pacientes com genótipo Gli/Gli utilizando uma amostra maior do que a do estudo anterior. O polimorfismo Ser9Gli do *DRD3* parece afetar a função/estrutura da proteína. A serina na posição 9 da proteína é a

responsável por uma maior afinidade à dopamina (Jeanneteau et al., 2006). Esse polimorfismo não parece afetar a dose de piribedil, outro agonista dopaminérgico (Xu et al., 2017).

## CAPÍTULO II

### ***Justificativa e objetivos***

A primeira descrição da DP foi feita há dois séculos, mas a sua conceptualização continua evoluindo através dos anos. A DP é uma doença de alta prevalência, sem cura, com significativos prejuízos motores e não-motores para o paciente. Sua etiologia é complexa, e provavelmente resulta de interações do perfil genético do indivíduo e do ambiente. O estabelecimento do efeito das relações ambientais e genéticas tem se mostrado muito complicado para a maioria das doenças, e a DP não é exceção. Embora muito se discuta a interação de fatores genéticos e ambientais na etiologia da DP, poucos estudos investigaram essas interações até o presente.

Estudos de varredura genômica indicaram uma nova gama de possibilidades promissoras para estudos de suscetibilidade à DP. Esses estudos evidenciaram que os “genes mendelianos” parecem também estar envolvidos na etiologia da DP esporádica revelando um contínuo na causa da DP e não um quadro dicotômico entre os casos determinados por um único gene e aqueles dependentes de múltiplos fatores para se manifestar. Além disso, novos genes ganharam destaque com essa abordagem.

É importante determinar a contribuição conjunta de variações nesses genes na suscetibilidade a DP. O estudo de variantes genéticas ligadas a risco ou proteção à DP pode ser muito útil na determinação de possíveis biomarcadores para a doença. Dessa forma, o diagnóstico anterior aos sintomas podem melhorar qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes com a doença e possivelmente levar a regressão da neurodegeneração. Além disso, a descoberta de fatores genéticos ou ambientais em associação/interação com a DP possibilita melhor entendimento da patogênese doença.

Outra perspectiva é a de entender o papel de variantes genéticas na dose da principal medicação da DP. A terapia dopaminérgica, baseada principalmente no uso de levodopa, gera varias complicações, efeitos adversos, que prejudicam muito a qualidade de vida dos pacientes. Determinar a terapia ideal individual é um importante passo para gerar menos efeitos tóxicos e aumentar a eficiência dos medicamentos, gerando menos efeitos

adversos. Essa análise possibilitaria um melhor prognóstico aos pacientes e menores custos para os sistemas de saúde.

Os resultados publicados até o presente não foram suficientes para determinar a base genética da DP nem esclarecer a variabilidade na dose de levodopa tomada pelos pacientes. Portanto os objetivos dessa tese visaram melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na suscetibilidade à DP e no tratamento com levodopa.

#### Objetivos específicos

- Investigar se há interação de genes candidatos e fatores ambientais determinando risco para a doença de Parkinson.
- Investigar o efeito conjunto de variantes genéticas identificadas em GWAS na suscetibilidade à DP.
- Avaliar efeitos de variantes genéticas na dose de levodopa tomada pelos pacientes com doença de Parkinson.

## **CAPÍTULO III**

### ***The additive effect of eight gene polymorphisms on Parkinson's disease susceptibility in a Brazilian cohort***

Manuscrito em preparação

## **CAPÍTULO VII**

### ***Influence of genetic, biological and pharmacological factors on levodopa dose in Parkinson's disease***

Pharmacogenomics, 2016,17(5):481-8. doi: 10.2217/pgs.15.183



## Influence of genetic, biological and pharmacological factors on levodopa dose in Parkinson's disease

**Aim:** Levodopa is first-line treatment of Parkinson's disease motor symptoms but, dose response is highly variable. Therefore, the aim of this study was to determine how much levodopa dose could be explained by biological, pharmacological and genetic factors. **Patients & methods:** A total of 224 Parkinson's disease patients were genotyped for *SV2C* and *SLC6A3* polymorphisms by allelic discrimination assays. Comedication, demographic and clinical data were also assessed. **Results:** All variables with  $p < 0.20$  were included in a multiple regression analysis for dose prediction. The final model explained 23% of dose variation ( $F = 11.54$ ;  $p < 0.000001$ ). **Conclusion:** Although a good prediction model was obtained, it still needs to be tested in an independent sample to be validated.

First draft submitted: 24 September 2015; Accepted for publication: 15 December 2015; Published online: 29 March 2016

**Keywords:** algorithm • dopamine transporter • levodopa • Parkinson's disease • pharmacogenetics • synaptic vesicle isoform C

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder caused by the interaction of multiple environmental and genetic factors [1]. PD pathology is characterized by a loss of dopamine-producing neurons in *substantia nigra pars compacta* [2]. Levodopa, a dopamine precursor that, since the late 1960s, is considered the 'gold standard' to treat PD. Levodopa ameliorates the primary motor dysfunction, but its continued use and disease progression are associated with motor fluctuations and levodopa-induced dyskinesia [3]. It is estimated that between 35 and 40% of treated patients will develop these adverse effects after 4–6 years [4]. Combination therapy of levodopa and other drugs such as entacapone and dopamine agonists have demonstrated to improve quality of life [5] and to reduce 'off' time [6] in PD patients, respectively. However, Cilia *et al.* [7] concluded that motor fluctuations and dyskinesias are not associated with the duration of levodopa therapy, but rather with longer

disease duration and higher levodopa daily dose.

Few studies have been conducted to assess the genetic influence on levodopa dose response, moreover most of them focused on catechol-*O*-methyltransferase (*COMT*) polymorphisms [8]. Studies of acute levodopa challenge showed an association between greater efficacy of motor symptoms treatment and dopa-decarboxylase (*DDC*) and the dopamine transporter (*SLC6A3*) gene polymorphisms [9,10]. The 9R allele in the 3' UTR VNTR at the *SLC6A3* gene was associated with lower levodopa equivalent doses in one investigation [11]. The dopamine transporter is a key regulator of the dopamine system, controlling extracellular dopamine levels in the striatum. This protein is a transmembrane transporter localized in presynaptic neurons and is responsible for dopamine uptake from the synaptic cleft.

The synaptic vesicle isoform C (*SV2C*) is a member of *SV2* transmembrane pro-

Vivian Altmann<sup>1</sup>, Artur F Schumacher-Schuh<sup>2</sup>, Mariana Rieck<sup>1</sup>, Sidia M Callegari-Jacques<sup>3</sup>, Carlos RM Rieder<sup>2</sup> & Mara H Hutz<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\*Author for correspondence:  
Tel.: +55 513 308 6720  
Fax: +55 513 308 7311  
[mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)

Future  
Medicine  
part of 

teins which are found on small clear vesicles containing neurotransmitters [12] and is highly expressed in *substantia nigra* and *striatum*, regions affected by PD [13,14]. Although Vesicular storage of dopamine is a crucial step in the dopaminergic pathway and could potentially be involved on levodopa dose, its relation with levodopa response was never assessed. *SV2C* gene selection was based on Hill-Burns *et al.* study [15]. The authors used a genome-wide approach, identifying this gene as one of highest top hit for Parkinson's disease risk in interaction with smoking.

Variability in levodopa dose response impacts clinical practice however its determinants are not fully established. Therefore, the aim of this study was to investigate a possible role for *SV2C* and *SLC6A3* gene polymorphisms in levodopa dose variability in order to implement an algorithm that uses clinical and genetic factors to guide levodopa dose prescriptions.

## Patients & methods

### Sample characteristics

This study included 224 patients recruited and evaluated at the Movement Disorder Clinics at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from 2006–2013. The inclusion criteria were PD diagnosis according to UK Brain Bank criteria [16]; to be in use of levodopa for at least 1 year; and to have had a favorable initial response to the drug. Patients with secondary parkinsonism or with atypical manifestations were excluded. Levodopa daily dose of each patient was defined based on the best motor response based on clinical judgment by one of us (CRM Rieder), a movement disorders specialist. Each participant underwent a clinical and demographical assessment described in detail elsewhere [11,17]. Briefly, clinical data collected for this study were age at onset of the symptoms, disease duration, first motor symptom noticed and dosage per day of antiparkinsonian drugs in use. One patient was excluded from multivariate analysis because his/her first symptom data record was not available. The hospital Ethics Committee approved the study, and all participants gave written informed consent.

### SNP selection & genotyping

DNA was isolated from peripheral blood samples by standard procedures. The *SV2C* rs30196 and rs10214163 polymorphisms were chosen because they were considered GWAS top hits [15]. These polymorphisms were genotyped with TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA), according to the manufacturer recommended protocol. The *SLC6A3* 3' UTR VNTR (rs2836371) polymorphism was genotyped as previously described [11].

## Statistical analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. Agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using a goodness of fit  $\chi^2$  test. Linkage disequilibrium was estimated using the Multiple Locus Haplotype Analysis (Mlocus 3.0) [18]. Because levodopa dose did not follow a normal distribution, univariate analyses between genotypes and levodopa daily dose were performed by Kruskal-Wallis. Comparisons of levodopa dose between gender and first motor symptom were assessed by Mann-Whitney U test. Correlations between continuous variables were evaluated with Spearman coefficient. For the multiple regression analyses levodopa dose was log-transformed because of the assumption of the test, which requires that the dependent variable has normal distribution, but untransformed means are shown in text and tables.

