

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Farmacogenética da levodopa na doença de Parkinson: estudo de polimorfismos nos genes
da COMT, MAO-B e DAT

Artur Francisco Schumacher Schuh

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Farmacogenética da levodopa na doença de Parkinson: estudo de polimorfismos nos genes
da COMT, MAO-B e DAT

Artur Francisco Schumacher Schuh

Orientador: Carlos Roberto de Mello
Rieder

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2010

CIP - Catalogação na Publicação

Schumacher Schuh, Artur Francisco
Farmacogenética da levodopa na doença de
Parkinson: estudo de polimorfismos nos genes da
COMT, MAOB e DAT. / Artur Francisco Schumacher
Schuh. -- 2010.
102 f.

Orientador: Carlos Roberto de Mello Rieder.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2010.

1. Doença de Parkinson. 2. Farmacogenética. 3.
Levodopa. I. Rieder, Carlos Roberto de Mello,
orient. II. Título.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, 2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que vivem com doença de Parkinson.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Rieder, meu orientador e Professor por excelência, por ter me ensinado a fazer Neurologia e pesquisa e por ter-me feito descobrir o fascinante mundo dos Distúrbios do Movimento

À Profa. Mara Hutz, por ter acreditado e investido em minha curiosidade científica, por ter despertado meu interesse para a Farmacogenética e pelo exemplo de brilhante pesquisadora.

À Dra. Thais Monte, co-responsável pelo meu gosto pela doença de Parkinson, pelo muito que aprendi de Neurologia, pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho e pela amizade.

À Profa. Márcia Chaves, por ser a responsável pela criação de um espaço de excelência, propício à prática da pesquisa, e pelos conselhos sobre medicina, ciência e vida.

À Carolina Francisconi, bolsista de Iniciação Científica, pela dedicação e competência.

Às bolsistas de Iniciação Científica Vivian Altmann e Mariana Rieck, pelo auxílio no final deste projeto.

Aos colegas Raquel, Jonas e Gustavo, pela amizade e pelo incentivo e auxílio no início deste projeto.

Às colegas do Departamento de Genética, Janaína, Ana Paula e Tatiana, por terem me ensinado a trabalhar em um laboratório de Genética.

Aos colegas de residência, demais professores da Neurologia, contratados e funcionários, pelo muito que aprendi e pela agradável convivência.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por serem os responsáveis diretos para que a semente da dúvida e da crítica surgisse e se fortificasse em minha personalidade, origem de todo o trabalho científico.

A minha avó Lygia, pelo entusiasmo e vibração a cada conquista minha e por sempre colocar a família acima de qualquer valor.

A toda a minha família, em especial às minhas irmãs, Paula e Laura, pelo carinho e incentivo constantes.

Aos meus sobrinhos Eduardo, Pedro Arthur e Ana Laura, que me fazem acreditar que vale a pena todo o esforço e dedicação.

*“To move things is all that mankind can do...
whether in whispering a syllable or in felling a forest”*

- Charles Sherrington

Resumo

A doença de Parkinson é a segunda enfermidade neurodegenerativa mais frequente e acomete entre 1 a 2% das pessoas acima de 65 anos. Com a expectativa de envelhecimento da população, espera-se um aumento proporcional da prevalência desta doença, o que justifica uma preocupação crescente com o manejo dessa condição.

A levodopa é fundamental para o manejo farmacológico desses pacientes, uma vez que é possível um controle quase ótimo dos sintomas, pelo menos nos primeiros anos de tratamento. Entretanto, em cinco anos, cerca de metade dos pacientes apresentarão complicações pelo uso crônico desta medicação, o que determinará piora da qualidade de vida e um desafio ao médico, no sentido de controlar esses fenômenos. As principais complicações crônicas são as flutuações da resposta motora, as discinesias e as alucinações.

Este trabalho tem a proposta de investigar a gênese dessas alterações em sua relação com variações genéticas específicas. Foram selecionados polimorfismos em genes com plausibilidade biológica, por estarem envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica da levodopa. São eles: Val158Met da COMT (catecol-orto-metil-transferase), íntron 13 da MAO-B (monoamina oxidase B), VNTR (“variable number tandem repeat”) de 40pb da região 3'UTR (“untranslated region”) do DAT (transportador de dopamina) e -839C>T da região promotora 5' do DAT. A COMT e a MAO-B são as duas rotas enzimáticas de degradação da dopamina e o DAT é um transportador pré-sináptico de dopamina.

Foram selecionados pacientes com doença de Parkinson idiopática em acompanhamento no Serviço de Neurologia do HCPA com idade de início dos sintomas após os 45 anos e que estavam em uso de levodopa há pelo menos dois anos. Esses

pacientes foram submetidos a um protocolo de avaliação clínica, com obtenção de informações relevantes para a determinação da presença das complicações, aplicação de escalas padronizadas e coleta de sangue (ver anexos para o protocolo e as escalas). Após, o material biológico foi submetido à extração de DNA e os polimorfismos determinados por análise de fragmentos de enzima de restrição, no Departamento de Genética da UFRGS.

Entre os polimorfismos da COMT e da MAO-B não se observou diferença para a presença ou ausência de flutuação da resposta motora, discinesia e alucinação. Entretanto, pacientes com genótipo lento da COMT (MetMet) apresentaram menos complicações da terapia (desfecho aferido pela parte IV da UPDRS, “Unified Parkinson Disease Rating Scale”, que fornece um escore cuja pontuação baixa representa menos complicações da terapia). Fazendo análise dos subítens da escala, observou-se que esse efeito se deveu à menor presença de flutuação motora. Observamos ainda que os pacientes portadores do genótipo MetMet apresentaram idade de início da doença de Parkinson menor quando comparados aos portadores dos genótipos de atividade rápida (ValMet e ValVal). A diferença aproximada foi de 4 anos, com um $p=0,03$.

Seguindo o estudo da influência genética sobre a idade de início, observou-se que homens hemizigotos para o alelo G da MAO-B apresentavam idade de início precoce em relação aos portadores do alelo A, com diferença aproximada de 5 anos e $p=0,03$. Tomados em conjunto os polimorfismos da COMT e da MAO-B, o efeito do genótipo lento MetMet da COMT sobre a idade de início foi potencializado naqueles com alelo A da MAO-B (homens hemizigotos A e mulheres homozigotas AA), com diferença aproximada de oito anos e $p=0,001$.

Em relação ao gene do DAT, observou-se que a presença do alelo T do polimorfismo da região promotora está associada à maior frequência de alucinação visual,

com OR (“odds ratio”, ou razão de chances) de 5,17 e IC (intervalo de confiança) de 95% de 1,45-18,41 com $p=0,01$. Ademais, encontrou-se um achado a ser melhor explorado: pacientes portadores do alelo de 9 repetições do VNTR de 40pb necessitavam de maior dose para o controle dos sintomas parkinsonianos, com uma diferença aproximada de 100mg com $p=0,042$.

Há na literatura estudos de associação desses polimorfismos com a presença da doença de Parkinson, entretanto, poucos avaliaram o efeito dessas variantes polimórficas sobre a resposta ao uso de levodopa e sobre outros fatores clínicos. Os resultados desta dissertação trazem informações importantes para o melhor entendimento da variabilidade da resposta farmacológica e sobre a fisiopatologia da doença de Parkinson.

PALAVRAS CHAVE: doença de Parkinson; levodopa; COMT; MAOB; polimorfismo.

LISTA DE ABREVIATURAS

DAT: transportador de dopamina.

COMT: catecol-orto-metil transferase.

MAO-B: monoamina oxidase B.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

PCR: “polymerase chain reaction”.

VNTR: “variable number tandem repeat”.

MPTP: metil-fenil-tetrahidropiridina.

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

UPDRS: “ Unified Parkinson's Disease Rating Scale”.

MPP+: 1-fenil-metil-piridinium.

UTR: “untranslated region”.

OR: “odds ratio”.

CI: “confidence interval”.

IC: intervalo de confiança

NIH: National Institute of Health.

RCD: resposta de curta duração.

RLD: resposta de longa duração.

6OH-DA: 6-hidroxi-dopamina.

RNA_m: ácido desoxirribonucleico mensageiro.

ELLDOPA: “Earlier vs Later Levodopa”.

SNP: “single nucleotide polymorphism”.

LKKK2: “leucine-rich repeat kinase 2”.

PINK1: “PTEN induced putative kinase 1”.

HY: Hoehn & Yahr.

SE: Schwab & England.

Sumário

Resumo	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
Introdução	14
Revisão da Literatura	16
<i>Considerações sobre a doença de Parkinson</i>	16
<i>O uso da levodopa na doença de Parkinson</i>	21
<i>Complicações do uso crônico da levodopa</i>	25
<i>Polimorfismo no gene da COMT na doença de Parkinson</i>	31
<i>Polimorfismo no gene da MAO-B na doença de Parkinson</i>	33
OBJETIVOS	38
BIBLIOGRAFIA	39
PRIMEIRO ARTIGO	48
SEGUNDO ARTIGO	65
Considerações finais	82
ANEXOS	87

Introdução

A doença de Parkinson apresenta prevalência significativa e acomete preferencialmente a população com mais de 60 anos, ocasionando grave limitação funcional, diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade. Com a estimativa de envelhecimento populacional progressivo para as próximas décadas, espera-se um incremento na incidência dessa doença, determinando um novo cenário para a Medicina e novas demandas para a saúde pública e assistência social.

A fisiopatologia da doença de Parkinson ainda hoje não é suficientemente compreendida, mas eventos importantes já são conhecidos. Ocorre degeneração de neurônios produtores de dopamina da substância negra *pars compacta* e acúmulo de material proteico nas células remanescentes (corpos de Lewy). Essas alterações levam a uma desregulação das alças de controle do movimento nos núcleos da base, o que provoca maior inibição dessas estruturas sobre o comportamento motor iniciado no córtex cerebral.

As manifestações clínicas são variadas, com destaque para o quadro motor, composto por bradicinesia, tremor de repouso e rigidez de início assimétrico e curso progressivo. Além dessas manifestações, diversos sintomas não-motores têm sido associados à doença de Parkinson, como anosmia, distúrbios do sono, disfunção autonômica e alterações cognitivas e psiquiátricas.

O arsenal terapêutico para o tratamento sintomático da doença de Parkinson é vasto e determina melhora dos sintomas motores. Entretanto, o uso crônico dessas medicações predispõe a uma série de efeitos colaterais, que torna necessário o uso de esquemas terapêuticos complexos, agregando custo e potencial de efeitos adversos e interações medicamentosas. Portanto, é fundamental estudar os fatores que possam estar envolvidos na gênese desses efeitos colaterais, o que poderá fornecer valiosas ferramentas para

orientar as condutas clínicas, tanto no sentido de minimizar esses efeitos, quanto no sentido de tentar evitá-los.

O objetivo desta Dissertação de Mestrado foi estudar variáveis genéticas que possam influenciar o surgimento dos efeitos adversos do uso crônico da levodopa na doença de Parkinson, bem como explorar o efeito dessas variáveis genéticas sobre a dose necessária de medicamento para o controle clínico ótimo e outros parâmetros de avaliação e evolução da doença.

Revisão da Literatura

Considerações sobre a doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817, com a publicação do trabalho de James Parkinson, “An Essay on the Shaking Palsy” (James Parkinson 1817). Parkinson era um clínico geral que, já no final de sua carreira, descreveu os principais achados que ainda hoje são importantes para a definição da síndrome parkinsoniana. Entretanto, apenas em 1877, o neurologista francês Jean-Martin Charcot toma conhecimento do trabalho de Parkinson e faz uma descrição clínica mais detalhada sobre a doença, estabelece critérios diagnósticos semelhantes aos atualmente utilizados e cunha o nome “doença de Parkinson”(Kempster et al. 2007).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, fica atrás apenas da doença de Alzheimer. Apresenta distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas, havendo uma discreta predominância no sexo masculino. Cerca de 5 milhões de pessoas no mundo convivem com essa enfermidade, com uma prevalência de 0,3%. Acomete 1 a 2% da população acima de 60 anos e sua incidência e prevalência aumentam com o aumento da idade (de Lau et al. 2006). No Brasil, um estudo de base populacional identificou prevalência de 3,3% para a doença de Parkinson entre maiores de 60 anos (Barbosa et al. 2006). Estudando essa mesma faixa etária no estado do Rio Grande do Sul, nosso grupo identificou prevalência de 3% de doença de Parkinson (Roriz-Cruz in Abstracts of the XIV International Congresso f Parkinson’s Disease and Mvement Disorders 2010). Embora predomine em indivíduos idosos, há casos dessa doença em pacientes mais jovens, principalmente nas formas com herança monogênica, que perfazem cerca de 50% do total de casos de Parkinson de início precoce. Para os pacientes com

início não precoce, 2-3% apresentam herança familiar com padrão monogênico (Farrer 2006).