Confounders to be included in the multiple linear regression model were determined conceptually or with an association ( $p \leq 0.20$ ) with levodopa dose and genotypes. Confounders for these analyses were gender, first motor symptom, disease duration, entacapone dose and pramipexole dose. An algorithm was elaborated with variables that presented at least  $p < 0.05$  in the multiple linear regression model. Spearman correlation was used to compare the observed levodopa daily dose of patients and the predicted dose by the algorithm. Mean absolute difference of levodopa dose estimates was calculated by predicted dose minus observed dose. The observed levodopa daily dose was defined as the amount of levodopa that the patients was taking to control their symptoms, whereas the predicted dose was based on the expected dose that the patients would take based on the model developed in the present study.

All statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 statistical package and a significance level of 5% was set in all analyses with two-tailed tests.

## Results

The demographic and clinical characteristics of the investigated subjects are shown in Table 1. About 52% of the patients were males, and their mean age was  $66.8 \pm 10.7$ . Tremor was the most common first symptom noticed (71.7%). All patients were in levodopa usage for at least 1 year; some patients were using other antiparkinsonian drugs: pramipexole ( $n = 46$ ), bromocriptine ( $n = 2$ ), entacapone ( $n = 22$ ), tolcapone ( $n = 5$ ), selegiline ( $n = 3$ ) and amantadine ( $n = 41$ ). The average levodopa dose in the studied sample was  $715.4 \pm 297.5$  and ranged from 200 to 2000 mg/day.

Genotype frequencies for the two *SV2C* polymorphisms (rs10214163 and rs30196) are presented in Table 2. *SV2C* polymorphisms were not in linkage dis-

Table 1. Clinical and demographical characteristics of the study sample.

Variables	Mean $\pm$ standard deviation	Range
<b>Characteristics</b>		
Age	66.8 $\pm$ 10.7	37–94
Age at onset	58.0 $\pm$ 11.5	28–84
Disease duration	8.7 $\pm$ 5.0	2–30
<b>Medications (n)</b>		
Levodopa (224)	715.4 $\pm$ 297.5	200.0–2000.0
Pramipexole (46)	2.0 $\pm$ 1.1	0.25–4.0
Bromocriptine (2)	20.0 $\pm$ 7.0	15.0–25.0
Tolcapone (5)	262.5 $\pm$ 47.8	200.0–300.0
Entacapone (22)	495.4 $\pm$ 205.8	200.0–1000.0
Selegiline (3)	8.3 $\pm$ 2.9	5.0–10.0
Amantadine (41)	260.1 $\pm$ 87.5	25.0–400.0

Age, age at onset and disease duration are measured in years. Medications are measured by mg/day. Characteristics in table were calculated from total sample (n = 224), except for medications.

equilibrium ( $D' = 0.177$ ;  $p = 0.071$ ) as expected since they were mapped in two distinct haploblocks [18]. *SLC6A3* 3' VNTR (rs2836371) repeat alleles varied from 3 to 11. Genotypes 9R/9R 9R/10R and 10R/10R were the most frequent (Table 2). Other *SLC6A3* less frequent genotypes were grouped. Frequencies of *SV2C* and *SLC6A3* genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Univariate analyses showed that levodopa dose was associated with *SV2C* rs30196 genotypes ( $p = 0.024$ ) (Table 2). The presence of each C allele reduced the average dose in approximately 76 mg/day. *SV2C* rs10214163 and *SLC6A3* 3'VNTR were not associated with levodopa dose. At the univariate analysis *SLC6A3* VNTR was not associated with levodopa dose, but since in our previous study *SLC6A3* polymorphism was associated with levodopa dose in a multivariate analysis, controlling for other factors as gender, disease duration and tremor as first symptom [11], a pooled genetic variable was created including *SV2C* rs30196 genotypes and the presence of the *SLC6A3* 9R allele. Considering both genes the pooled variable was coded as 0 (no risk allele in both genes), 1 (one risk allele in either gene), 2 (two risk alleles) and 3 (three risk alleles). Levodopa dose varied from 820.1  $\pm$  352.9 mg/day in those without risk alleles to 630.2  $\pm$  297.5 mg/day ( $p = 0.075$ ) in those with three risk alleles (Table 2).

Biological and pharmacological factors influencing levodopa dose were assessed by univariate analysis. Males used a higher levodopa daily dose (779.4  $\pm$  308.9 mg/day) than females (646.6  $\pm$  269.6 mg/day;  $p = 0.001$ ). Patients with tremor as first symptom were on lower levodopa dose compared with those who presented rigid/bradykinesia

as first symptom ( $p = 0.004$ ). Positive correlations between levodopa dose and disease duration ( $r_s = 0.354$ ;  $p < 1 \times 10^{-7}$ ), entacapone dose ( $r_s = 0.455$ ;  $p = 0.033$ ) and pramipexole dose ( $r_s = 0.397$ ;  $p = 0.006$ ) were found. Negative correlation between age at onset and levodopa dose was observed ( $r_s = -0.247$ ;  $p = 0.001$ ). Tolcapone, selegiline, bromocriptine and amantadine dose and age were not correlated with levodopa dose.

The variables selected by univariate analyses ( $p \leq 0.20$ ) were: gender ( $p = 0.001$ ), PD first motor symptom ( $p = 0.004$ ), disease duration ( $p < 1 \times 10^{-7}$ ), entacapone dose ( $p = 0.033$ ), pramipexole dose ( $p = 0.006$ ) and the pooled genetic variable ( $p = 0.075$ ). Age at onset was not included in the model because it is highly correlated with disease duration. The factors that were statistically significant ( $p < 0.05$ ) in the multiple linear regression are presented in Table 3. The model explained 23% of levodopa dose variation ( $F = 11.54$ ;  $p < 0.000001$ ; adjusted  $R^2 = 0.23$ ). The number of risk alleles varied from 0 (no risk allele) to 3 (three risk alleles) ( $p = 0.005$ ;  $B = -0.04$ ; 95% CI: -0.07 to -0.01). Mean levodopa doses varied from 670.0, 632.1 and 572.6 mg/day in patients with 1, 2 or 3 risk alleles, respectively. Therefore *SLC6A3* 9R allele or *SV2C* rs30196 C allele influence were considered additive.

The correlation between the predicted dose and the observed dose in patients was statistically significant ( $p < 0.0001$ ; 95% CI: 0.4–0.6) with a Spearman's correlation coefficient  $r_s = 0.51$  (Figure 1). The levodopa dose estimates mean absolute difference was 201.1 mg/day.

In the present study, we decided to present levodopa dose results since our objective was to study factors asso-

**Table 2. Frequencies of SV2C and SLC6A3 genotypes and their relation with levodopa dose in patients.**

Polymorphisms		Frequencies (n)	Levodopa daily dose (mg)	p-value
SV2C rs30196	AA	25.5 (57)	791.2 ± 333.4	0.024
	AC	46.4 (104)	719.9 ± 292.0	
	CC	28.1 (63)	639.3 ± 255.1	
SV2C rs10214163	TT	68.3 (153)	696.4 ± 274.5	0.359
	CT	27.7 (62)	736.9 ± 324.1	
	CC	4.0 (9)	890.2 ± 434.4	
SLC6A3 rs2836371	10R/10R	50.0 (112)	728.2 ± 298.9	0.547†
	9R/10R	38.8 (87)	695.5 ± 296.1	
	9R/9R	5.4 (12)	654.1 ± 322.6	
	Other	5.8 (13)	794.2 ± 281.7	
Pooled genetic variable (SLC6A3/SV2C)	0	14.7 (33)	820.1 ± 352.8	0.075
	1	35.3 (79)	733.1 ± 302.6	
	2	37.1 (83)	686.7 ± 249.5	
	3	12.9(29)	630.2 ± 318.5	

Difference in levodopa daily dose between genotypes calculated by Kruskal–Wallis. Levodopa daily doses are expressed in mean ± standard deviation.  
 †The sample had 45.1% of 9R allele presence and 54.9% of 9R allele absence. Difference of mean levodopa daily dose between subjects with or without of 9R allele was calculated by Mann–Whitney U test (694.2 ± 298.2 mg/day versus 732.8 ± 296.2 mg/day; p = 0.201).

ciated with levodopa dose prescription, this approach seems to be more relevant to clinical practice; however, similar results were also obtained when equivalent doses were tested (data not shown but available upon request).

**Discussion**

In this study, the influence of common SNPs in SV2C and SLC6A3 genes and their influence on levodopa dose variation were investigated. Several environmental factors that could potentially influence levodopa dose were also investigated. Based on univariate findings an algorithm was created by multiple regression analysis to predict dose variation. Overall the model explained 23% of dose variability.

In this study, a SV2C variant was suggested to influence levodopa dose. SV2C rs30196 C allele was associated with lower doses of this drug in PD patients. SV2C gene variation appears to modulate the protective effect of nicotine on PD risk [15]. The strongest protective effect was observed in homozygous individuals for the rs30196 allele C [15]. SV2C expression is inversely linked to tyrosine-hydroxylase (TH) expression, SV2C knockout mice showed a larger production of TH mRNA [19]. As TH is the rate-limiting enzyme in the production of dopamine, SV2C may play a critical role in dopamine activities [19]. However the exact function of SV2 proteins is still not clear. Feany *et al.* [20], con-

sidered that it might be a transporter of neurotransmitters into vesicles based on its structure. But, several evidences suggested that this protein might be involved in calcium-dependent exocytosis regulation [21–23]. Studies in SV2 knockout mice showed calcium accumulation and abnormal increase of neurotransmitter release [21]. Taken together these findings suggest that endogenous levodopa levels might be modulated by SV2C variants, therefore it is possible to hypothesize that rs30196 C allele carriers may need less levodopa than their counterparts with the AA genotype. Notice however that functional studies are clearly needed to explain the role of SV2C gene variants in levodopa treatment response.

The SV2C genotypes contribution for levodopa dose variation was evaluated pooled with SLC6A3 3' VNTR polymorphism because a previous study in the same population reported that the presence of the SLC6A3 9R allele was associated with lower levodopa equivalent doses in a multivariate model [11]. Few genes were previously associated with levodopa dose [8]. DRD2 variants were not included because it was not associated with levodopa dose in our sample [17]. COMT, MAOB, TH, ADDC has already been linked to levodopa dose in some studies but not in all [8], and have not been explored in this sample.

Several *in vitro* studies reported that cells containing the 10R allele had higher expression of SLC6A3 pro-

Table 3. Multiple linear regression analyses of predicting factors in levodopa dose variability.			
Covariates	Regression coefficient (B)	95% CI for B	p-value
Constant	2.788	2.71–2.86	<0.0001
Gender (male)	0.071	0.03–0.11	0.002
Tremor as first motor symptom	-0.076	-0.11 to -0.03	0.004
Sum of alleles (SLC6A3/SV2C)	-0.038	-0.07 to -0.01	0.003
Entacapone dose (mg/day)	0.001	0.0005–0.0030	0.008
Pramipexol dose (mg/day)	0.026	0.03–0.05	0.030
Disease duration (years)	0.010	0.05–0.01	<0.0001
R <sup>2</sup>	0.252		
Adjusted R <sup>2</sup>	0.230		

p < 0.000001.  
F = 11.54.  
SLC6A3: Dopamine transporter; SV2C: Synaptic vesicle isoform C.

tein compared with 9R or other alleles [24,25]. In contrast, the functionality of the VNTR alleles was inconclusive based on SPECT studies meta-analysis [26], but two PET scan studies with young healthy individuals reported that *SLC6A3* 9R carriers presented higher protein availability [27,28]. Shingai *et al.* [29] described that *SLC6A3* levels decline 3.4% per-decade in *substantia nigra*, reaching 7.6 and 7.7% per-decade in caudate and putamen, respectively. This age related decrease seems to be higher in 9R/9R homozygotes [28]. Therefore, we can hypothesize that carriers of 9R may present lower levels of *SLC6A3*, and consequently PD patients with this genotype would reuptake less levodopa from the synaptic cleft, and thus, would need less levodopa.

Among the demographic and clinical variables included in the model, gender was associated with levodopa dose as in other studies [30,31], but it remains unclear if this association was due to patients weight or if it is linked to gender differences. Tremor as first motor symptom was associated to lower levodopa doses. In a longitudinal study, tremor-dominant subtype was associated with slower rate of disease progression and a better improvement with levodopa drug compared with akinetic/rigid subtype [32]. We have also shown that co-medication is an important issue on levodopa dosing. Entacapone and pramipexole are important to determine levodopa dose. These associations could represent those patients in need for a variety of agents that probably presents higher dopaminergic demand. The use of MAOB and COMT inhibitors that were not associated with levodopa dose probably did not presented significant associations due to the low number of patients in use of them (three in use of MAOB inhibitors and five in use of tolcapone, Table 1). Disease duration was also associated with levodopa dose variation in this model. It

seems that the longer the disease progresses, higher doses are needed by patients.

The correlation between observed levodopa dose and that predicted by the algorithm was good, considering that the model explained only part of dose variation. The mean absolute difference was 201.1 mg/day and could be interpreted as small, once the standard deviation from levodopa mean dose in the population was higher (297.5 mg/day).

This work should be interpreted in the context of some limitations. First, information about weight, height, and diet from patients were not available. Weight is an important factor inversely correlated with levodopa plasma concentrations [33,34]. Rich protein diet is reported to have a relation with lower levodopa intake because levodopa competes with large neutral amino acids for uptake [35]. But, all patients were from the same outpatient clinic and as routine they were oriented to taken levodopa at least 1 h away from meals. Second, dyskinesia that might be related to levodopa dose was not included in the model, because our pri-

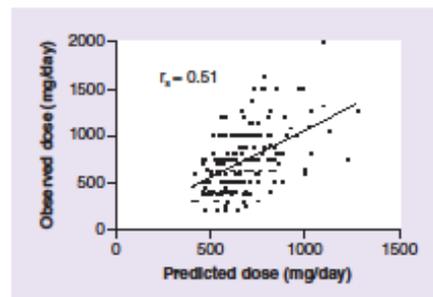


Figure 1. Relationship between the predicted dose and observed dose in the investigated patients.

primary goal was levodopa dose, moreover *SV2C* and *SLC6A3* polymorphisms were not associated with the occurrence of dyskinesia. Our study proposed a regression model that explained 23% of the levodopa dose variation only. Taking into account that levodopa dose variability is a multifactorial feature, there are many other factors and genes that might have an effect. The present results could be considered as a first attempt to understand levodopa dose variability. Nevertheless, more studies are needed with more genes, clinical, demographic and pharmacological variables to obtain an algorithm that could explain at least 80% of the variability to be useful in clinical practice.

### Conclusion

Our findings reveal the influence of *SV2C* and *SLC6A3* genetic variability on levodopa dose in PD patients. The model proposed predicted 23% of levodopa dose variability considering besides genes, comedication and clinical factors. This work suggests the first pharmacogenetic algorithm for levodopa dose prediction. However, predicting the optimal dose and response of a drug in a patient is still a target distant from application in routine clinical practice. There may be clinical, biological and genetic factors that contribute to the pharmacokinetic and pharmacodynamic variability of levodopa dose within and between individuals remaining to be elucidated. In Parkinson's disease, levodopa-induced adverse effects are very disabling and of great importance to be prevented. The present results could be considered as a first attempt to understand the factors that influence levodopa dose, more studies with

larger samples in independent cohorts are warranted to validate the present results and increase the proportion of the variance that remained unexplained by our model.

### Future perspective

Although a good prediction model was obtained, it still needs to be tested in an independent sample to be validated for possible clinical use. Moreover new factors should be investigated to improve the variability explained by the algorithm proposed. Prospective validation of algorithms to evaluate the clinical efficacy and safety is also highly warranted before it could be introduced in clinical use.

### Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

#### Executive summary

##### Background

- Variability in levodopa dose response in Parkinson's disease impacts clinical practice however its determinants are not fully established.
- Polymorphisms in genes related to dopamine transport as *SV2C* and *SLC6A3* might have a role on levodopa dose variability.

##### Patients & methods

- A total of 224 Parkinson's disease patients with a mean age of 66.8 years were enrolled. Clinical and demographic data from all patients were also assessed.
- Patients were genotyped for rs30196 and rs10214163 polymorphisms at *SV2C* gene and rs2836371 polymorphism at *SLC6A3* gene.
- The association between genetic, clinical and demographic data with levodopa dose was assessed by multiple linear regression.

##### Results

- The levodopa dose for best motor effect was determined clinically to be  $715.4 \pm 297.5$  mg/day.
- At the univariate analyses a pooled genetic variable including *SV2C* and *SLC6A3* genotypes was created.
- The model for levodopa dose prediction which included the pooled genetic variable, explained 23% of dose variation ( $F = 11.54$ ;  $p < 0.000001$ ).
- The correlation between the predicted and observed dose was statistically significant ( $r_1 = 0.51$ ;  $p < 0.0001$ ).

##### Conclusion

- Although a good prediction model was obtained, it still needs to be tested in an independent sample to be validated for possible clinical use.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