Clinicamente, caracteriza-se por bradicinesia (dificuldade de iniciar os movimentos e lentidão para executá-los), rigidez muscular, tremor de repouso e instabilidade postural. Essas alterações costumam ser assimétricas e apresentam caráter progressivo, com tempo de evolução de 10 anos ou mais (Hughes et al. 1992). Esses achados constituem o que se denomina de síndrome parkinsoniana, cuja causa mais freqüente é a doença de Parkinson idiopática.

Além do conceito original de uma enfermidade com acometimento preferencialmente motor, recentemente, vem sendo dada crescente atenção às manifestações não motoras da doença, uma vez que são reconhecidas como as principais responsáveis pelo grau de incapacidade dos pacientes. Este fato se deve, em parte, ao progresso das terapias dopaminérgicas, que visam primariamente restaurar o controle motor, restando os sintomas não motores, ainda sem tratamentos específicos. Os pacientes com DP podem apresentar variados sintomas neuropsiquiátricos, disfunção da marcha, distúrbios do sono, disfunção autonômica, alterações gastrointestinais e sintomas sensoriais, que expandem a noção de uma doença exclusivamente motora em direção ao conceito de uma desordem multissistêmica (Obeso et al. 2010).

O substrato patológico é o que diferencia uma síndrome parkinsoniana (que pode estar presente em etiologias diversas) da DP idiopática. O diagnóstico definitivo dessa afecção é dado com o exame do cérebro *post-mortem*, onde será encontrada degeneração da *pars compacta* da substância negra (núcleo mesencefálico responsável pelas aferências dopaminérgicas para o estriado). Ademais, são observadas inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, denominadas corpos de Lewy, nas células remanescentes das áreas de

degeneração neuronal. Essas inclusões são formadas por acúmulo de material proteico de diversas origens, predominando a alfa-sinucleína. Uma vez que o diagnóstico definitivo só é dado à necropsia, no contexto clínico existe um espectro de graus de certeza diagnóstica entre doença de Parkinson “provável” e doença de Parkinson “possível”, de acordo com as manifestações clínicas presentes e com a exclusão de outras etiologias (Hughes et al. 1992). Apesar disso, os critérios clínicos em uso, quando aplicados por neurologistas com experiência em distúrbios do movimento, fornecem uma acurácia de 98,6%, como foi demonstrado em um estudo utilizando a patologia como padrão-ouro (Hughes et al. 2002).

No modelo de Braak, que fez amplo estudo anatomopatológico sobre a distribuição dos corpos de Lewy, há vários estágios da doença de acordo com achados da necropsia, com a preservação de um gradiente caudo-rostral de evolução da degeneração celular. Essa morte neuronal não apenas é mais intensa, como parece ocorrer primeiro na substância negra *pars compacta*, diferentemente do acúmulo de corpos de Lewy, que se inicia no bulbo olfatório e nas partes caudais do tronco, corroborando a observação de que a anosmia e os distúrbios do sono possam representar uma doença de Parkinson “pré-clínica”. Com o avanço da doença, os corpos de Lewy são encontrados disseminados por todo o encéfalo, incluindo o córtex cerebral, o que explica o quadro demencial frequentemente sobreposto nos estágios finais (Braak et al. 2003).

Evidências apontam que a degeneração nigral inicia 6 a 8 anos antes da apresentação clínica (Schapira e Obeso 2006). No momento do diagnóstico, a patologia da doença de Parkinson 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 pode se dever ao fato de que haja uma redundância das vias dopaminérgicas e mecanismos de compensação que mantêm a função dos núcleos

da base estável por vários anos (Schapira e Obeso 2006). Talvez essa latência possa explicar o motivo pelo qual as tentativas do uso de drogas neuroprotetoras tenham falhado até o momento, uma vez que a doença é diagnosticada quando já há grau avançado de neurodegeneração.

O estudo das formas de doença de Parkinson com herança monogênica, que perfazem cerca de 10% do total de pacientes, adiciona elementos que contribuem para o entendimento de sua fisiopatologia (Farrer 2006). Existem mais de quinze loci gênicos identificados como causa da doença de Parkinson, a maioria bastante raros, acometendo membros de famílias específicas (Hardy et al. 2006). Entretanto, o PARK8, descrito em famílias com doença de Parkinson autossômica dominante, foi encontrado em grande número de pacientes com formas esporádicas de início tardio e com patologia cerebral confirmada (Gilks et al. 2005). Dada a alta frequência de mutações nesse gene, vários estudos foram conduzidos na tentativa de validar o teste genético das mutações mais frequentes como forma de diagnóstico, todos sem sucesso até o momento. O gene codificado por esse locus trata-se do LRRK2 (“leucine-rich repeat kinase”, ou quinase com repetições ricas em leucina), que codifica a dardarina, uma proteína presente no citoplasma das células e na membrana mitocondrial externa (Kay et al. 2006). Sua função não é completamente entendida, mas se acredita que tenha importante papel na regulação da apoptose celular (Dächsel e Farrer 2010).

O PARK1 é outra forma de doença de Parkinson monogênica que engloba mutações e repetições no gene da alfa-sinucleína, principal proteína encontrada nos corpos de Lewy, e que apresenta função pouco conhecida. Acredita-se que o acúmulo desta proteína possa levar à morte de células neuronais ou que seja um marcador de dano (Polymeropoulos et al. 1997). O PARK2 é responsável por formas juvenis da doença de

Parkinson, com herança autossômica dominante. Codifica a proteína parkina, reconhecida como a E3 ligase do complexo ubiquitina-proteassoma, que tem a função de sinalizar proteínas que serão degradadas pelo proteassoma (Kitada et al. 1998). Outro exemplo de Parkinson genético é o PARK6 (ou PINK1), com mutação em um gene que codifica uma quinase mitocondrial e determina uma doença de início precoce com herança autossômica recessiva (Valente et al. 2004). O estudo dessas formas monogênicas ajuda a compreender possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na gênese da doença esporádica e apontam para a disfunção dos sistemas de depuração de proteínas, com o consequente acúmulo anormal dessas substâncias, e para a disfunção mitocondrial, como implicados na fisiopatologia da DP idiopática.

Ademais de formas estritamente genéticas, causas ambientais foram identificadas em alguns casos da doença, como a intoxicação por MPTP, que é uma toxina mitocondrial, e os casos de parkinsonismo pós-encefáltico. Sugere-se ainda que o consumo de cigarro, café e anti-inflamatórios não esteroides são exposições ambientais associadas com efeito protetor para o desenvolvimento da doença (Powers et al. 2008). Já a exposição a pesticidas e a moradia em zona rural foram associadas à maior risco para o desenvolvimento da doença (Schapira 2006).

Apesar dos avanços das últimas décadas, a causa final dessa condição é desconhecida. Uma interação entre genética e ambiente parece ser a explicação mais plausível para o desenvolvimento da DP, sendo a idade o principal determinante. Nesse modelo, os indivíduos herdariam traços genéticos de maior susceptibilidade neuronal a insultos, tanto exógenos (toxinas ambientais, p. ex.) quanto endógenos (estresse oxidativo celular, p.ex.). Esses insultos levariam a um desequilíbrio da homeostase dos núcleos da

base e outras estruturas cerebrais, determinando disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, degradação anormal de proteínas e, como ponto final, morte neuronal (Sulzer 2007).

O uso da levodopa na doença de Parkinson

A deficiência de dopamina, causada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos, é uma constante na fisiopatologia da doença de Parkinson e responsável pelas principais manifestações clínicas. O aumento do estímulo dopaminérgico através de agentes farmacológicos é a principal forma de tratamento desses pacientes, que usualmente apresentam grande melhora dos sintomas motores com o uso dessas medicações. Dentre todas as opções terapêuticas disponíveis, a levodopa permanece como a mais efetiva e aquela que produz maior melhora nas atividades de vida diária, qualidade de vida e independência e ainda seu uso está associado à diminuição da mortalidade e da morbidade (Hoehn 1992). Entretanto, determina o surgimento de efeitos adversos imediatos – náusea, vômitos e hipotensão postural – e tardios – flutuação da resposta motora, discinesia e alucinações.

Na década de 50, Arvid Carlsson, estudando a ação anti-hipertensiva da reserpina em coelhos, observou que essa medicação também provocava um efeito “tranquilizador” (acinesia induzida pela depleção dopaminérgica), que era prontamente revertido com a administração de levodopa. Em 1959, em um congresso de farmacologia, Carlsson especulou sobre o possível efeito terapêutico da levodopa na DP. Na década posterior, Hornykiewicz propôs a deficiência de dopamina como causa da DP e demonstrou marcado efeito antiparkinsoniano com a administração endovenosa de levodopa em pacientes. Após esses intentos iniciais, várias tentativas surgiram com seu uso oral, porém com pouco sucesso, devido a discreta resposta que era obtida com o uso de baixas doses, já que o aumento das mesmas era impossível pelo forte efeito emético da droga. Em 1967, Cotzias

ultrapassou a barreira das doses elevadas com a simples estratégia de aumento lento e gradual da medicação, o que diminuiu as náuseas, possibilitando o aumento das doses e melhora clínica evidente (Cotzias et al. 1969). Com a posterior associação da levodopa aos inibidores da dopa-decarboxilase, que aumentam a disponibilidade da medicação e reduzem a intolerância gastrointestinal, sua efetividade aumentou e seu uso difundiu-se (Fahn 2008).

A levodopa é naturalmente encontrada em algumas ervas e alimentos e é sintetizada a partir do aminoácido tirosina no cérebro de mamíferos, atuando como precursora das catecolaminas, especialmente a dopamina. A absorção da levodopa dá-se por transporte ativo no intestino delgado, pela mesma rota dos aminoácidos neutros, como leucina, valina e fenilalanina. Por esse motivo, a ingestão concomitante de alimentos ricos nessas substâncias compete pelo mesmo transportador e pode diminuir a absorção da levodopa (Nutt et al. 1984). A droga passa livremente a barreira hematoencefálica, propriedade que a diferencia da dopamina, e é convertida a este neurotransmissor nos neurônios nigrais. Sua meia-vida é cerca de 90min, com pico de ação variando entre 1-5h, dependendo da população estudada. A latência para o efeito clínico em pacientes parkinsonianos é de 30-90min para preparações de liberação imediata e de 60-180min para as de liberação prolongada. A diminuição do esvaziamento gástrico, frequente nos pacientes, pode aumentar esse período de latência (Olanow et al. 2009).

No início do tratamento com levodopa, caracteristicamente, observa-se resposta clínica marcada, com redução do tremor, da rigidez e da bradicinesia. Na fase inicial, doses baixas, entre 300-400mg/dia, costumam ser suficientes. Esse período inicial costuma ser chamado de “honey moon” (lua de mel), pelo motivo de que os pacientes vivem um momento completamente livre de sintomas, mas, como todo casamento, essa felicidade não

permanece por muito tempo. Com o avanço da doença, os pacientes irão necessitar de doses mais altas, podendo chegar a 1000mg/dia ou mais.

Há uma grande variação individual na resposta dos pacientes ao uso da levodopa, sendo que, enquanto alguns indivíduos conseguem manter um controle adequado dos sintomas por longos períodos de tempo com o uso de baixas doses de levodopa, outros necessitam de altas doses para conter os sintomas desde o início do tratamento. Desta forma, um paciente só pode ser considerado como não responsivo a levodopa se fizer uso de 1000mg/dia por várias semanas, sem resposta favorável (Olanow et al. 2009). Essas variações individuais ainda não são completamente entendidas e acredita-se que possa existir, ao menos em parte, uma base genética para as mesmas.

Desde a disseminação do uso dessa medicação na DP, um intenso debate estabeleceu-se sobre o melhor momento para iniciar o tratamento e os riscos e benefícios desta escolha. Inicialmente, acreditava-se que a levodopa fosse capaz de diminuir a morte neuronal, baseado no conceito de que o estímulo aos receptores estriatais produzido pela levodopa poderia diminuir o trabalho excessivo a que estariam expostas as células nigrais remanescentes e atenuar o estresse oxidativo associado ao processamento dopaminérgico. Entretanto, com o reconhecimento de que as complicações crônicas induzidas pela levodopa são dependentes do tempo de uso da medicação, o pensamento médico corrente voltou a recomendar o início da medicação apenas quando houvesse limitação funcional significativa. Evidências de estudos *in vitro* apontam ainda para um efeito neurotóxico da levodopa, entretanto, isso não foi demonstrado *in vivo* (Fahn 2008). Esses questionamentos levaram a condução do ELLDOPA, um grande estudo prospectivo, duplo-cego, patrocinado pelo NIH, que procurou determinar a potencial toxicidade da levodopa em contexto clínico. Foram randomizados pacientes com doença de Parkinson inicial em

quatro grupos: um que recebeu placebo e outros três que receberam dosagens crescentes de levodopa. Ao final de nove meses, os quatro grupos suspenderam o uso da medicação e foram avaliados após três dias, uma e duas semanas. Este estudo demonstrou que os pacientes tratados apresentaram significativa melhora clínica em comparação com o placebo, proporcional à dose de levodopa utilizada. Nas avaliações após a suspensão da medicação, os pacientes apresentaram deterioração do benefício, como esperado, mas ainda assim significativamente menor que o grupo que usou placebo. Sugeriu-se então que (1) a levodopa não possui efeito neurotóxico e que (2) apresenta possível efeito neuroprotetor. Os achados do ELLDOPA podem ser criticados pelo fato de haver algum efeito sintomático residual da levodopa após duas semanas da suspensão do uso (Fahn et al. 2004)(Schapira 2008).

Os efeitos adversos agudos da levodopa são náusea, vômitos e hipotensão postural e devem-se a sua conversão periférica para dopamina, através da enzima dopa-decarboxilase. A dopamina periférica originada da conversão de levodopa passa então a estimular receptores responsáveis pelo controle pressórico, gerando hipotensão postural, e atua na área postrema, região do cérebro que não está protegida pela barreira hematoencefálica, provocando êmese. Além dos efeitos indesejáveis, a conversão periférica determina menor disponibilidade da medicação para o cérebro, com a necessidade do uso de doses maiores. Por essas razões, a levodopa é sempre administrada concomitantemente aos inibidores da dopa-decarboxilase, que produzem maior tolerância e aumento de cerca de quatro vezes na disponibilidade da droga (Olanow et al. 2009).

Outra enzima importante na resposta terapêutica da levodopa é a monoamina oxidase (MAO). Trata-se de uma enzima presente nas mitocôndrias de neurônios e células gliais e tem a função de desaminar catecolaminas através da oxidação destas, inativando-

as. Existe sob duas formas distintas, A e B, sendo que a MAO-B apresenta implicações terapêuticas e fisiopatológicas importantes para a DP. A MAO-B está presente nas células gliais e possui preferência pela degradação de dopamina, exercendo importante papel na eliminação desse neurotransmissor da fenda sináptica. Dois inibidores da MAO-B estão disponíveis para o uso clínico, a selegilina e a rasagilina. Podem ser utilizados no início da terapia, com efeito sintomático discreto, e na doença avançada, para o manejo das complicações da levodopa (Olanow et al. 2009).

Resta ainda uma outra via de degradação enzimática com importância terapêutica para a doença de Parkinson - a catecol-orto-metiltransferase (COMT). Com a inibição farmacológica da dopa-decarboxilase, a COMT torna-se a rota preferencial para a degradação da levodopa periférica e central. Existem dois inibidores da COMT comercialmente disponíveis, o tolcapone e o entacapone, este último apenas com ação periférica. O uso dessas medicações está bem estabelecido na doença de Parkinson com flutuação da resposta motora (Olanow et al. 2009), uma vez que podem aumentar a disponibilidade de levodopa no sistema nigroestriatal.

Complicações do uso crônico da levodopa

O efeito clínico sobre o controle motor divide-se em dois tempos de resposta. A primeira é a resposta de curta duração (RCD), que apresenta associação íntima com os parâmetros farmacocinéticos da medicação e com a concentração estriatal de levodopa. A segunda é a resposta de longa duração (RLD), que se estabelece após semanas de uso e desaparece lentamente. Os mecanismos farmacodinâmicos desta não são completamente compreendidos (Nutt 2008). Esse conceito de dois tempos diferentes da resposta motora é fundamental para a discussão sobre a fisiopatologia das complicações motoras induzidas pelo uso crônico da levodopa, que segue neste tópico.

Como visto anteriormente, após a fase inicial de melhora quase completa dos sintomas motores, os pacientes em uso de levodopa podem apresentar flutuação da resposta motora. Esse fenômeno é observado entre 40-60% dos pacientes em uso de levodopa por 4-6 anos (Ahlskog e Muentner 2001). Alguns fatores clínicos parecem predispor à presença dessas complicações. Para as flutuações, os fatores mais importantes são tempo de doença, dose de levodopa e gravidade da doença no início do uso da medicação (Schrag e Quinn 2000) (Denny e Behari 1999) (de Jong et al. 1987). Para a discinesia, soma-se aos fatores acima expostos um risco aumentado para o sexo feminino (Zappia et al. 2005). Entretanto, a doença de Parkinson de início precoce, entre 21 a 39 anos, parece ser o principal fator de risco, com cerca de 100% desses pacientes apresentando essas complicações na evolução da doença (Golbe 1991). Isso pode ser explicado pelo fato de que cérebros jovens são mais susceptíveis à plasticidade neuronal mediada pela estimulação dopaminérgica pulsátil nos núcleos da base provocada pelo uso da levodopa. Essas complicações alteram a qualidade de vida do paciente com Parkinson e são um desafio ao médico assistente, uma vez que deverá lançar mão do uso de doses maiores de levodopa, de esquemas posológicos com doses fracionadas e, eventualmente, do uso de outras medicações.

Flutuação motora é definida como a alternância entre dois estados distintos da resposta motora à levodopa na doença de Parkinson. No estado “on”, o paciente apresenta boa resposta à medicação, com controle do tremor, da rigidez e da bradicinesia. O estado “off” é quando não há efeito da medicação. Esses estados podem ser imprevisíveis e iniciar de maneira abrupta. Além desses dois estados, há três tempos distintos de resposta clínica após uma dose de levodopa: a melhora inicial, em que o paciente começa a passar para o estado “on”, o pico de dose, momento de maior benefício da medicação, e o final de dose,

quando o paciente começa a voltar para o estado “off”. As flutuações motoras podem alterar qualquer um desses três tempos (Fox e Lang 2008).

As flutuações motoras podem ser divididas em subtipos, que terão implicações terapêuticas importantes, uma vez que guiam o médico na escolha da melhor estratégia para tentar contorná-las. Abaixo, listo os principais tipos de flutuação e o manejo das mesmas, algumas baseadas em evidência e outras em opinião de especialistas (Fox e Lang 2008)(FRCP et al. 2007):

- “Wearing-off” ou deterioração de final de dose: é o tipo de flutuação mais frequente, em que há retorno dos sintomas motores antes da próxima tomada da medicação. Para manejar esse efeito, pode-se utilizar doses maiores, fracionamento das mesmas ou uso de agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B ou inibidores da COMT.

- “Off” matinal: momento de maior intensidade dos sintomas parkinsonianos logo após o despertar, causado pelo longo período da noite sem o uso da medicação. Pode-se aumentar a dose noturna de levodopa, usar preparações de liberação prolongada à noite ou levodopa de rápida absorção ao despertar.

- “Offs” imprevisíveis: re-emergência súbita dos sintomas motores, sem relação temporal definida com o momento da tomada da medicação. Pode-se tentar aumentar a dose de levodopa, encurtar as tomadas ou usar preparações de rápida absorção.

- “No-on”: dose de levodopa que não produz os efeitos esperados. Pode-se aumentar a dose, associar gastrocinéticos, tomar concomitantemente a bebidas gaseificadas e evitar a ingestão com alimentos.

- “Delayed-on”: demora para a dose de levodopa começar a fazer efeito, usualmente causada por problemas de esvaziamento gástrico. Manejo semelhante ao item anterior.

- Piora no início da dose: quando o paciente entra no tempo de início de efeito pode haver piora transitória dos sintomas parkinsonianos, especialmente o tremor. Poucas opções de manejo.

- Rebote de fim de dose ou “super-off”: no tempo de declínio do efeito da medicação pode haver exacerbação súbita dos sintomas, entrando em um estado de “super-off”, com a posterior recuperação para o período “off” usual do paciente. Pode-se aumentar a frequência da tomada da medicação, aumentar a dose, associar agonistas ou inibidores da MAO-B ou da COMT.

- “On-off” ou “yo-yoing”: diversas alternâncias súbitas e imprevisíveis ao longo do período de uma dose. Poucas opções de manejo.

Em estado fisiológico, a substância negra apresenta uma frequência de disparo praticamente constante, levando a um estímulo dopaminérgico contínuo sobre o estriado e outras estruturas cerebrais. No paciente em uso de levodopa, há uma estimulação pulsátil dessas áreas, o que leva a uma reorganização plástica e funcional dos circuitos nigroestriatais, o que pode explicar o surgimento das flutuações. Para o entendimento do fenômeno da flutuação motora, é necessário ainda recordar que a levodopa se associa com dois tempos diferentes de resposta clínica: a resposta de curta duração (RCD), que acompanha a farmacocinética da droga, e a resposta de longa duração (RLD), que pode persistir por até quatro semanas. Essas duas respostas sempre estão presentes desde o início do tratamento, porém são indistinguíveis para o paciente. Diferentemente do que a intuição poderia levar a crer, com o avanço da doença não há diminuição da RCD, mas sim

aumento da magnitude da oscilação entre os estados “on” e “off” (Nutt et al. 2002). Esse aumento é explicado por um estado “off” basal de maior intensidade, devido à maior degeneração das células dopaminérgicas, por uma diminuição da RLD (Zappia et al. 1997) e por um maior efeito da medicação no pico de dose (Nutt et al. 2002).

A discinesia é definida como um estado hipercinético, em que o paciente pode apresentar fenomenologia variada, como coreia, distonia, balismo, mioclonias e estereotipias e podem afetar qualquer parte do corpo, inclusive movimentos respiratórios. Usualmente é um marcador de boa resposta à levodopa e sua ausência se associa a pior qualidade de vida (Schrag e Quinn 2000), embora haja evidências em contrário (Chapuis et al. 2005). Abaixo, listo as principais apresentações das discinesias, com breve descrição dos achados clínicos (Fox e Lang 2008):

- Discinesia de pico de dose: é a forma mais comum de discinesia e está temporalmente relacionada com o pico de dose da levodopa, quando há seu melhor efeito terapêutico. É tipicamente uma mistura de coreia, distonia e balismo e menos frequentemente mioclonias, que costuma iniciar no lado mais acometido pela doença.

- Discinesia bifásica: correlaciona-se temporalmente com os períodos de início e de final de ação da medicação, antes e após o pico de dose, relacionados ao aumento e ao decréscimo da concentração de levodopa. Afeta preferencialmente os membros inferiores, com movimentos estereotipados, frequentemente associados com balismo e distonia.

- Distonia do período “off”: ocorre no período de pior resposta à levodopa, representando uma intrusão de um quadro hipercinético em um contexto geral hipocinético. Usualmente costuma acometer os membros inferiores, com predileção pelos pés, e se associa a dor.

Ainda não são completamente conhecidos os mecanismos causadores das discinesias, mas se sabe que estão intimamente relacionados a levodopa e ao seu efeito benéfico. A meia-vida curta da medicação provoca uma estimulação não fisiológica sobre o estriado, o que determina uma reorganização dos circuitos cerebrais, propiciando o surgimento da discinesia. Entretanto, não apenas a meia vida curta explica esse fenômeno, uma vez que agonistas dopaminérgicos de meias vidas curtas também produzem menos discinesia. A levodopa em si e a sua estimulação pulsátil, associada à evolução da doença e à diminuição da estimulação dopaminérgica tônica, promove uma modulação da transcrição gênica e da ação de receptores, transportadores e metabolizadores desta medicação, levando a uma sensibilização do estriado e alterando a regulação interna dos núcleos da base (Nutt 2008).