\* of interest; \*\* of considerable interest

- Lees AJ, Hardy J, Revez T. Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055–2066 (2009).
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909 (2003).
- Olanow CW. Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease – future directions. *Mov. Disord.* 23(Suppl. 3), S613–S622 (2008).
- Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311, 1670–1683 (2014).
- Review of all Parkinson's disease medication, their benefits and side effects.
- Olanow CW, Kieburtz K, Stern M *et al.* Double-blind, placebo-controlled study of entacapone in levodopa-treated patients with stable Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 61, 1563–1568 (2004).
- Mizuno Y, Abe T, Hasegawa K *et al.* Ropinirole is effective on motor function when used as an adjunct to levodopa in Parkinson's disease: S'TRONG study. *Mov. Disord.* 22, 1860–1865 (2007).
- Cilia R, Akpalu A, Sarfo FS *et al.* The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain* 137, 2731–2742 (2014).
- Schumacher-Schuh AF, Rieder CR, Hutz MH. Parkinson's disease pharmacogenomics: new findings and perspectives. *Pharmacogenomics* 15, 1253–1271 (2014).
- Devos D, Lejeune S, Cormier-Dequaire F *et al.* Dopamine decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to L-dopa in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 170–175 (2014).
- Moreau C, Meguig S, Corvol JC *et al.* Polymorphism of the dopamine transporter type 1 gene modifies the treatment response in Parkinson's disease. *Brain* 138, 1271–1283 (2015).
- Schumacher-Schuh AF, Francisoni C, Altmann V *et al.* Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1251–1258 (2013).
- First study to find an influence of *SLC6A3* on levodopa equivalent dose.
- Tao-Cheng JH. Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate. *Neuroscience* 150, 575–584 (2007).
- Dardou D, Dassez D, Cuvelier L, Deprez T, De Ryck M, Schiffmann SN. Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. *Brain Res.* 1367, 130–145 (2011).
- Janz R, Strohof TC. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94, 1279–1290 (1999).
- Identification of SV2C as a novel protein and observational work on its localization in *substantia nigra* and *serotinum* regions.
- Hill-Burns EM, Singh N, Ganguly P *et al.* A genetic basis for the variable effect of smoking/nicotine on Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J.* 13, 530–537 (2013).
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184 (1992).
- Rieck M, Schumacher-Schuh AF, Altmann V *et al.* DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics* 13, 1701–1710 (2012).
- Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 799–810 (1995).
- Dardou D, Monlezun S, Foerch P *et al.* A role for SV2c in basal ganglia functions. *Brain Res.* 1507, 61–73 (2013).
- Feany MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* 70, 861–867 (1992).
- Janz R, Goda Y, Geppert M, Miesler M, Strohof TC. SV2A and SV2B function as redundant Ca<sup>2+</sup> regulators in neurotransmitter release. *Neuron* 24, 1003–1016 (1999).
- Chang WP, Strohof TC. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis. *J. Neurosci.* 29, 883–897 (2009).
- Venkatesan K, Alix P, Marquet A *et al.* Altered balance between excitatory and inhibitory inputs onto CA1 pyramidal neurons from SV2A-deficient but not SV2B-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 90, 2317–2327 (2012).
- Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (*DAT1*) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J.* 1, 152–156 (2001).
- Fuke S, Sasagawa N, Ishiura S. Identification and characterization of the *Hes1/Hey1* as a candidate trans-acting factor on gene expression through the 3' non-coding polymorphic region of the human dopamine transporter (*DAT1*) gene. *J. Biochem.* 137, 205–216 (2005).
- Faraone SV, Spencer TJ, Madras BK, Zhang-James Y, Biederman J. Functional effects of dopamine transporter gene genotypes on *in vivo* dopamine transporter functioning: a meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 19, 880–889 (2014).
- Spencer TJ, Biederman J, Faraone SV *et al.* Functional genomics of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) risk alleles on dopamine transporter binding in ADHD and healthy control subjects. *Biol. Psychiatry* 74, 84–89 (2013).
- Shumay E, Chen J, Fowler JS, Volkow ND. Genotype and ancestry modulate brain's DAT availability in healthy humans. *PLoS ONE* 6, e22754 (2011).
- Shingai Y, Tateno A, Arakawa R *et al.* Age-related decline in dopamine transporter in human brain using PET with a new radioligand [<sup>18</sup>F]FE-PE21. *Ann. Nucl. Med.* 28, 220–226 (2014).
- Lyons KE, Hubble JP, Tröster AI, Pahwa R, Koller WC. Gender differences in Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* 21, 118–121 (1998).

- 31 Nyholm D, Karlsson E, Lundberg M, Askmark H. Large differences in levodopa dose requirement in Parkinson's disease: men use higher doses than women. *Eur. J. Neurol.* 17, 260–266 (2010).
- 32 Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A. Course in Parkinson disease subtypes: A 39 year clinicopathologic study. *Neurology* 73, 206–212 (2009).
- 33 Arabia G, Zappia M, Bosco D *et al.* Body weight, levodopa pharmacokinetics and dyskinesia in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* 23(Suppl. 2), S53–S54 (2002).
- 34 Zappia M, Crescibene L, Arabia G *et al.* Body weight influences pharmacokinetics of levodopa in Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* 25, 79–82 (2002).
- 35 Cereda E, Barichella M, Pezzoli G. Controlled-protein dietary regimens for Parkinson's disease. *Nutr. Neurosci.* 13, 29–32 (2010).

## **CAPÍTULO VIII**

### ***Discussão***

Discussões referentes aos resultados específicos obtidos nesta tese foram realizadas nos capítulos III a VII. Neste capítulo, discutiremos os aspectos mais gerais relacionados aos estudos de suscetibilidade, interação gene-ambiente e farmacogenética da DP.

Vários estudos epidemiológicos identificaram fatores ambientais de risco e de proteção para DP. No entanto poucas investigações sobre as interações desses fatores com genes foram realizadas. Os estudos de interação gene-ambiente já realizados mostraram diversos genes como possíveis moduladores do efeito do ambiente na DP. O presente trabalho evidenciou mais três genes com papel importante nas interações com o ambiente para a susceptibilidade a DP: ABCB1 x fumo, SV2C x exposição a tóxicos e NOS1 x cafeína, ainda não descritos. Algumas interações gene-ambiente já tinham sido descritas na literatura tais como MAOB x fumo (Checkoway et al., 1998), CYP1A2 e CYP1A1 x cafeína (Amin et al., 2012), ABCB1 x exposição à pesticidas (Dutheil et al., 2010) e PON1 x exposição a pesticidas organofosfatos (Lee et al., 2013). Assim como em outras pesquisas (Hernán et al., 2002; Tan et al., 2003; Fong et al., 2005; Dick et al., 2007; Gu et al., 2010; De Palma et al., 2010; Hill-Burns et al., 2011; Kiyohara et al., 2013), as associações antes mencionadas não foram encontradas neste trabalho. Os resultados dos estudos gene-ambiente na DP até o momento ainda são controversos, impossibilitando conclusões definitivas sobre o efeito dos genes e suas interações com variáveis ambientais já identificadas com a suscetibilidade a DP. Várias limitações desses trabalhos poderiam ser apontadas para a inexistência de resultados conclusivos tais como amostras pequenas, com diferentes composições étnicas que, impossibilitam uma comparação direta entre elas ou um agrupamento dos dados para aumentar o poder estatístico. Uma solução para esse tipo de problema seria aumentar o tamanho amostral dos estudos, incluindo uma amostra independente para replicação. A formação de parcerias entre grupos é o mais indicado para alcançar o número amostral adequado, juntamente com uma padronização dos questionários clínicos e ambientais aplicados aos pacientes e controles. Além disso, a

maioria dos estudos se baseia na análise de genes-candidato como as realizadas no presente trabalho. Uma abordagem sem hipótese *a priori* como o GWAIS (genome-wide association and interaction study) poderia revelar novos genes ainda não evidenciados em estudos com genes únicos.

Até o presente, somente dois genes foram evidenciados pela abordagem de GWAIS na DP. O *SV2C*, investigado nesta tese, e o *GRIN2A*. O *GRIN2A* foi associado à DP em interação com o consumo de cafeína (Hamza et al., 2011). O *GRIN2A* é um receptor glutamatérgico envolvido na neurotransmissão excitatória e dessa forma poderia estar envolvido na neurodegeneração. Três trabalhos tentaram replicar essa associação, destes, apenas um (Yamada-Fowler et al., 2014) confirmou esse resultado enquanto que essa associação não foi observada em outros dois estudos (Ahmed et al., 2014; Kim et al., 2018). Existem importantes limitações que poderiam explicar essas discrepâncias nesses estudos tais como: amostras menores que o estudo de GWAIS, diferentes exposições à cafeína entre as populações, falta de ajuste de confundidores e de pareamento das amostras. Visto que os resultados obtidos até o presente sobre o *GRIN2A* trazem muitas limitações e que esse gene possui plausibilidade biológica de associação a DP, mais estudos ainda são necessários.

Os resultados obtidos no presente trabalho bem como os descritos na literatura mostraram que o gene *SV2C* já foi associado com a dose de levodopa (capítulo VII), a exposição à tóxicos (capítulo IV) e ao fumo na DP (Hill-Burns et al., 2013). Evidências experimentais revelaram que camundongos knock-out para *SV2C* apresentavam menores concentrações de dopamina no estriado quando comparados aos camundongos controles (Dunn et al., 2017). Visto que o *SV2C* parece auxiliar no tráfego vesicular, participando na captação e englobamento de neurotransmissores, um sequestro ineficaz de dopamina poderia levar ao estresse celular, aumentando a vulnerabilidade do neurônio a tóxicos, e culminando na morte celular. No entanto, até o presente, não foram realizados experimentos que comprovem variação funcional entre os alelos de *SV2C*. Os estudos de associação

mostraram que o risco para a DP poderia estar sendo modulado por alelos específicos juntamente com substâncias protetoras ou de risco como fumo e a exposição a tóxicos. Já a variação de dose de levodopa tomada pelos pacientes observada entre genótipos do *SV2C* poderia ser decorrente do número de neurônios que ainda estão produzindo a dopamina na *substantia nigra*. Chama a atenção que o mesmo alelo que está associado a menores doses de levodopa, também está associado à menor risco de DP em fumantes (Hill-Burns et al., 2013). Enquanto que o alelo que foi associado a maiores doses de levodopa (capítulo VII), parece estar associado a maior risco de DP quando exposto a tóxicos (capítulo IV).

Uma grande preocupação dos estudos de associação e de interação é a estratificação populacional. Em um país como o Brasil, onde a população é altamente miscigenada, a preocupação em corrigir efeitos da estratificação é ainda maior (Pena et al., 2011). Diferenças de ancestralidade entre amostras (ex: caso e controle) podem levar a resultados espúrios ou mascarar verdadeiras associações. Uma forma de reconhecer e corrigir a estratificação populacional nos estudos com pequenas amostras é utilizando marcadores informativos de ancestralidade (AIMs). Em estudos com grande número amostral e muitos marcadores como nos GWAS, a estratificação pode ser corrigida também com o uso de análise de componentes principais (Huckins et al., 2014).

Em uma amostra como a deste trabalho, o uso de AIMs seria o mais adequado e resultaria em correções mais precisas para diferenças de ancestralidade entre casos e controles. Devido aos altos custos para a aplicação desses marcadores essa abordagem não pôde ser realizada. No entanto, todas as análises incluíram o fenótipo “cor da pele”, definido por auto-declaração como co-variável, além disso, não foram verificadas diferenças de frequências genótípicas entre pessoas auto-declaradas brancas ou não-brancas. Foram feitas também análises secundárias apenas com indivíduos brancos, obtendo-se essencialmente o mesmo resultado, exceto para a associação entre *ABCB1* e fumo (capítulo V).