Alucinação visual é outra complicação frequente que acomete cerca de um terço dos pacientes em uso de terapia dopaminérgica no curso da doença (Celesia e Barr 1970) e determina impacto negativo na qualidade de vida desses pacientes e sobrecarga ao cuidador (Graham et al. 1997). O exato mecanismo neuroquímico responsável pelo surgimento dessa complicação é desconhecido, porém são estabelecidos alguns fatores de risco associados a essa complicação, como comprometimento cognitivo, duração e gravidade da doença. Ademais, a presença de bradicinesia e instabilidade postural e a ausência de tremor exercem um papel secundário para o risco de alucinação (Papapetropoulos et al. 2005). A presença da levodopa parece ser determinante para o surgimento dessa complicação, porém, a dose não se relaciona com esse fenômeno, uma vez que mesmo com a infusão endovenosa de grandes concentrações dessa medicação não há indução de alucinação (Sanchez-Ramos et al. 1996).

Polimorfismo no gene da COMT na doença de Parkinson

Uma das principais rotas de degradação enzimática da dopamina, e das demais catecolaminas, é a catecol-orto-metil transferase (COMT). Trata-se de uma enzima intracelular, localizada no neurônio pós-sináptico, que age através da ligação de um grupo metila na molécula de catecolamina. Também é encontrada em outras partes do corpo, com alta concentração no fígado, rins e trato gastrointestinal, o que contribui com parte da degradação periférica da levodopa administrada aos pacientes. Apresenta como função geral a eliminação tanto de endo como de xenobióticos que apresentam grupo catecol e alguns metabólitos hidroxilados (Zhu 2002)(Männistö et al. 1992). Uma variação interindividual na atividade desta enzima é conhecida desde a década de 1970, que, posteriormente, foi atribuída, em parte, a um polimorfismo genético (Zhu 2002).

O gene da COMT está localizado no cromossomo 22q11 e apresenta um polimorfismo funcional, dado por uma transição de guanina (G) para adenina (A) na posição 158 do éxon 4, que determina a substituição de valina por metionina na estrutura primária da proteína. A homozigose para o alelo Met determina uma diminuição de três a quatro vezes na atividade enzimática (Lachman et al. 1996). Dada a plausibilidade biológica para que o gene da COMT esteja envolvido na resposta à levodopa e o fato de que esse é um polimorfismo com funcionalidade evidente, trata-se de um bom candidato para estudos farmacogenéticos.

O estudo desse polimorfismo na DP iniciou com a busca de efeito sobre o risco de desenvolver a enfermidade. Kunugi encontrou uma maior frequência do genótipo MetMet (de atividade lenta) em uma amostra de parkinsonianos de origem oriental (Kunugi et al. 1997). Wu também observou maior risco para o alelo Met da COMT quando em interação com o genótipo GG do polimorfismo do íntron 13 da MAO-B (Wu et al. 2001). Yoritaka,

ainda entre orientais, e Bialecka, em uma amostra de poloneses, descreveram resultados contrários aos de Kunugi e de Wu, sugerindo que o genótipo MetMet poderia exercer um efeito protetor para a doença (Yoritaka et al. 1997)(Bialecka et al. 2005). Outros estudos não encontraram associação (Hernán et al. 2002a)(Sylvänen et al. 1997), bem como uma metanálise que reuniu dados de cinco trabalhos (Tan et al. 2000).

Antes dos estudos farmacogenéticos deste polimorfismo com a levodopa, Rivera-Calimlim (Rivera-Calimlim et al. 1977), em 1977, observou que pacientes com atividade eritrocitária rápida da COMT apresentavam pior resposta à levodopa, o que foi confirmado por Reilly em 1980 (Reilly et al. 1980). Porém, já no ano de 2000, Woitalla não encontrou diferença na atividade enzimática da COMT entre pacientes com ou sem flutuação da resposta motora (“wearing-off” e “on-off”) (Woitalla et al. 2000).

Lee e Contin, observando diversos parâmetros clínicos e laboratoriais após uma dose de levodopa, não encontraram associação do polimorfismo Val158Met da COMT com a resposta clínica à medicação nem com a farmacocinética da droga (Lee et al. 2001)(Contin et al. 2005). Entretanto, Watanabe descreveu uma tendência à maior frequência do genótipo lento MetMet entre os pacientes com flutuação ou discinesia (Watanabe et al. 2003). Bialecka encontrou uma tendência não-significativa de que pacientes com o genótipo MetMet usavam menos que 500mg de levodopa no quinto ano da doença, quando em comparação com os outros genótipos (Bialecka et al. 2004). A mesma autora, através de análise conjunta de quatro polimorfismos distintos no gene da COMT, encontrou maior frequência de um haplótipo de alta atividade entre os pacientes com doença de Parkinson de início tardio e a dose de levodopa também foi maior nesse grupo (Bialecka et al. 2008). A presença de psicose e esse polimorfismo foi avaliada apenas em um trabalho, que não encontrou associação significativa (Camicioli et al. 2005).

Polimorfismo no gene da MAO-B na doença de Parkinson

As monoaminas oxidases são uma família de enzimas responsáveis pela degradação de xenobióticos e neurotransmissores e são a principal rota enzimática de degradação da dopamina no sistema nervoso central. Localizam-se na membrana externa da mitocôndria da glia, onde atuam através da desaminação oxidativa. Esse processo gera radicais livres, o que pode estar implicado na fisiopatologia da doença de Parkinson (Fahn e Cohen 1992).

O tabagismo, já implicado como um fator protetor (Powers et al. 2008), possui reconhecida ação de diminuir a atividade enzimática da MAO (Fowler et al. 1996). Ademais, a MAO-B é fundamental para o desenvolvimento do parkinsonismo induzido por MPTP, já que é responsável pela conversão deste no produto neurotóxico MPP⁺ (Maret et al. 1990). O bloqueio da MAO é capaz de anular a toxicidade dopaminérgica induzida por MPTP *in vivo* (Chiba, Trevor, e Castagnoli 1984).

Existe sob duas formas distintas, a MAO-A e a MAO-B, sendo que as duas apresentam a função de degradar catecolaminas, sendo que a última possui especificidade para dopamina (Olanow et al. 2009). Os genes responsáveis pela codificação dessas enzimas estão localizados no cromossomo X, dispostos lado a lado e apresentam similaridade de cerca de 70%. No gene da MAO-B, existe um polimorfismo no íntron 13 que é uma troca de adenina (A) por guanina (G) a 36 pares de base antes da posição 5' do éxon 14 (J. H. Kurth et al. 1993). O alelo A deste polimorfismo foi associado à maior expressão desta enzima em tecido cerebral humano (Balciuniene et al. 2002). A atividade enzimática, aferida em linhagem de células de hepatoma e astrocitoma, foi maior para o alelo G (Costa-Mallen et al. 2005), efeito não encontrado em um estudo em plaquetas (Pivac et al. 2007)(Pivac et al. 2006). Essa contradição de resultados sugere que haja diferenças tecido-específicas para a manifestação do efeito funcional deste polimorfismo.

Existem vários estudos que buscaram associação deste polimorfismo da MAO-B com a DP, com resultados conflitantes. Três estudos encontraram associação positiva para o alelo G (Kurth et al. 1993) e oito estudos com resultados negativo (Morimoto et al. 1995)(Planté-Bordeneuve et al. 1997)(Mellick et al. 1999)(Nakatome et al. 1998)(Hernán et al. 2002b). Checkoway encontrou interação entre tabagismo e alelo A para risco de doença (Checkoway et al. 1998). Wu encontrou associação entre o alelo G e a doença de Parkinson, com efeito potencializado pelo alelo lento MetMet da COMT (Wu et al. 2001). Bialecka e Singh também encontraram aumento da frequência do alelo G entre pacientes parkinsonianos, este na associação com outros polimorfismos da rota da dopamina e de detoxificação e aquele com maior efeito nos pacientes heterozigotos para o Val158Met da COMT (Bialecka et al. 2005)(Singh et al. 2008). Bialecka demonstrou que o alelo A foi um fator de risco independente para doença de Parkinson de início precoce em sua amostra (Bialecka et al. 2007). Na metanálise de Tan, através da reunião de dados de cinco estudos, a associação entre esse polimorfismo e a doença de Parkinson não foi confirmada (Tan et al. 2000). Um único estudo identificado avaliou esse polimorfismo com resposta à levodopa, já citado anteriormente na discussão sobre a COMT, e não encontrou associação significativa com dose de levodopa no quinto ano da doença (Bialecka et al. 2004).

Polimorfismos no gene do DAT na doença de Parkinson

O transportador de dopamina (DAT) é um dos principais responsáveis pela eliminação da dopamina da fenda sináptica, deslocando esse neurotransmissor para dentro do neurônio pré-sináptico. É o principal alvo de psicoestimulantes como anfetaminas e cocaína, que bloqueiam sua ação. Ademais, transporta as neurotoxinas MPP⁺ e 6OH-DA, que causam parkinsonismo, explicando a preferência desses agentes por células dopaminérgicas (Uhl 2003). O grau de degeneração celular das estruturas cerebrais

acometidas na doença de Parkinson parece manter relação com a expressão gênica desta molécula, ressaltando sua importância como fator envolvido na fisiopatologia da doença (Uhl 1998).

O DAT é uma proteína transmembrana que acopla duas moléculas de sódio, uma de cloro e uma de dopamina. Transporta esta última utilizando a energia do gradiente de sódio, sendo, portanto, dependente da ação da bomba de Na^+/K^+ . O transporte da dopamina pode ser alterado pelo potencial de membrana, uma vez que depende da energia do gradiente iônico. Seu gene está localizado no cromossoma 5p15, com 64kpb (Uhl 2003). Apresenta muitas variações polimórficas (Mazei-Robison et al. 2005) e talvez a mais conhecida seja um VNTR (“variable number of tandem repeat”, ou número variável de repetições em tandem) de 40pb, que codifica uma região 3' não traduzida do RNAm. As repetições variam entre 3 a 13 em cada alelo, sendo que as mais frequentes são as com 9 e 10 repetições (Vandenbergh et al. 1992).

Através de estudo de imagem (SPECT) com beta-CIT (ligante do DAT), observou-se que alelos com menos repetições associavam-se a menor ligação ao DAT, sugerindo menor expressão gênica para esses alelos (Heinz et al. 2000). Esse achado foi também encontrado em estudos que avaliaram expressão gênica (Fuke et al. 2001)(Michelhaugh et al. 2001)(VanNess et al. 2005), porém não foi confirmada em outros trabalhos (Martinez et al. 2001)(Lynch et al. 2003). Essa possível diferença da expressão poderia tornar as pessoas com alelos de maior repetição mais susceptíveis à doença de Parkinson, uma vez que a captação de neurotoxinas se dá através desse transportador. De fato, um estudo australiano encontrou risco aumentado para os portadores do alelo de 11 repetições (Le Couteur et al. 1997), achado que se reproduziu em população oriental (Kim et al. 2000). Entretanto, outros estudos falharam em encontrar esse resultado (Mercier et al.

1999)(Leighton et al. 1997)(Nicholl et al. 1999)(Planté-Bordeneuve et al. 1997)(Goudreau et al. 2002). Recentemente, um estudo com a mesma técnica de SPECT com beta-CIT demonstrou maior disponibilidade de DAT para os portadores do alelo de 9 repetições, o que vai contra os dados previamente apresentados (van de Giessen et al. 2009). O verdadeiro efeito funcional deste polimorfismo ainda é tema para discussão e propõem-se inclusive que possa não apresentar qualquer efeito *per se*, mas que esteja em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo funcional.

Existem evidências de que o alelo 9 possa estar mais frequente entre pacientes com DP. Kelada observou que o alelo com 9 repetições era mais frequente apenas na população com idade de início da doença igual ou acima de 60 anos (Kelada et al. 2005). Já no trabalho de Ritz, a frequência do alelo de 9 repetições aumentava se havia exposição à pesticidas, sugerindo uma interação entre genética e toxinas ambientais (Ritz et al. 2009). Lin observou que os pacientes homozigotos para o alelo de 10 repetições poderiam estar mais protegidos para o desenvolvimento da doença (Lin et al. 2003). Já na metanálise de Tan, com a inclusão de 1.052 alelos em pacientes parkinsonianos e 1.276 de controles, não se demonstrou efeito para a presença dos alelos 9 e 10 e o risco de doença de Parkinson (Tan et al. 2000).

Os estudos que buscaram associação deste polimorfismo com resposta à levodopa são escassos. Contin não encontrou qualquer diferença entre os portadores do alelo 9 e os homozigotos para o 10 quando observou a resposta clínica desses pacientes após uso de uma dose de levodopa (Contin et al. 2004). Kaiser encontrou associação entre a presença do alelo 9 e a ocorrência de psicose ou discinesia (Kaiser et al. 2003).

A região 5' do gene do DAT vem recebendo atenção especial nos últimos anos, devido ao reconhecimento de que está envolvida na regulação da expressão gênica

(Greenwood et al. 2001)(Greenwood e Kelsoe 2003)(Kelada et al. 2005). Estudos *in vitro* mostraram que essa região é um forte promotor não-específico, o que levantou a hipótese da presença de regiões silenciadoras que se ligam a moléculas tecido-específicas, explicando sua expressão exclusiva em neurônios dopaminérgicos (Kouzmenko et al. 1997)(Sacchetti et al. 1999)(Bannon et al. 2001). Rubie demonstrou cinco polimorfismos da região 5' que estariam associados a sítios de ligação à silenciadores da expressão gênica (Rubie et al. 2001). Dentre esses polimorfismos, o -839C/T estaria na região promotora e seu alelo T determinaria a introdução de um sítio de ligação para uma proteína líder 1 (LBP-1), que inibiria a transcrição. Desta maneira, especula-se que portadores deste alelo apresentem menor expressão do DAT.

Apesar de muitos trabalhos explorando a relação dos polimorfismos da região 5' do DAT em outras doenças, encontramos apenas dois que os avaliaram na doença de Parkinson. Ritz encontrou associação entre haplótipos da região promotora 5' com maior risco para a doença, que era magnificado pela exposição à pesticidas (Ritz et al. 2009). Já Kelada não observou associação entre haplótipos dessa região e a doença de Parkinson (Kelada et al. 2005). Até onde temos conhecimento, não há estudos avaliando este polimorfismo com a resposta dos pacientes ao uso de levodopa, nem em relação à outras variáveis clínicas.

OBJETIVOS

Geral

Identificar associações entre polimorfismos genéticos da COMT, MAO-B e DAT (Val158Met da COMT, íntron 13 da MAO-B, VNTR de 40pb da região 3'UTR do DAT e -839C>T da região promotora 5' do DAT) com as complicações do uso crônico da levodopa em uma população de pacientes com doença de Parkinson idiopática, bem como explorar o efeito desses polimorfismos sobre a dose necessária de levodopa para o adequado controle motor e outras variáveis clínicas e de evolução da doença.

Específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos acima citados em uma amostra de pacientes com doença de Parkinson idiopática em nosso meio.
- Comparar a ocorrência de complicações induzidas pela levodopa (flutuação motora, discinesia e alucinação) entre os pacientes portadores e não portadores dos polimorfismos acima citados.
- Comparar a dose equivalente atual de levodopa (medida síntese de todas as medicações com efeito dopaminérgico), controlada para tempo de doença, entre os pacientes portadores e não portadores dos polimorfismos acima citados.
- Explorar o efeito da presença dos polimorfismos acima citados sobre dados da história da doença, observações clínicas e escores padronizados obtidos pela aplicação de escalas para avaliar diferentes aspectos da doença de Parkinson.

BIBLIOGRAFIA

- Abstracts of the Fourteenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 2010. *Movement Disorders* 25(S2): S181-S565.
- Ahlskog, J E, e M D Muentner. 2001. "Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 16(3): 448-458.
- Balciuniene, J et al. 2002. "Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain." *Human Genetics* 110(1): 1-7.
- Bannon, M J et al. 2001. "The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders." *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 11(6): 449-455.
- Barbosa, Maira Tonidandel et al. 2006. "Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study)." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 21(6): 800-808.
- Bialecka, M et al. 2007. "Polymorphisms of catechol-O-methyltransferase (COMT), monoamine oxidase B (MAOB), N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in patients with early onset of Parkinson's disease." *Parkinsonism & Related Disorders* 13(4): 224-229.
- Bialecka, M et al. 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 Neurologica Scandinavica* 110(4): 260-266.
- Bialecka, Monika et al. 2008. "The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications." *Pharmacogenetics and Genomics* 18(9): 815-821.
- Bialecka, Monika et al. 2005. "Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in a Polish population." *European Neurology* 53(2): 68-73.
- Braak, Heiko et al. 2003. "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiology of Aging* 24(2): 197-211.
- Camicioli, Richard et al. 2005. "Apolipoprotein E epsilon4 and catechol-O-methyltransferase alleles in autopsy-proven Parkinson's disease: relationship to dementia and hallucinations." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 20(8): 989-994.

- Celesia, G G, e A N Barr. 1970. "Psychosis and other psychiatric manifestations of levodopa therapy." *Archives of Neurology* 23(3): 193-200.
- Chapuis, Stéphane et al. 2005. "Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 20(2): 224-230.
- Checkoway, H et al. 1998. "A genetic polymorphism of MAO-B modifies the association of cigarette smoking and Parkinson's disease." *Neurology* 50(5): 1458-1461.
- Chiba, K, A Trevor, e N Castagnoli. 1984. "Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(2): 574-578.
- Contin, Manuela et al. 2004. "Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease." *Clinical Neuropharmacology* 27(3): 111-115.
- Contin, Manuela et al. 2005. "Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 20(6): 734-739.
- Costa-Mallen, Paola et al. 2005. "Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene." *Neuroscience Letters* 383(1-2): 171-175.
- Cotzias, G C, P S Papavasiliou, e R Gellene. 1969. "L-dopa in parkinson's syndrome." *The New England Journal of Medicine* 281(5): 272.
- Dächsel, Justus C, e Matthew J Farrer. 2010. "LRRK2 and Parkinson disease." *Archives of Neurology* 67(5): 542-547.
- Denny, A P, e M Behari. 1999. "Motor fluctuations in Parkinson's disease." *Journal of the Neurological Sciences* 165(1): 18-23.
- Fahn, S, e G Cohen. 1992. "The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it." *Annals of Neurology* 32(6): 804-812.
- Fahn, Stanley. 2008. "The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3: S497-508.
- Fahn, Stanley et al. 2004. "Levodopa and the progression of Parkinson's disease." *The New England Journal of Medicine* 351(24): 2498-2508.
- Farrer, Matthew James. 2006. "Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects." *Nature Reviews. Genetics* 7(4): 306-318.

- Fowler, J S et al. 1996. "Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers." *Nature* 379(6567): 733-736.
- Fox, Susan H, e Anthony E Lang. 2008. "Levodopa-related motor complications--phenomenology." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3: S509-514.
- FRCP, Walter G. Bradley DM et al. 2007. *Neurology in Clinical Practice e-dition: Text with Continually Updated Online Reference, 2-Volume Set*. 5 ed. Butterworth-Heinemann.
- Fuke, S et al. 2001. "The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression." *The Pharmacogenomics Journal* 1(2): 152-156.
- van de Giessen, Elisabeth M et al. 2009. "Striatal dopamine transporter availability associated with polymorphisms in the dopamine transporter gene SLC6A3." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50(1): 45-52.
- Gilks, William P et al. 2005. "A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease." *Lancet* 365(9457): 415-416.
- Golbe, L I. 1991. "Young-onset Parkinson's disease: a clinical review." *Neurology* 41(2 (Pt 1)): 168-173.
- Goudreau, John L et al. 2002. "Case-control study of dopamine transporter-1, monoamine oxidase-B, and catechol-O-methyl transferase polymorphisms in Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 17(6): 1305-1311.
- Graham, J M, R A Grünewald, e H J Sagar. 1997. "Hallucinosi s in idiopathic Parkinson's disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 63(4): 434-440.
- Greenwood, T A et al. 2001. "Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder." *American Journal of Medical Genetics* 105(2): 145-151.
- Greenwood, Tiffany A, e John R Kelsoe. 2003. "Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene." *Genomics* 82(5): 511-520.
- Hardy, John et al. 2006. "Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism." *Annals of Neurology* 60(4): 389-398.

- Heinz, A et al. 2000. "Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 22(2): 133-139.
- Hernán, M A et al. 2002a. "MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD." *Neurology* 58(9): 1381-1387.
- Hernán, M A et al. 2002b. "MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD." *Neurology* 58(9): 1381-1387.
- Hoehn, M M. 1992. "The natural history of Parkinson's disease in the pre-levodopa and post-levodopa eras." *Neurologic Clinics* 10(2): 331-339.
- Hughes, A J et al. 1992. "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 55(3): 181-184.
- Hughes, Andrew J et al. 2002. "The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service." *Brain: A Journal of Neurology* 125(Pt 4): 861-870.
- Ingelman-Sundberg, Magnus, e Cristina Rodriguez-Antona. 2005. "Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1460): 1563-1570.
- James Parkinson. 1817. "An Essay on the Shaking Palsy." *Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones*.
- de Jong, G J, J D Meerwaldt, e P I Schmitz. 1987. "Factors that influence the occurrence of response variations in Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 22(1): 4-7.
- Kaiser, R et al. 2003. "L -dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism." *Neurology* 60(11): 1750-1755.
- Kay, Denise M et al. 2006. "Validity and utility of a LRRK2 G2019S mutation test for the diagnosis of Parkinson's disease." *Genetic Testing* 10(3): 221-227.
- Kelada, Samir N et al. 2005. "Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease." *Pharmacogenetics and Genomics* 15(9): 659-668.
- Kempster, Peter A, Brian Hurwitz, e Andrew J Lees. 2007. "A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy." *Neurology* 69(5): 482-485.
- Kim, J W et al. 2000. "Association of the dopamine transporter gene with Parkinson's disease in Korean patients." *Journal of Korean Medical Science* 15(4): 449-451.

- Kitada, T et al. 1998. "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature* 392(6676): 605-608.
- Kouzmenko, A P, A M Pereira, e B S Singh. 1997. "Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240(3): 807-811.
- Kunugi, H et al. 1997. "High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease." *Neuroscience Letters* 221(2-3): 202-204.
- Kurth, J H et al. 1993. "Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 33(4): 368-372.
- Lachman, H M et al. 1996. "Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders." *Pharmacogenetics* 6(3): 243-250.
- de Lau, Lonneke M L, e Monique M B Breteler. 2006. "Epidemiology of Parkinson's disease." *Lancet Neurology* 5(6): 525-535.
- Lazarou, J, B H Pomeranz, e P N Corey. 1998. "Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 279(15): 1200-1205.
- Le Couteur, D G et al. 1997. "Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 12(5): 760-763.
- Lee, M S et al. 2001. "Genotypes of catechol-O-methyltransferase and response to levodopa treatment in patients with Parkinson's disease." *Neuroscience Letters* 298(2): 131-134.
- Leighton, P W et al. 1997. "The dopamine transporter gene and Parkinson's disease in a Chinese population." *Neurology* 49(6): 1577-1579.
- Lin, Juei-Jueng et al. 2003. "The homozygote 10-copy genotype of variable number tandem repeat dopamine transporter gene may confer protection against Parkinson's disease for male, but not to female patients." *Journal of the Neurological Sciences* 209(1-2): 87-92.
- Lynch, David R et al. 2003. "Lack of effect of polymorphisms in dopamine metabolism related genes on imaging of TRODAT-1 in striatum of asymptomatic volunteers and patients with Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 18(7): 804-812.
- Männistö, P T et al. 1992. "Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors." *Progress in Drug Research. Fortschritte*

Der Arzneimittelforschung. Progrès Des Recherches Pharmaceutiques 39: 291-350.

Maret, G et al. 1990. "The MPTP story: MAO activates tetrahydropyridine derivatives to toxins causing parkinsonism." *Drug Metabolism Reviews* 22(4): 291-332.

Martinez, D et al. 2001. "The variable number of tandem repeats polymorphism of the dopamine transporter gene is not associated with significant change in dopamine transporter phenotype in humans." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 24(5): 553-560.

Mazei-Robison, Michelle S et al. 2005. "Sequence variation in the human dopamine transporter gene in children with attention deficit hyperactivity disorder." *Neuropharmacology* 49(6): 724-736.

Mellick, G D, S J McCann, e D G Le Couter. 1999. "Parkinson's disease, MAOB, and smoking." *Neurology* 53(3): 658.

Mercier, G, J C Turpin, e G Lucotte. 1999. "Variable number tandem repeat dopamine transporter gene polymorphism and Parkinson's disease: no association found." *Journal of Neurology* 246(1): 45-47.

Michelhaugh, S K et al. 2001. "The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons." *Journal of Neurochemistry* 79(5): 1033-1038.

Morimoto, Y et al. 1995. "Association analysis of a polymorphism of the monoamine oxidase B gene with Parkinson's disease in a Japanese population." *American Journal of Medical Genetics* 60(6): 570-572.