A instigante observação de que o cigarro e o café são importantes fatores de neuroproteção os coloca em evidência para estudos de novos medicamentos para atuar na terapia e prevenção da DP. Apesar de se acreditar que esses fatores atuem por vias diferentes, as duas substâncias são estimulantes e atuam no sistema dopaminérgico. Até o momento não se sabe exatamente qual das substâncias presentes no café, no chimarrão e no tabaco são determinantes para essa neuroproteção. Compostos fenólicos encontrados nessas três substâncias, como o ácido clorogênico e quínico poderiam ser bons candidatos para o início desta investigação (Tso et al., 1970; Filip et al., 2001; Farah and Donangelo, 2006).

Os efeitos dos compostos fenólicos, presentes também em outros alimentos, são amplos, e envolvem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiplaquetários e antialergênicos (Miean & Mohamed, 2001). Descobrir o composto exato ou o conjunto deles que promove a neuroproteção seria importante para definir como o café, o chimarrão e o tabaco exercem esse efeito. Processos químicos que segregam compostos do cigarro e do café poderiam permitir definir quais desses compostos participam mais ativamente da neuroproteção das células da *substantia nigra* em modelos animais. Uma vez conhecendo a(s) substância(s) e seu modo de ação seria possível investigar mais especificamente o seu papel na neuroproteção bem como quais genes e variantes de rotas metabólicas específicas estariam envolvidos. Essas abordagens permitiriam de uma maneira mais eficaz e precisa, servir de base para o desenvolvimento de fármacos para neuroproteção.

A farmacogenética da levodopa evidenciou a possibilidade de tratamento personalizado para os pacientes com DP, sem a necessidade de introduzir novos medicamentos em sua terapia. Um dos objetivos desses estudos seria otimizar as doses para reduzir os efeitos adversos da levodopa e aumentar a qualidade de vida dos pacientes. Esses estudos até o presente ainda não trouxeram resultados imediatamente aplicáveis nas decisões clínicas (Schumacher-Schuh et al., 2014; Hutz & Rieder, 2018).

A administração crônica da levodopa embora seja eficaz para reduzir os sintomas da DP, induz a uma série de fenômenos indesejados como discinesias, flutuações motoras e alucinações. Na procura por diminuir esses efeitos adversos, novos medicamentos e biocompostos estão sendo testados pela indústria farmacêutica.

A farmacogenética se baseia na variabilidade genética dos indivíduos. Porém, a resposta à medicação não depende somente da variabilidade genética, é uma característica multifatorial, envolvendo dados clínicos, farmacológicos, biológicos e de hábitos dos pacientes também. Dentre as variáveis biológicas, vem ganhando destaque nas pesquisas com DP o estudo da microbiota do sistema gastrointestinal.

A microbiota afeta a biologia do hospedeiro pela participação na digestão de alimentos, produção de vitaminas, metabolização de drogas e degradação de toxinas. Além disso, o conjunto dos genomas da microbiota, o microbioma, afeta o hospedeiro pela atividade de seus genes e pela manipulação da expressão dos genes humanos (Payami, 2017). Existem duas vias de interação entre o microbioma e as medicações. Uma em que o microbioma facilita o metabolismo dos medicamentos prescritos, e a outra em que a mediação pode afetar a composição do microbioma dos indivíduos.

O uso de inibidores da COMT e de anticolinérgicos já foi associado a diferenças quantitativas em gêneros de bactérias nos pacientes com DP em dois estudos (Scheperjans et al., 2015; Hill-Burns et al., 2017).

O microbioma pode afetar a eficácia e toxicidade das medicações ou causar efeitos adversos nos pacientes, sendo uma variável importante nos futuros estudos de farmacogenética. Além disso, determinar a melhor composição do microbioma para cada fármaco ou conjunto delas pode ajudar a desenvolver um tratamento de reposição da microbiota.

Como amplamente discutido os resultados aqui apresentados ainda não são conclusivos, na perspectiva de continuar a pesquisa desenvolvida nessa tese, seria necessário primeiramente aumentar a amostra, para que se possam obter dados mais robustos principalmente nos estudos de interação gene-ambiente.

A avaliação de mais polimorfismos em cada gene também poderia contribuir para um panorama mais claro dos significados das associações encontradas. Por exemplo, a interação da cafeína e *NOS1* (capítulo VI) poderia ser melhor avaliada se os dois polimorfismos da *NOS1* (rs1047735 e rs2682826), localizados em éxons fossem também genotipados. Como discutido nesse capítulo, a maioria dos estudos não mostraram esses polimorfismos como fator de suscetibilidade para a DP. Porém o papel dessas variantes modulado pela quantidade de cafeína ainda não foi investigado.

No capítulo III abordou-se o estudo de um conjunto de genes derivados de GWAS na suscetibilidade a DP. Foi visto que com a contribuição de oito polimorfismos, chegou-se próximo do poder de um teste de triagem para a DP. O modelo obtido no presente trabalho (AUC = 0,744) não difere em poder discriminatório do modelo observado por Nalls et al. (2016), com trinta variantes genéticas (AUC = 0,748). Dessa forma, a questão que permanece em aberto é se o efeito seria maior apenas incluindo um número maior de polimorfismos. O ideal seria buscar novas variantes para que se possa desenvolver um teste de diagnóstico considerando também as variáveis clínicas e demográficas. Apesar de não estar associado em estudos de GWAS, o polimorfismo L55M da *PON1* poderia também ser inserido neste modelo, uma vez que foi associado à DP na nossa população (capítulo IV).

A fim de explorar o efeito dos genótipos do *SV2C* na dose de levodopa, pretendemos realizar o desafio oral de levodopa. O desafio consiste em grupos dos genótipos de extremos de dose do *SV2C* que seriam avaliados em relação à resposta motora após tomar uma dose da levodopa. A hipótese é de que pacientes que tem genótipo associado a

menores doses de levodopa (CC), possuiria melhor resposta à medicação e por maior tempo, comparado ao genótipo AA.

A DP possui uma alta prevalência e incidência entre os idosos (Pringsheim et al., 2014; Hirsch et al., 2016). Muitos pacientes recebem o diagnóstico errado ou demoram muito para serem diagnosticados com DP. O diagnóstico precoce e o tratamento personalizado poderia diminuir os efeitos adversos e aumentar a qualidade de vida dos pacientes.

Este trabalho enriqueceu o conhecimento da variabilidade da DP tanto em aspectos de suscetibilidade quanto farmacogenética. Os dados obtidos serão importantes na continuação de pesquisas genéticas em relação à doença. É importante salientar que abordagens que cruzam os dados da genômica à transcriptômica, proteômica, metagenômica e metabolômica irão fornecer um melhor panorama da etiologia e patofisiologia da DP para auxiliar no tratamento e diagnóstico da DP.

## **CAPÍTULO IX**

### ***Bibliografía***

- Abreu G M, Valença DCT, Campos M, da Silva CP, Pereira JS, Leite MA, Rosso AL, Nicaretta DH, Vasconcellos LFR, da Silva DJ, et al. (2016) Autosomal dominant Parkinson's disease: Incidence of mutations in LRRK2, SNCA, VPS35 and GBA genes in Brazil. *Neurosci Lett* 635: 67–70.
- Ahmed I, Lee PC, Lill CM, Nielsen S, Artaud F, Gallagher LG, Lorient MA, Mulot C, Nacfer M, Liu T, et al. (2014) Lack of Replication of the GRIN2A-by-Coffee Interaction in Parkinson Disease. *PLoS Genet* 10: e1004788.
- Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Orbe M, Ruiz D, Ross B, Verbitsky M, Kisselev S, et al. (2012) Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: The CORE-PD study. *Neurology* 78: 1434–1440.
- Alves G, Kurz M, Lie SA and Larsen JP (2004) Cigarette smoking in Parkinson's disease: Influence on disease progression. *Mov Disord* 19: 1087–1092.
- Alzheimer's Association (2014) 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 10: e47–92.
- Amin ML (2013) P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7: 27–34.
- Amin N, Byrne E, Johnson J, Chenevix-Trench G, Walter S, Nolte IM, Vink JM, Rawal R, Mangino M, Teumer A, et al. (2012) Genome-wide association analysis of coffee drinking suggests association with CYP1A1/CYP1A2 and NRCAM. *Mol Psychiatry* 17: 1116–1129.
- Androutsopoulos VP, Kanavouras K and Tsatsakis AM (2011) Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: Implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 256: 418–424.
- Ascherio A and Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk

factors and prevention. *Lancet Neurol* 15: 1257–1272.

Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, and Cardoso F (2006) Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). *Mov Disord* 21: 800–808.

Becker ML, Visser LE, van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG and Stricker BHC (2011) OCT1 polymorphism is associated with response and survival time in anti-Parkinsonian drug users. *Neurogenetics* 12: 79–82.

Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E and Ioannidis JPA (2015) Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord* 23: 1–9.

Bialecka M, Drozdziak M, Klodowska-Duda G, Honczarenko K, Gawronska-Szklarz B, Opala G and Stankiewicz J (2004) The effect of monoamine oxidase B (MAOB) and catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms on levodopa therapy in patients with sporadic Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 110: 260–266.

Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK and Drozdziak M (2008) The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenet Genomics* 18: 815–821.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R and Verna JM (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65: 135–172.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Steur ENH and Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197–211.

Brás J, Guerreiro R and Hardy J (2015) SnapShot: Genetics of Parkinson's Disease. *Cell*

160: 570–570.e1.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP and Kadlubar FF (1989) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7696–7700.