Nakatome, M et al. 1998. "Detection and analysis of four polymorphic markers at the human monoamine oxidase (MAO) gene in Japanese controls and patients with Parkinson's disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247(2): 452-456.

Nicholl, D J et al. 1999. "A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. European Study Group on Atypical Parkinsonism." *Neurology* 53(7): 1415-1421.

Nutt, J G et al. 1984. "The "on-off" phenomenon in Parkinson's disease. Relation to levodopa absorption and transport." *The New England Journal of Medicine* 310(8): 483-488.

Nutt, John G. 2008. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3: S580-584.

- Nutt, John G et al. 2002. "Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy." *Annals of Neurology* 51(6): 686-693.
- Obeso, Jose A et al. 2010. "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle." *Nature Medicine* 16(6): 653-661.
- Olanow, C Warren, Matthew B Stern, e Kapil Sethi. 2009. "The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009)." *Neurology* 72(21 Suppl 4): S1-136.
- Papapetropoulos, Spiridon, Andreas A Argyriou, e John Ellul. 2005. "Factors associated with drug-induced visual hallucinations in Parkinson's disease." *Journal of Neurology* 252(10): 1223-1228.
- Pivac, Nela et al. 2007. "Monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity in combat-related posttraumatic stress disorder." *Journal of Affective Disorders* 103(1-3): 131-138.
- Pivac, Nela et al. 2006. "The lack of association between monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity among men." *Life Sciences* 79(1): 45-49.
- Planté-Bordeneuve, V et al. 1997. "Evaluation of four candidate genes encoding proteins of the dopamine pathway in familial and sporadic Parkinson's disease: evidence for association of a DRD2 allele." *Neurology* 48(6): 1589-1593.
- Polymeropoulos, M H et al. 1997. "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science (New York, N.Y.)* 276(5321): 2045-2047.
- Powers, Karen M et al. 2008. "Combined effects of smoking, coffee, and NSAIDs on Parkinson's disease risk." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 23(1): 88-95.
- Reilly, D K, L Rivera-Calimlim, e D Van Dyke. 1980. "Catechol-O-methyltransferase activity: a determinant of levodopa response." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 28(2): 278-286.
- Ritz, Beate R et al. 2009. "Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease." *Environmental Health Perspectives* 117(6): 964-969.
- Rivera-Calimlim, L et al. 1977. "The clinical picture and plasma levodopa metabolite profile of parkinsonian nonresponders. Treatment with levodopa and decarboxylase inhibitor." *Archives of Neurology* 34(4): 228-232.
- Rubie, C et al. 2001. "The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample." *Neuroscience Letters* 297(2): 125-128.

- Sacchetti, P et al. 1999. "Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene." *Brain Research. Molecular Brain Research* 74(1-2): 167-174.
- Sanchez-Ramos, J R, R Ortoll, e G W Paulson. 1996. "Visual hallucinations associated with Parkinson disease." *Archives of Neurology* 53(12): 1265-1268.
- Schapira, Anthony H V. 2006. "Etiology of Parkinson's disease." *Neurology* 66(10 Suppl 4): S10-23.
- Schapira, Anthony H V. 2008. "The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 23 Suppl 3: S515-520.
- Schapira, Anthony H V, e Jose Obeso. 2006. "Timing of treatment initiation in Parkinson's disease: a need for reappraisal?." *Annals of Neurology* 59(3): 559-562.
- Schrag, A, e N Quinn. 2000. "Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study." *Brain: A Journal of Neurology* 123 (Pt 11): 2297-2305.
- Singh, Madhu et al. 2008. "Polymorphism in environment responsive genes and association with Parkinson disease." *Molecular and Cellular Biochemistry* 312(1-2): 131-138.
- Sulzer, David. 2007. "Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease." *Trends in Neurosciences* 30(5): 244-250.
- Syvänen, A C et al. 1997. "Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland." *Pharmacogenetics* 7(1): 65-71.
- Tan, E K et al. 2000. "Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease." *Neurology* 55(4): 533-538.
- Uhl, George R. 2003. "Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 18 Suppl 7: S71-80.
- Uhl, G R. 1998. "Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 43(5): 555-560.
- Valente, Enza Maria et al. 2004. "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." *Science (New York, N.Y.)* 304(5674): 1158-1160.
- Vandenbergh, D J et al. 1992. "Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR." *Genomics* 14(4): 1104-1106.

- VanNess, Sidney H, Michael J Owens, e Clinton D Kilts. 2005. "The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density." *BMC Genetics* 6: 55.
- Watanabe, M et al. 2003. "Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease." *Neuropsychobiology* 48(4): 190-193.
- Weinshilboum, Richard. 2003. "Inheritance and drug response." *The New England Journal of Medicine* 348(6): 529-537.
- Woitalla, D. et al. 2000. "The activity of Catechol-O-Methyltransferase in parkinsonian patients with "on-off fluctuations"." *Journal of Neural Transmission* 107(1): 105-111.
- Wu, R M et al. 2001. "The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese." *Neurology* 56(3): 375-382.
- Yoritaka, A et al. 1997. "Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. Short communication." *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 104(11-12): 1313-1317.
- Zappia, M et al. 1997. "Long-duration response to levodopa influences the pharmacodynamics of short-duration response in Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 42(2): 245-248.
- Zappia, Mario et al. 2005. "Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study." *Archives of Neurology* 62(4): 601-605.
- Zhu, Bao Ting. 2002. "Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis." *Current Drug Metabolism* 3(3): 321-349.

PRIMEIRO ARTIGO

Association between Val158Met COMT and intron 13 MAOB genotype with age at onset of Parkinson's disease.

Artur Francisco Schumacher-Schuh^{1,2}, MD, Carlos R. M. Rieder¹, MD, PhD, Thais L. Monte¹, MD, Carolina Francisconi¹, Vivian Altmann² and Mara H. Hutz, PhD^{2*}

1- Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

2- Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética,

Instituto de Biociências, UFRGS.

Caixa Postal 15053

91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3308-6720

FAX: 55-51-3308-7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs

Running title: COMT polymorphism in Parkinson's disease

Key words: Parkinson's disease; COMT polymorphism; genetic susceptibility

Financial support: The research was supported by grants from “Financiadora de Estudos e Projetos” (FINEP 01.08.01230.00), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), and “Fundo de Incentivo à Pesquisa” (FIPE-HCPA).

Potential conflict of interest: Nothing to report .

Abstract: The pathophysiology of sporadic Parkinson's disease (PD) remains unknown, but it seems to result from an interaction between environmental factors and genetics. Therefore, the study of genetic polymorphisms with biological plausibility is essential to understand its determinants. COMT and MAOB are the both enzymes responsible for dopamine degradation. COMT has a functional polymorphism (Val158Met) that determines high and low enzyme activity and MAOB has an íntron 13 polymorphism that seems to play a role in the disease. Our aim was to assess the effect of these polymorphisms on Parkinson's disease age at onset and other clinical variables. Patients with sporadic Parkinson's disease and age at onset beyond 45 years old were recruited. In this study, one hundred and twenty-three PD patients were genotyped for COMT and MAOB polymorphisms. We observed that Met/Met patients presented an earlier age of symptom onset when compared to Val/Val genotype, respectively 61,24+-2.8 and 65.76+-4,2 (p=0.03). Regarding the MAOB íntron 13, we observed that in men the G allele determined an earlier age at onset. When analyzing the two polymorphisms together, we found that in the homozygous MAOB A allele the effect of COMT Met/Met genotype was increased to a difference of almost 8 years (p=0.001). Furthermore, the Met/Met individuals presented lower levels of motor complications of therapy evaluated by UPDRS IV - Met/Met 2.26+-2.42 and Val/Val+Val/Met 4.35+-3.5 (p=0.03). Our study suggests that COMT Val158Met polymorphism influence age at onset of PD symptoms and this effect is modulated by MAOB íntron 13 genotype.

Key words: Parkinson's disease; COMT; MAOB.

INTRODUCTION

Idiopathic Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder characterized by slowness of movements, rigidity and resting tremor. These symptoms are attributed to death of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway. However, the exact mechanism underlying this condition remains unknown and many different hypotheses have been proposed. The dopamine deficit is a constant in this disease and the mainstay pharmacological intervention is an increase in dopamine content. This neurotransmitter pathway has been extensively studied for its potential role in PD pathogenesis.

Catechol-o-methyltransferase (COMT) is one of the most important enzymes that degrades dopamine and has an effect on the metabolism of some drugs, like levodopa¹. Moreover, a pharmacological inhibitor of its activity is widely used as therapy in Parkinson's disease². These COMT inhibitors decrease levodopa degradation, stabilize its serological level and are used mainly for motor fluctuations control.

Since the 70s, an inherited interindividual variation in COMT activity was identified^{3, 4}. The COMT gene is located in 22q11 and has a G to A polymorphic transition, at position 158 at codon 4. This substitution determines a change of Val to Met in the protein sequence. This is a functional polymorphism and the Met allele determines two to four folds decrease in enzyme activity, in part due to thermal instability^{8, 9}.

Other polymorphisms were also investigated that could potentially influence COMT activity in the brain tissue, but the best predictor of enzyme activity seems to be the Val158Met polymorphism⁹. Recently, it was reported that haplotypes with SNPs at nucleotides 408 and 472 and a haplotype with a SNP at intron 2 explained additional significant variance in enzyme activity¹⁰. However, this study was conducted in liver tissue, not in the brain, and Val158Met was the unique polymorphism associated with thermal stability, along with a significant influence in enzyme activity. This individual difference provides an easy, efficient and rationale way to explore the influences of COMT in PD. It could affect the risk of disease, change the disease course or even modify drug responses.

The association between the Met/Met genotype and PD risk is conflicting. Two studies in Asian populations^{11,12} observed this association but this result was not replicated in several populations mainly of European descent¹³⁻¹⁷. Nevertheless, the Met

allele seems to increase disease risk in women and in younger subjects 18,19 . A recent study reported an association of four different polymorphisms in the COMT gene (rs6269, rs4633, rs4818, and rs4680) with Parkinson's disease risk using haplotype analyses 20.

The MAOB gene is located in the X chromosome and has a polymorphism in the intron 13. This is a transition of a A to G in 36bp before the 5' position of the exon 14 27. The allele A was associated with higher expression in human brain 28, but its enzymatic activity was lower when compared to the G allele in astrocytomas cell lines 29. As MAOB is mostly expressed in glial cells, it seems reasonable to think that the G allele function with a higher enzymatic activity in human brain. The association studies with this polymorphism in PD are also conflicting. One of these studies has shown an interaction effect between this MAOB polymorphism and COMT Val158Met 30. Another author found a relation between the A allele and the risk of early onset PD 31.

Investigations addressing the role of genetic variants involved in dopamine metabolism focused mainly on risk for developing PD. Few studies looked these variants as modifiers of the natural history of the disease. Our aim was to identify if the conflicting results in the literature could be due to a modifier effect of COMT and MAOB that could alter the natural history of this disorder and aggregate more concepts to understand the pathogenesis of PD.

METHODS

Patients

The sample for this investigation included patients from Porto Alegre, a Brazilian southern city, who were consecutively evaluated at the Movement Disorders Outpatient Clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The diagnosis of idiopathic Parkinson's disease is in accordance with UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria²¹. The inclusion criterion was age of onset of the symptoms after 45 years and the exclusion criteria were atypical manifestations and secondary parkinsonisms. The study was approved by the Hospital Ethics Committee and all patients gave written informed consent to participate in the study. These patients and their caregivers underwent a structured interview, when the age of disease onset was determined. The high reliability of age at onset information taking by patient or family members was assessed as described by Reider et al²². Clinical stage of the disease was evaluated according to the classification of Hoehn and Yahr and the clinical status was assessed by means of the Unified PD Rating Scale (UPDRS), Schwab & England Activities of Daily Living Scale and mini-mental state examination (MMSE). The information obtained was corroborated by caregivers and medical records.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by the salting out method²³. COMT Val158Met and MAOB íntron 13 genotyping were carried out by PCR and restriction enzyme digestion as previously described¹².

Statistical Analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using the goodness of fit chi-square test. Survival analysis of Kaplan-Meier was performed to compare the effect of each polymorphism on age at onset. The age at onset of symptoms was used, as time variable and there was no censored subject. Log Rank chi-square was used as the statistical test. The three COMT genotypes were analyzed together and with the exclusion of heterozygotes. The MAOB genotypes were analyzed excluding the female heterozygous and stratifying by sex. Our sample was also divided according the MAOB genotype, without female heterozygous, and the COMT effect in age at onset was assessed in the two

groups. The interaction between genotype and other clinical variables was tested using chi-square and ANOVA. Linear and logistic regression models were used to test the association of COMT genotype with other important variables (clinical information and scale's scores), controlling for disease duration or levodopa therapy duration. The analyses were conducted using SPSS version 14.0 software (SPSS Inc, Chicago, III). A significance level of 5% was set in all analyses. Tests were 2-tailed.

RESULTS

Clinical and demographical data of the investigated sample are shown in Table 1. A total of 123 patients were included in the study, 38 (30,9%) with Val/Val genotype, 60 (48,8%) with Val/Met, and 25 (20,3%) with Met/Met. Comparing age at onset, we found that patients with a Val/Val genotype have an earlier onset of the disease when compared to the Met/Met group: Val/Val 61.24 ± 2.8 and Met/Met 65.76 ± 4.214 $p=0.03$ (fig.1). No significant difference in age at onset was observed between the heterozygous patients when compared to both homozygous subjects. Although non significant, the heterozygous patients presented an intermediate age at onset between the two homozygous groups (fig.1).

A total of 122 patients were included in this study, 61 (50%). The genotype frequencies are depicted in table 1 and age at onset in different genotypes are in table 2. Regarding the COMT polymorphism, age at onset was earlier in the Val/Val genotype group when compared to Met/Met group: 60.16 ± 2.82 vs 64.54 ± 4.41 chi-square of log rank 4.7 and $p=0.03$. No significant difference in age at onset was observed between the heterozygous patients when compared to both homozygous subjects. Regarding the MAOB polymorphism, when excluding the heterozygotics females, we did not find a difference in age at onset between homozygotics. However, in male sample, the age at onset was earlier in the G hemizygotic group: 58.74 ± 3.4 vs 62.89 ± 3.09 chi-square of log rank 4.13 and $p=0.04$. Excluding the female heterozygous and stratifying our sample between the two MAOB genotypes, we observed that the COMT effect was stronger. In the MAOB A group, the age at onset was earlier in the Val/Val group comparing to the Val/Met and Met/Met group: 60.03 ± 2.58 vs 68.14 ± 6.32 chi-square of log rank 10.63 and $p=0.001$ (figure 1).

DISCUSSION

We demonstrated that homozygous patients for the low activity enzymatic form (Met/Met) have a later disease onset when compared to those homozygous for the high activity allele (Val/Val). Similar result was observed in male patients for the A allele of MAOB polymorphism. When analyzing the two polymorphisms, in the subgroup of patients with A allele (A for male and AA for female) the effect of the Met/Met polymorphism was increased from approximately 5 to 8 years. All previous studies investigated the effect of this polymorphism as a risk factor for Parkinson's disease and there are no work that assessed these variants as a modifier of the natural history of the disease. Regarding the age at onset, as far as we know, this is the first study that correlate it with these polymorphisms.

A reasonable explanation for the COMT result is that patients with the low activity genotype will degrade dopamine in a slower way, leading to an increase of this neurotransmitter content in the synaptic cleft for a given degree of neurodegeneration. With this same paradigm, if we consider the A allele of MAOB as a low activity enzymatic form, the same rationale could explain the observed effect. It is known that when the motor symptoms of PD started there is already an important reduction of dopaminergic neurons (probably more than 70% of dopaminergic cell death and 50-75% of reduction of striatal dopamine) 24-26. We suggest that patients with COMT Met/Met genotype (low COMT enzymatic activity) and MAOB G allele would have a potential lower dopamine metabolism that would delay motor symptoms appearance. When refining our sample, with the exclusion of the MAOB G genotype, we could demonstrate a stronger effect of the COMT Met/Met polymorphism, as if the MAOB effect would be diminished.

In conclusion, our study adds relevant new ideas regarding these polymorphisms in PD. By this way, we suggest that what we call idiopathic PD, indeed could be a concept with different disease subtypes. The exclusion of patients with less than 45 years old was an important thing in evaluating the most common form of the disease, since patients younger than this age have a greater chance to carry monogenic effects. Ideally, studies including other polymorphisms in COMT and MAOB gene should be performed, in order to delineate haplotypes with greater functional effect. Replication of the present findings in new studies with larger samples would be warranted. The approach for assess genetic effect as modulators of natural history of PD is rare, although this could

help to predict symptoms evolution, define disease subtypes based in genetic profile and design future therapeutic studies.

Author roles:

Artur Francisco Schumacher-Schuh: Research project (conception, organization, execution), statistical analyses, manuscript (writing of the first draft, review and critique).

Carlos Roberto de Mello Rieder: Research project (conception, organization), manuscript (review and critique).

Thais Lampert Monte: Research project (organization, execution), manuscript (review and critique).

Carolina Francisconi: Research project (execution), manuscript (review and critique).

Vivian Altmann: Research project (execution), manuscript (review and critique).

Mara Helena Hutz: Research project (conception, organization), manuscript (writing of the final version, review and critique).

Financial disclosures: Nothing to report.

References

1. Zhu BT. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 321-349.
2. Stocchi F, Tagliati M, Olanow CW. Treatment of levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 2008;23: Suppl 3 S599-612.
3. Weinshilboum RM, Raymond FA. Inheritance of low erythrocyte catechol-o-methyltransferase activity in man. *Am. J. Hum. Genet.* 1977; 29:125-135.
4. Floderus Y, Ross SB, Wetterberg L. Erythrocyte catechol-O- methyltransferase activity in a Swedish population. *Clin Genet* 1981;19:389-392.
5. Bertocci B, Miggianno V, Da Prada M, Dembic Z, Lahm HW, Malherbe P. Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane- associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 1416-1420.
6. Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 1994; 223: 1049-1059.
7. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, Taskinen J. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O- methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 1995; 34: 4202-4210.
8. Syvänen AC, Tilgmann C, Rinne J, Ulmanen I. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 65-71.
9. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet.* 2004;75: 807-821
10. Zhang J, Ji Y, Moon I, Pelleymounter LL, Ezequel Salavaggione O, Wu Y, Jenkins GD, Batzler AJ, Schaid DJ, Weinshilboum RM. Catechol O- methyltransferase pharmacogenomics: human liver genotype-phenotype correlation and proximal promoter studies. *Pharmacogenet. Genomics.* 2009;19: 577-587.
11. Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Otsuka E, Hattori M, Hoda F, Vallada HP, Arranz MJ, Collier DA. High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1997; 221: 202-204.

12. Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Lu SL, Shan DE, Ho YF, Chern HD. The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese. *Neurology*. 2001;56: 375-382.
13. Xie T, Ho SL, Li LS, Ma OC. G/A1947 polymorphism in catechol-O-methyltransferase (COMT) gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1997;12: 426-427.
14. Hernán MA, Checkoway H, O'Brien R, Costa-Mallen P, De Vivo I, Colditz GA, Hunter DJ, Kelsey KT, Ascherio A. MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD. *Neurology* 2002; 58: 1381-1387.
15. Hoda F, Nicholl D, Bennett P, Arranz M, Aitchison KJ, al-Chalabi A, Kunugi H, Vallada H, Leigh PN, Chaudhuri KR, Collier DA. No association between Parkinson's disease and low-activity alleles of catechol O-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 780-784.
16. Kalinderi K, Fidani L, Kourtesi G, Katsarou Z, Mioglou E, Bostantjopoulou S. No association of the Val158Met COMT polymorphism with Parkinson's disease in the Greek population. *Eur J Neurol*. 2008;15: e83.
17. Eerola J, Launes J, Hellström O, Tienari PJ. Apolipoprotein E (APOE), PARKIN and catechol-O-methyltransferase (COMT) genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in Finland. *Neurosci Lett* 2002; 330:296-298.
18. Goudreau JL, Maraganore DM, Farrer MJ, Lesnick TG, Singleton AB, Bower JH, Hardy JA, Rocca WA. Case-control study of dopamine transporter-1, monoamine oxidase-B, and catechol-O-methyl transferase polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17: 1305-1311.
19. Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan E, Drozdziak M. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18: 815-821
20. Bialecka M, Klodowska-Duda G, Honczarenko K, Gawrońska-Szklarz B, Opala G, Safranow K, Drozdziak M. Polymorphisms of catechol-O-methyltransferase (COMT), monoamine oxidase B (MAOB), N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in patients with early onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13: 224-229.
21. Daniel SE, Lees AJ. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *J Neural Transm Suppl*. 1993; 39:165-172.
22. Reider CR, Halter CA, Castelluccio PF, Oakes D, Nichols WC, Foroud T. Reliability of reported age at onset for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003;18: 275-279.
23. Lahiri DK, Nurnberger JJ, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444

24. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114: 2283-2301.
25. Hornykiewicz O. Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br. Med. Bull.* 1973; 29: 172-178.
26. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 1973; 20: 415-455.
27. Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1993;33(4):368-372.
28. Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Pettersson U, Jazin E. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum. Genet.* 2002;110(1):1-7.
29. Costa-Mallen P, Kelada SN, Costa LG, Checkoway H. Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene. *Neurosci. Lett.* 2005;383(1-2):171-175.
30. Bialecka M, Drożdżik M, Honczarenko K, et al. Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in a Polish population. *Eur. Neurol.* 2005;53(2):68-73.
31. Bialecka M, Klodowska-Duda G, Honczarenko K, et al. Polymorphisms of catechol-O-methyltransferase (COMT), monoamine oxidase B (MAOB), N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in patients with early onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2007;13(4):224-229.

Table and Figure legends

Table 1: COMT and MAOB genotype frequencies.

Table 2: age at onset of symptom.

Figure 1: Age at onset of PD symptoms. A) COMT 158 Val/Val genotype subjects have an earlier onset of the disease when compared to the Met/Met patients ($p=0.03$). B) No significant difference in age at onset was observed between the Val/Met heterozygous patients when compared to both homozygous subjects.

Figure 2: Kaplan-Meier curve for age at onset between MAOB-COMT A/AA-MetMet and A/AA-ValMet/ValVal.

COMT		MAOB		MAOB males		MAOB females	
<i>ValVal</i>	38(31,15%)	<i>GG</i>	38(31,15%)	<i>G</i>	23(37,7%)	<i>GG</i>	15(24,6%)
<i>ValMet</i>	58(47,54%)	<i>AG</i>	33(27,05%)	<i>A</i>	38(62,3%)	<i>AG</i>	33(54,1%)
<i>MetMet</i>	26(21,31%)	<i>AA</i>	51(41,8%)			<i>AA</i>	13(21,3%)

Table 1

COMT		Age at onset	p	COMT homozygous		Age at onset	p	COMT pooled		Age at onset	p
Val/Val	60,16+-2,82	0,08	Val/Val	60,16+-2,82	0,03	Val/Val/Val/Met	61,18+-1,77	0,04	Met/Met	64,54+-4,41	
Val/Met	61,85+-2,27		Met/Met	64,54+-4,41							
Met/Met	64,54+-4,41										
MAOB											
MAOB homozygous				MAOB homozygous/COMT pooled							
Male											
G	58,74+-3,4	0,04	G/GG	60,66+-2,69	0,21	G/GG; Val/Val/Val	61,34+-2,86	0,33	G/GG; Met/Met	57+-7,47	
A	62,89+-3,09		A/AA	62,25+-2,71							
Female											
GG	63,6+-4,07	0,31	A/AA; Val/Val/Val	60,03+-2,58	0,001						
AG	62,76+-3,47		A/AA; Met/Met	68,14+-6,32							
AA	60,39+-5,71										