Checkoway H, Franklin GM, Costa-Mallen P, Smith-Weller T, Dilley J, Swanson PD and Costa LG (1998) A genetic polymorphism of MAO-B modifies the association of cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 50: 1458–1461.

Cheshire P, Bertram K, Ling H, O'Sullivan SS, Halliday G, McLean C, Bras J, Foltynie T, Storey E and Williams DR (2013) Influence of Single Nucleotide Polymorphisms in COMT, MAO-A and BDNF Genes on Dyskinesias and Levodopa Use in Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis* 13: 24–28.

Christou M, Savas U, Schroeder S, Shen X, Thompson T, Gould MN and Jefcoate CR (1995) Cytochromes CYP1A1 and CYP1B1 in the rat mammary gland: cell-specific expression and regulation by polycyclic aromatic hydrocarbons and hormones. *Mol Cell Endocrinol* 115: 41–50.

Connolly BS and Lang AE (2014) Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. *JAMA* 311: 1670.

Contin M, Martinelli P, Mochi M, Riva R, Albani F and Baruzzi A (2005) Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 20: 734–739.

Cornejo-Olivas M, Torres L, Velit-Salazar MR, Inca-Martinez M, Mazzetti P, Cosentino C, Micheli F, Perandones C, Dieguez E, Raggio V, et al. (2017) Variable frequency of LRRK2 variants in the Latin American research consortium on the genetics of

Parkinson's disease (LARGE-PD), a case of ancestry. *npj Park Dis* 3: 19.

Cornelis MC, Monda KL, Yu K, Paynter N, Azzato EM, Bennett SN, Berndt SI, Boerwinkle E, Chanock S, Chatterjee N, et al. (2011) Genome-Wide Meta-Analysis Identifies Regions on 7p21 (AHR) and 15q24 (CYP1A2) As Determinants of Habitual Caffeine Consumption. *PLoS Genet* 7: e1002033.

Corvol JC, Bonnet C, Charbonnier-Beaupel F, Bonnet AM, Fiévet MH, Bellanger A, Roze E, Meliksetyan G, Ben Djebara M, Hartmann A, et al. (2011) The COMT Val158Met polymorphism affects the response to entacapone in Parkinson's disease: A randomized crossover clinical trial. *Ann Neurol* 69: 111–118.

Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J and Vaz-Carneiro A (2010) Caffeine Exposure and the Risk of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studiess. *J. Alzheimer's Dis* 20: S221–S238.

Dardou D, Dassesse D, Cuvelier L, Deprez T, De Ryck M, Schiffmann SN (2011) Distribution of SV2C mRNA and protein expression in the mouse brain with a particular emphasis on the basal ganglia system. *Brain Res* 1367: 130–145.

Dauer W and Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889–909.

De Palma G, Dick FD, Calzetti S, Scott NW, Prescott GJ, Osborne A, Haites N, Mozzoni P, Negrotti A, Scaglioni A, et al. (2010) A case-control study of Parkinson's disease and tobacco use: gene-tobacco interactions. *Mov Disord* 25: 912–919.

Delamarre A and Meissner WG (2017) Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med* 46: 175–181.

Deng Y, Newman B, Dunne MP, Silburn PA and Mellick GD (2004) Further evidence that interactions between CYP2D6 and pesticide exposure increase risk for Parkinson's

disease. *Ann Neurol* 55: 897–897.

Devos D, Lejeune S, Cormier-Dequaire F, Tahiri K, Charbonnier-Beaupel F, Rouaix N, Duhamel A, Sablonnière B, Bonnet AM, Bonnet C, et al. (2014) Dopa-decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to l-dopa in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20: 170–175.

Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT and Shepherd S (2008) Pesticide/Environmental Exposures and Parkinson's Disease in East Texas. *J Agromedicine* 13: 37–48.

Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, et al. (2005) A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 365: 412–415.

Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Osborne A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Mozzoni P, et al. (2007) Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 64: 673–680.

Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, Duyckaerts C, Houroupan D, Ikeda K, Jellinger K, Lantos PL, Lippa CF, Mirra SS, et al. (2002) Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 935–946.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, et al. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68: 384–386.

Dumanchin C, Camuzat A, Champion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-veber P, Martin C, Penet C, Charbonnier F, et al. (1998) Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 7: 1825–1829.

- Dunn AR, Stout KA, Ozawa M, Lohr KM, Hoffman CA, Bernstein AI, Li Y, Wang M, Sgobio C, Sastry N, et al. (2017) Synaptic vesicle glycoprotein 2C (SV2C) modulates dopamine release and is disrupted in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci* 114: E2253–E2262.
- Dutheil F, Beaune P, Tzourio C, Lorient MA and Elbaz A (2010) Interaction between ABCB1 and professional exposure to organochlorine insecticides in Parkinson disease. *Arch Neurol* 67: 739–745.
- Echeverri D, Montes FR, Cabrera M, Galán A and Prieto A (2010) Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *Int J Vasc Med* 2010: 834060.
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A and Tzourio C (2009) Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol* 66: 494–504.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC and Tzourio C (2004) CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55: 430–434.
- Facheris MF, Schneider NK, Lesnick TG, de Andrade M, Cunningham JM, Rocca WA and Maraganore DM (2008) Coffee, caffeine-related genes, and Parkinson's disease: A case-control study. *Mov Disord* 23: 2033–2040.
- Factor SA (2008) Current status of symptomatic medical therapy in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5: 164–180.
- Farah A and Donangelo CM (2006) Phenolic compounds in coffee. *Brazilian J Plant Physiol* 18: 23–36.
- Farrer M, Skipper L, Berg M, Bisceglia G, Hanson M, Hardy J, Adam A, Gwinn-Hardy K, Aasly J (2002) The tau H1 haplotype is associated with Parkinson's disease in the Norwegian population. *Neurosci Lett* 322: 83–86.

- Filip R, López P, Giberti G, Coussio J and Ferraro G (2001) Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: 774–778.
- Fitzmaurice AG, Rhodes SL, Cockburn M, Ritz B and Bronstein JM (2014) Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology* 82: 419–426.
- Fong CS, Cheng CW and Wu RM (2005) Pesticides exposure and genetic polymorphism of paraoxonase in the susceptibility of Parkinson's disease. *Acta Neurol Taiwan* 14: 55–60.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, MacGregor R, Alexoff D, Shea C, Schlyer D, Wolf AP, et al. (1996) Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature* 379: 733–736.
- Fox SH and Lang AE (2008) Levodopa-related motor complications--phenomenology. *Mov Disord* 23 Suppl 3: S509-514.
- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW and La Du BN (1991) Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 19: 100–106.
- Garcia ML and Cleveland DW (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol* 13: 41–48.
- Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P and Ruiz J (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 99: 62–66.
- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, et al. (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365: 415–416.

- Golbe LI (1986) Smoking and Parkinson's Disease. *Arch Neurol* 43: 774.
- Golbe LI, Lazzarini AM, Spychala JR, Johnson WG, Stenroos ES, Mark MH and Sage JI (2001) The tau A0 allele in Parkinson's disease. *Mov Disord* 16: 442–447.
- Goldman SM (2014) Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 141–164.
- Gu Z, Feng X, Dong X and Chan P (2010) Smoking, genes encoding dopamine pathway and risk for Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 482: 31–34.
- Hamza TH, Chen H, Hill-Burns EM, Rhodes SL, Montimurro J, Kay DM, Tenesa A, Kusel VI, Sheehan P, Eaaswarkhanth M, et al. (2011) Genome-wide gene-environment study identifies glutamate receptor gene GRIN2A as a Parkinson's disease modifier gene via interaction with coffee. *PLoS Genet* 7: e1002237.
- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, et al. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 7: 583–590.
- Hernán MA, Checkoway H, O'Brien R, Costa-Mallen P, De Vivo I, Colditz GA, Hunter DJ, Kelsey KT and Ascherio A (2002) MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD. *Neurology* 58: 1381–1387.
- Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F and Gestal-Otero JJ (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52: 276–284.
- Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, Peddada SD, Factor SA, Molho E, Zabetian CP, et al. (2017) Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov*

Disord 32: 739–749.

Hill-Burns EM, Hamza TH, Zabetian CP, Factor SA and Payami H (2011) An attempt to replicate interaction between coffee and CYP1A2 gene in connection to Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 18: e107–108.

Hill-Burns EM, Singh N, Ganguly P, Hamza TH, Montimurro J, Kay DM, Yearout D, Sheehan P, Frodey K, Mclear JA, et al. (2013) A genetic basis for the variable effect of smoking/nicotine on Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J* 13: 530–537.

Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T and Pringsheim T (2016) The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* 46: 292–300.

Hitzl M, Schaeffeler E, Hoher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm MF and Schwab M (2004) Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 14: 309–318.

Huang J, de Paulis T and May JM (2004) Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J Nutr Biochem* 15: 722–729.

Huang Y and Mucke L (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148: 1204–1222.

Hubsher G, Haider M and Okun MS (2012) Amantadine: The journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology* 78: 1096–1099.

Huckins LM, Boraska V, Franklin CS, Floyd JA, Southam L, Sullivan PF, Bulik CM, Collier DA, Tyler-Smith C, Zeggini E, et al. (2014) Using ancestry-informative markers to identify fine structure across 15 populations of European origin. *Eur J Hum Genet* 22: 1190–1200.

- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L and Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 181–184.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702–705.
- Hutz MH and Rieder CR (2018) The future of pharmacogenetics in Parkinson's disease treatment. *Pharmacogenomics* 19: 171–174.
- Jeanneteau F, Funalot B, Jankovic J, Deng H, Lagarde JP, Lucotte G and Sokoloff P (2006) A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10753–10758.
- Jost WH (2017) Autonomic Dysfunction in Parkinson's Disease: Cardiovascular Symptoms, Thermoregulation, and Urogenital Symptoms. *Int Rev of Neurobiol.* 134: 771–785.
- Kalia LV and Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet* 386: 896–912.
- Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, Chen H, Richardson G, Barber, MR, Meng C, Marras C, Korell M, Kasten M, et al. (2014) Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20: 82–87.
- Kandinov B, Giladi N and Korczyn AD (2007) The effect of cigarette smoking, tea, and coffee consumption on the progression of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13: 243–245.
- Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT and Checkoway H (2002) Gender difference in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23: 515–519.

- Kiebertz K and Wunderle KB (2013) Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 28: 8–13.
- Kim IY, O'Reilly ÉJ, Hughes KC, Gao X, Schwarzschild MA, McCullough ML, Hannan MT, Betensky RA and Ascherio A (2018) Interaction between caffeine and polymorphisms of glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A ( *GRIN2A* ) and cytochrome P450 1A2 ( *CYP1A2* ) on Parkinson's disease risk. *Mov Disord* doi:10.1002/mds.27279
- Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT and Sutter TR (1998) Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19: 1847–1853.
- Kitsios GD and Zintzaras E (2009) Genome-wide association studies: hypothesis-“free” or engaged”? *Transl Res* 154: 161–164.
- Kiyohara C, Miyake Y, Koyanagi M, Fujimoto T, Shirasawa S, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, et al. (2013) MDR1 C3435T polymorphism and interaction with environmental factors in risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet* 28: 138–143.
- Kolahdouzan M and Hamadeh MJ (2017) The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther* 23: 272–290.
- Kostrzewa RM, Nowak P, Kostrzewa JP, Kostrzewa RA and Brus R (2005) Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids* 28: 157–164.
- Lee MS, Kim HS, Cho EK, Lim JH and Rinne JO (2002) COMT genotype and effectiveness of entacapone in patients with fluctuating Parkinson's disease. *Neurology* 58: 564–567.
- Lee MS, Lyoo CH, Ulmanen I, Syvänen AC and Rinne JO (2001) Genotypes of catechol-O-methyltransferase and response to levodopa treatment in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 298: 131–134.

- Lee PC, Rhodes SL, Sinsheimer JS, Bronstein J and Ritz B (2013) Functional paraoxonase 1 variants modify the risk of Parkinson's disease due to organophosphate exposure. *Environ Int* 56: 42–47.
- Lees AJ, Hardy J and Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373: 2055–2066.
- Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lusia AJ and Furlong CE (2000) Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* 10: 767–779.
- Lill CM (2016) Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes* 30: 386–396.
- Litvan I, Hauw JJ, Bartko JJ, Lantos PL, Daniel SE, Horoupian DS, McKee A, Dickson D, Baner C, Tabaton M, et al. (1996) Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 97–105.
- Liu YZ, Tang BS, Yan XX, Liu J, Ouyang DS, Nie LN, Fan L, Li Z, Ji W, Hu DL, et al. (2009) Association of the DRD2 and DRD3 polymorphisms with response to pramipexole in Parkinson's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 679–683.
- Ma C, Liu Y, Neumann S and Gao X (2017) Nicotine from cigarette smoking and diet and Parkinson disease: a review. *Transl Neurodegener* 6: 18.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B and Binz T (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580: 2011–2014.
- Maraganore DM, Hernandez DG, Singleton AB, Farrer MJ, McDonnell SK, Hutton ML, Hardy JA and Rocca WA (2001) Case-Control study of the extended tau gene haplotype in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 50: 658–661.
- Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern

- MB, Colcher A, et al. (2001) Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 286: 2245–2250.
- Matthaei J, Tzvetkov M, Strube J, Sehrt D, Sachse-Seeboth C, Hjelmberg J, Möller S, Halekoh U, Hofmann U, Schwab M, et al. (2016) Heritability of Caffeine Metabolism: Environmental Effects Masking Genetic Effects on CYP1A2 Activity but Not on NAT2. *Clin Pharmacol Ther* 100: 606–616.
- Miean KH and Mohamed S (2001) Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J Agric Food Chem* 49: 3106–3112.
- Moreau C, Meguig S, Corvol JC, Labreuche J, Vasseur F, Duhamel A, Delval A, Bardyn T, Devedjian JC, Rouaix N, et al. (2015) Polymorphism of the dopamine transporter type 1 gene modifies the treatment response in Parkinson's disease. *Brain* 138: 1271–1283.
- Nalls MA, Keller MF, Hernandez DG, Chen L, Stone DJ, Singleton AB and Parkinson's Progression Marker Initiative (PPMI) investigators (2016) Baseline genetic associations in the Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI). *Mov Disord* 31: 79–85.
- Nandipati S and Litvan I (2016) Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health* 13: 881.
- Narayan S, Sinsheimer JS, Paul KC, Liew Z, Cockburn M, Bronstein JM and Ritz B (2015) Genetic variability in ABCB1, occupational pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Environ Res* 143: 98–106.
- Nielsen S, Gallagher LG, Lundin JI, Longstreth WT, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H and Checkoway H (2012) Environmental tobacco smoke and Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 293–296.
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M and Van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and

- LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 31: 763–780.
- O’Leary KA, Edwards RJ, Town MM and Boobis AR (2005) Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon. *Pharmacogenet Genomics* 15: 51–60.
- Oertel W and Schulz JB (2016) Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem* 139: 325–337.
- Olanow CW, Stern MB and Sethi K (2009) The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72: S1–S136.
- Parkinson J (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*. Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones.
- Paul KC, Sinsheimer JS, Rhodes SL, Cockburn M, Bronstein J and Ritz B (2015) Organophosphate Pesticide Exposures, Nitric Oxide Synthase Gene Variants, and Gene–Pesticide Interactions in a Case–Control Study of Parkinson’s Disease, California (USA). *Environ Health Perspect* 124: 570–577.
- Payami H (2017) The emerging science of precision medicine and pharmacogenomics for Parkinson’s disease. *Mov Disord* 32: 1139–1146.
- Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy SG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO, et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6: e17063.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, et al. (1996) Mapping of a gene for Parkinson’s disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274: 1197–1199.
- Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM, Kamel F, Umbach DM, Marder K, Mayeux R,

- Ritz B, Ross GW, Petrovitch H, et al. (2011) Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: the caffeine connection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 18: 756–765.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A and Steeves TDL (2014) The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 29: 1583–1590.
- Przedborski S (2017) The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat Rev Neurosci* 18: 251–259.
- Qi H and Li S (2014) Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int* 14: 430–439.
- Rana HQ, Balwani M, Bier L and Alcalay RN (2013) Age-specific Parkinson disease risk in GBA mutation carriers: information for genetic counseling. *Genet Med* 15: 146–149.
- Riederer P, Konradi C, Hebenstreit G and Youdim MB (1989) Neurochemical perspectives to the function of monoamine oxidase. *Acta Neurol Scand Suppl* 126: 41–45.
- Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, Marder KS, Nelson LM, Rocca WA, Ross GW, Strickland D, Van Den Eeden SK and Gorell J (2007) Pooled Analysis of Tobacco Use and Risk of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 64: 990.
- Ritz BR, Paul KC and Bronstein JM (2016) Of Pesticides and Men: a California Story of Genes and Environment in Parkinson's Disease. *Curr Environ Heal Rep* 3: 40–52.
- Rozenberg R, Fox DC, Sobreira E and Pereira LV (2006) Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis* 37: 204–209.
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, et al. (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1303–1307.
- Schapira AHV and Obeso J (2006) Timing of treatment initiation in Parkinson's disease: A

need for reappraisal? *Ann Neurol* 59: 559–562.

Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, et al. (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 30: 350–358.

Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Rieder CR and Hutz MH (2013) Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 1251–1258.

Schumacher-Schuh AF, Rieder CR and Hutz MH (2014) Parkinson's disease pharmacogenomics: new findings and perspectives. *Pharmacogenomics* 15: 1253–1271.

Seon J, Md K, Kim JY, Kim JM, Kim JW, Chung SJ, Kim SR, Kim MJ, Kim HT, Choi KG, et al. (2011) No correlation between COMT genotype and entacapone benefits in Parkinson's disease. *Neurol Asia* 16: 211–216.

Shimada T, Watanabe J, Kawajiri K, Sutter TR, Guengerich FP, Gillam EM and Inoue K (1999) Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 20: 1607–1613.

Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, et al. (2009) Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 361: 1651–1661.

Siebert M, Bock H, Michelin-Tirelli K, Coelho JC, Giugliani R and Saraiva-Pereira ML (2012) Novel Mutations in the Glucocerebrosidase Gene of Brazilian Patients with Gaucher Disease, *JIMD Rep* 9: 7–16.

Singleton AB, Farrer MJ and Bonifati V (2013) The genetics of Parkinson's disease: progress

and therapeutic implications. *Mov Disord* 28: 14–23.

Sorbo F and Albanese A (2008) Levodopa-induced dyskinesias and their management. *J Neurol* 255: 32–41.

Spatola M and Wider C (2014) Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord* 20 Suppl 1: S35-38.

Spitz M, Pereira JS, Nicareta DH, Abreu GM, Bastos EF, Seixas TL and Pimentel MMG (2015) Association of LRRK2 and GBA mutations in a Brazilian family with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 21: 825–826.

Sulem P, Gudbjartsson DF, Geller F, Prokopenko I, Feenstra B, Aben KKH, Franke B, den Heijer M, Kovacs P, Stumvoll M, et al. (2011) Sequence variants at CYP1A1–CYP1A2 and AHR associate with coffee consumption. *Hum Mol Genet* 20: 2071–2077.

Tan EK, Chua E, Fook-Chong SM, Teo YY, Yuen Y, Tan L and Zhao Y (2007) Association between caffeine intake and risk of Parkinson's disease among fast and slow metabolizers. *Pharmacogenet Genomics* 17: 1001–1005.

Tan EK, Chai A, Lum SY, Shen H, Tan C, Teoh ML, Yih Y, Wong MC and Zhao, Y (2003) Monoamine oxidase B polymorphism, cigarette smoking and risk of Parkinson's disease: a study in an Asian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B: 58–62.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, et al. (2011) Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ Health Perspect* 119: 866–872.

Teive HAG (1998) O papel de Charcot na doença de Parkinson. *Arq Neuropsiquiatr* 56: 141–145.

Trinh J and Farrer M (2013) Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*

9: 445–454.

Tso TC Kasperbauer MJ and Sorokin TP (1970) Effect of Photoperiod and End-of-Day Light Quality on Alkaloids and Phenolic Compounds of Tobacco. *Plant Physiol* 45: 330–333.

Tsuboi Y (2012) Environmental-Genetic Interactions in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Exp Neurol* 21: 123–128.

van der Mark M, Brouwer M, Kromhout H, Nijssen P, Huss A and Vermeulen R (2011) Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environ Health Perspect* 120: 340–347.

Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F and Takahashi H (2013) The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol* 47: 495–508.

Winklhofer KF and Haass C (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1802: 29–44.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D and Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26: 1–58.

Xu S, Liu J, Yang X, Qian Y and Xiao Q (2017) Association of the DRD2 CA n -STR and DRD3 Ser9Gly polymorphisms with Parkinson's disease and response to dopamine agonists. *J Neurol Sci* 372: 433–438.

Yamada-Fowler N, Fredrikson M and Söderkvist P (2014) Caffeine Interaction with Glutamate Receptor Gene GRIN2A: Parkinson's Disease in Swedish Population. *PLoS One* 9: e99294.

**Anexos**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 140554

**Data da Versão do Projeto:** 30/09/2014

**Pesquisadores:**

CARLOS ROBERTO DE M REEDER

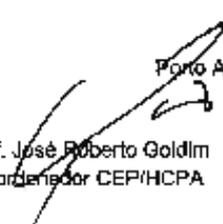
VIVIAN ALTMANN

**Título:** A CONTRIBUIÇÃO DE VARIANTES DO DNA MITOCONDRIAL COMO FATOR DE SUSCEPTIBILIDADE PARA A DOENÇA DE PARKINSON

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2014.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de pesquisa:** Farmacogenética da Doença de Parkinson: associação entre polimorfismos nos genes DRD1, DRD2, DAT1, AADC, COMT e MAO-B com complicações do uso de levodopa.

**Pesquisadores:** Artur Schuh, Raquel Townsend, Mariana Socal, Daniele Fricke, Thais Monte, Carlos Rieder e Mara Hutz.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Carlos Rieder  
Serviços de Neurologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Telefones para contato: 2101-8182 e 2101-8520.

O Serviço de Neurologia deste hospital e o Departamento de Genética da UFRGS estão promovendo o projeto de pesquisa “Farmacogenética da Doença de Parkinson”. A levodopa é das drogas mais freqüentemente utilizadas no tratamento da doença de Parkinson e é a que melhor controla os sintomas motores desta doença. Algumas pessoas toleram muito bem a levodopa, outras apresentam alguns efeitos adversos. Os efeitos adversos mais comuns são os movimentos involuntários, tipo balanceios do corpo, chamados de discinesias. Outro efeito indesejável que alguns pacientes apresentam com o tempo de uso é o encurtamento da ação. Isso significa que algumas pessoas tomam o remédio porém ele não dura o tempo suficiente no organismo. A resposta ao tratamento e os efeitos indesejáveis não são os mesmos em todas as pessoas que usam levodopa.

Este estudo quer identificar possíveis causas genéticas para as diferenças na resposta ao uso de levodopa na doença de Parkinson. Encontrar um papel genético na resposta de cada pessoa é importante para entendermos melhor a doença e o seu tratamento.

O estudo envolverá pacientes em atendimento neste hospital e consistirá em uma avaliação clínica na consulta e na realização de um exame físico neurológico. Será, ainda, feita uma avaliação com testes de memória e testes para avaliar sintomas depressivos. Toda a consulta levará em torno de 40 minutos.

**Em seguida os pacientes serão encaminhados para coleta de sangue (para extração do DNA).**

O material genético que sobrar poderá ser conservado (armazenado) ou não, conforme a decisão da cada paciente. O que ficar armazenado poderá ser utilizado em novos exames: estudo de outros genes em novas pesquisas. No caso de serem propostas novas pesquisas com este material, elas serão avaliadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa local e nacional, e somente serão realizadas mediante nova autorização do paciente para aquele estudo específico.

Toda a participação neste estudo é absolutamente confidencial (os dados serão utilizados sem identificação do paciente), bem como os resultados da avaliação clínica e dos exames genéticos. É permitida a desistência em qualquer fase da avaliação, sem qualquer tipo de problema para o participante. O estudo será financiado por recursos já aprovados para estudos de farmacogenômica pelo CNPq (Processo nº 47.256/2006-4) e dos Institutos do Milênio para equipe do Departamento de Genética da UFRGS e outras agências de fomento, sendo que não haverá

custo algum para o paciente ou seus familiares. O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e pelo Comitê de Ética deste hospital. Os pacientes e familiares serão informados dos resultados da pesquisa.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PROJETO:  
Farmacogenética da Doença de Parkinson: associação entre polimorfismos nos genes DRD1,  
DRD2, DRD3, DAT1, AADC, COMT e MAO-B com complicações do uso de levodopa.**

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que fui informado de que participarei do projeto de pesquisa “Farmacogenética da Doença de Parkinson” acima citado. Fui informado de que minha decisão em participar não comprometerá meu tratamento neste hospital, sendo meus dados e resultados de meus testes absolutamente confidenciais. Além disso, fui informado de que a qualquer momento posso desistir do estudo, sem qualquer problema para meu tratamento. Declaro que aceito participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados sem identificação.

( ) **SIM**: autorizo manter meu material genético excedente (DNA) armazenado, sabendo que poderá ser usado em meu benefício diagnóstico direto, no futuro, ou para novas pesquisas, das quais serei informado e poderei novamente optar em participar ou não

( ) **NÃO**: não autorizo armazenar meu material genético após este exame.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

Ass: \_\_\_\_\_

( ) paciente            ( ) familiar responsável – nome: \_\_\_\_\_

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: A CONTRIBUIÇÃO DE VARIANTES DO DNA MITOCONDRIAL COMO FATOR DE SUSCEPTIBILIDADE PARA A DOENÇA DE PARKINSON

#### TERMO PARA CONTROLES

Pesquisadores: Vivian Altmann, Dr. Artur Schuh, Dr. Emilio Moriguchi, Dr. Carlos Rieder e Dra. Mara Hutz.

Pesquisador Responsável: Dr. Carlos Rieder  
Serviços de Neurologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Telefones para contato: 3359-8182 e 3359-8520.

Você está sendo convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com doença de Parkinson e indivíduos sem esta doença. O objetivo do estudo é identificar a alteração genética que causa a doença de Parkinson.

A participação neste estudo envolve responder a um questionário com perguntas sociais e demográficas (idade, sexo, escolaridade, cor) e uma avaliação clínica e, também uma coleta de 4 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (hematoma) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Com a amostra de sangue será possível extrair o DNA e, com isso, realizar testes para verificar variações entre os indivíduos.

Para realizar este estudo é necessário comparar um grupo de pessoas que possuem a doença de Parkinson com um grupo de pessoas que não possuem a doença, caso aceite participar, você será incluído (a) no grupo de pessoas sem a doença de Parkinson.

A participação nesse estudo não trará nenhuma vantagem direta a você. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, auxiliar em um melhor diagnóstico e tratamento da doença de Parkinson.

A participação nesse estudo é voluntária, podendo se recusar a participar, assim como você poderá desistir de participar em qualquer momento, sem prejuízo do atendimento recebido na instituição. Toda a participação neste estudo é absolutamente confidencial (os

dados serão utilizados sem identificação do participante), bem como os resultados da avaliação clínica e dos exames genéticos.

A participação no estudo não envolve custos e você não receberá nenhum tipo de pagamento por participar. Em caso de dúvidas você poderá contatar o pesquisador responsável: Dr. Carlos Rieder (Tel: 3359-8182), no serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no 2º andar, ou a pesquisadora Vivian Altmann (Tel: 3308-8735). Você poderá também contatar o Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no 2º andar, sala 2227 ou pelo telefone 3359-7640, de segunda a sexta, das 8h às 17h.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que fui informado de que participarei do projeto de pesquisa "A contribuição de variantes do DNA mitocondrial como fator de susceptibilidade para a doença de Parkinson" acima citado. Fui informado de que minha decisão em participar não comprometerá meu atendimento neste hospital, sendo meus dados e resultados de meus testes absolutamente confidenciais. Além disso, fui informado de que a qualquer momento posso desistir do estudo, sem qualquer problema para meu atendimento na instituição. Declaro que aceito participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados sem identificação.

Este termo é assinado em 2 vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

( ) SIM: autorizo manter meu material genético excedente (DNA) armazenado, sabendo que poderá ser usado em meu benefício diagnóstico direto, no futuro, ou para novas pesquisas, das quais serei informado e poderei novamente optar em participar ou não

( ) NÃO: não autorizo armazenar meu material genético após este exame.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_