Table 2

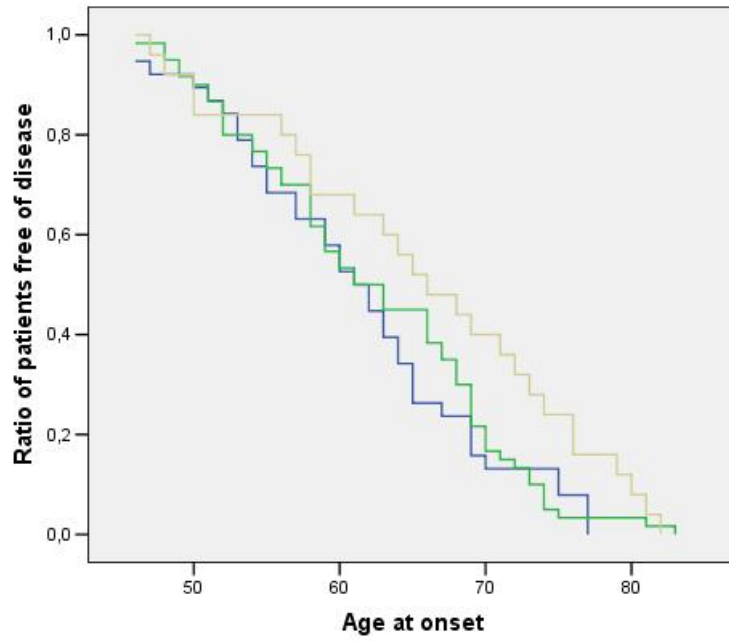
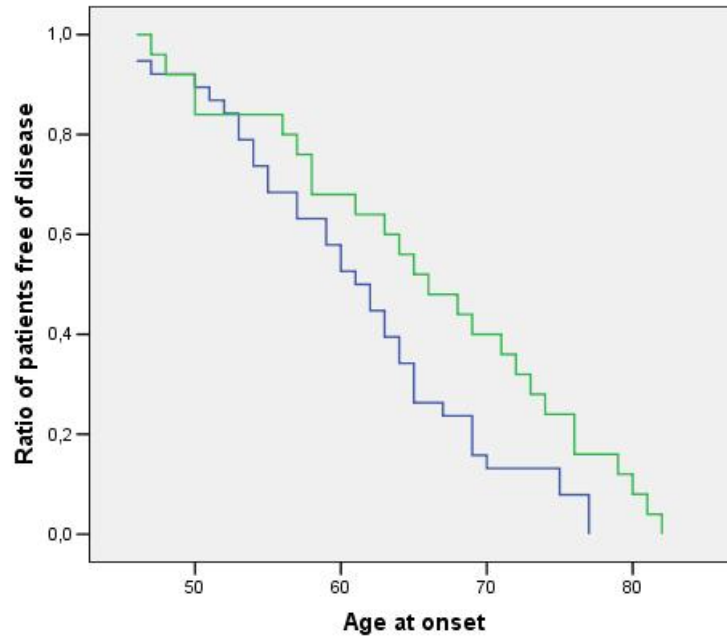


Figure 1

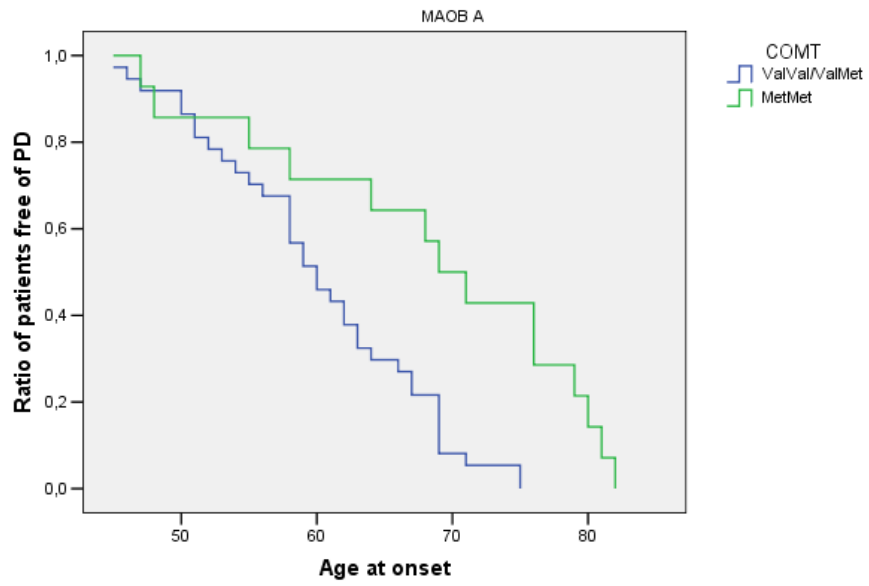


Figure 2

SEGUNDO ARTIGO

Dados preliminares

Effect of DAT, COMT and MAOB polymorphisms in levodopa induced chronic complications in Parkinson disease.

Artur Francisco Schumacher-Schuh^{1,2} MD, Thais L. Monte¹, MD, Carolina Francisconi¹, Vivian Altmann², Ana Rosso, Denise Nicaretta, João Pereira, Izabel Bastos, Marcia Pimentel, Cintia Santos-Rebouças, Mara H. Hutz, PhD^{2*}, Carlos R. M. Rieder¹ MD PhD.

1- Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

2- Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética,

Instituto de Biociências, UFRGS.

Caixa Postal 15053

91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3308-6720

FAX: 55-51-3308-7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs

Key words: Parkinson's disease; DAT polymorphism; pharmacogenetics.

Financial support: The research was supported by grants from “Financiadora de Estudos e Projetos” (FINEP 01.08.01230.00), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), and “Fundo de Incentivo à Pesquisa” (FIPE-HCPA).

Potential conflict of interest: Nothing to report .

Abstract: Since 60s, levodopa is the best option to control motor symptoms of Parkinson disease. However, with its chronic use, some patients will present complications, like motor fluctuation, dyskinesia and hallucination. Several risk factors were associated with appearance of these adverse effects, but the exact mechanism is still unknown. Studies of genetic polymorphisms with biological plausibility in genes associated with levodopa action, although rare, are essential to understand these phenomena in order to optimize pharmacological treatment. COMT and MAOB are enzymes responsible for dopamine degradation and DAT is the dopamine transporter with a major role in pre-synaptic recaptation of this neurotransmitter. Our aim was to assess the effect of the Val158Met COMT, intron 13 MAOB, VNTR 40bp DAT and -839C/T DAT polymorphisms on the occurrence of these chronic complications. Patients with idiopathic Parkinson disease with age at onset beyond 45 years old and in a minimal use of 200mg of levodopa per day were included. For COMT and MAOB polymorphisms, 122 patients were included and we found no major effect of these genetic variants in the occurrence of the adverse events. Regarding the -839C/T polymorphism, the genotype was available for 155 patients and the homozygotes for the C allele had a higher frequency of hallucination, when controlled for disease duration (OR 5,17 CI 95% 1,45-18,41 p=0,01). For the VNTR polymorphism, the genotype was available for 165 patients and we observed a result to be better explored: the equivalent dose of levodopa was lower in patients with the 9 copies allele (665,8mg±370 vs 763,31mg±441,3 p=0,042). We concluded that the DAT gene have an importance in pharmacogenetics of levodopa treatment in Parkinson disease. COMT Val158Met and MAOB intron 13 polymorphisms are unlikely associated with motor fluctuation, dyskinesia and hallucination, although studies with larger samples and more power are needed to definitely deny this association.

INTRODUCTION

Parkinson disease (PD) is the only neurodegenerative disorder that has a pharmacological therapy with dramatic effect. Levodopa leads to improved quality of life and decreased morbidity and mortality¹. However, the chronic use of this medication is associated with adverse events, like motor fluctuation dyskinesia and hallucination. In 5 years of treatment with levodopa, it is expected that 40-60% of patients will experience these complications².

Motor fluctuation is defined by a state where the medication effect goes away before the next dosage or disappear in a sudden and unpredictable manner³. Dyskinesia is defined by the presence of hyperkinetic movements that usually is associated with the plasma peak dose of levodopa, although it may occur in all periods of levodopa effect⁴. The most important risk factors for occurrence of these phenomena are disease duration, time of levodopa therapy, levodopa dosage and severity of the disease in beginning of treatment⁴. For visual hallucination, a third of patients in use of levodopa will present it along the disease duration, especially in advanced cases and with cognitive decline associated⁵. The pathophysiology of these events is not fully understood, but it seems to be due to levodopa pulsatile stimulation, leading to a plastic reorganization of the basal ganglia^{6,7}. Genetic variants could be associated with these complications and reasonable genes to explore are those involved in levodopa action.

DAT is one of the most important mechanisms to eliminate dopamine from the synaptic cleft, exerting a role in the suspension of this neurotransmitter effect⁸. Its gene is located at 5p15 chromosome and presents a lot of variability. The VNTR of 40bp of the 3' region is one of the most studied polymorphism. It seems that the higher number of the VNTR is associated with higher gene expression⁹. The 5' region of the DAT gene has a great effect in gene expression, with a number of different polymorphisms identified^{10,11}. The -839C/T is a SNP and the T allele introduce a site for the binding with a transcriptional inhibitor factor, suggesting that the T allele could be associated with less gene expression in comparing to the C allele¹².

The COMT and MAOB are the most important enzymatic degradation pathway of. Inhibitors of these two enzymes are used in clinical practice to alleviate the motor fluctuation developed after the used of levodopa. COMT gene has a functional polymorphism, Val158Met, that is widely studied in Parkinson disease and has a clear

effect in enzyme activity. It results from a transition of a G to A nucleotide at the position 158 at codon 4 that determines a change of Val to Met in the protein sequence. The Met/Met genotype determines a 3-4 fold decrease in enzyme activity, in part due to its thermal stability¹³. Other polymorphisms were also investigated that could potentially influence COMT activity in the brain tissue, but the best predictor of enzyme activity seems to be the Val158Met polymorphism. This difference provides an easy, efficient and rationale way to explore the influences of COMT in PD pharmacology response.

The MAOB gene is located in the X chromosome and has a polymorphism in the intron 13. This is a transition of a A to G in 36bp before the 5' position of the exon 14¹⁴. The allele A was associated with higher expression in human brain¹⁵, but its enzymatic activity was lower when compared to the G allele in astrocytomas cell lines¹⁶. As MAOB is mostly expressed in glial cells, it seems reasonable to think that the G allele function with a higher enzymatic activity in human brain.

The effect of common genetic variants in pharmacological variability is essential in order to delineate more personalized therapies and will be important in the designing of future clinical trials. Our aim was to evaluate the effect of the DAT, COMT and MAOB polymorphisms as determinants for levodopa induced chronic complications.

METHODS

Patients

Patients from Porto Alegre and Rio de Janeiro who were consecutively evaluated at the Movement Disorders Outpatient Clinics at University Hospitals were included. The diagnosis of idiopathic Parkinson's disease is in accordance with UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria¹⁷. The inclusion criteria was age of onset of 45 years or older and levodopa use of 200mg/day or more. The exclusion criteria were atypical manifestations and secondary parkinsonisms. The study was approved by the local Ethics Committee and all patients gave written informed consent to participate. These patients and their caregivers underwent a structured interview. Caregivers and medical records corroborated the information obtained. The presence of motor fluctuation was defined by the patient needed to take levodopa four times a day or more or if they are using concomitant medications to treat fluctuation (COMT or MAOB inhibitors or dopamine agonists). The presence of dyskinesia was defined by patient, caregiver or medical impression or if the patient was taking amantadine. The presence of hallucination was also defined by patient, caregiver or medical impression or if the patient was taking antipsychotics.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by the salting out method²³. DAT VNTR 40bp, DAT -839C/T, MAOB intron 13 and COMT Val158Met genotyping were carried out by PCR and restriction enzyme digestion as previously described¹².

Statistical Analyses

The association of motor fluctuation, dyskinesia and hallucination were assessed by logistic regression modeling, controlling for disease duration. The interaction between genotype and other clinical variables was tested using chi-square and ANOVA. The analyses were conducted using SPSS version 14.0 software (SPSS Inc, Chicago, III). A significance level of 5% was set in all analyses. Tests were 2-tailed.

RESULTS

For DAT -839C/T polymorphism, a total of 155 patients were included in this study (54.2% males). The genotype frequencies are depicted in table 2. The mean age was 71.02±8.75 and disease duration was 9.29±5.15 years. The frequency of motor fluctuation was 57.9%, dyskinesia was 38.2% and hallucination was 23.5%. The presence of the T/T genotype was more frequent in patients with hallucinations: OR 5,17 CI 95% 1,45-18,41 p=0,01. Clinical variables and the presence of motor fluctuation or dyskinesia were not different between the genotype groups, when controlling for disease duration (tables 3 and 5).

For DAT 3'UTR VNTR 40bp polymorphism, a total of 165 were included in this study (53.9%). The genotype frequencies are depicted in table 1. The mean age was 71.1±8.86 and disease duration was 9.45±5.25 years. The frequency of motor fluctuation was 58%, dyskinesia was 35.5% and hallucination was 23.9%. The equivalent dosage of levodopa required for motor control was lower in patients with the 9 copies allele: 665,8mg±370 vs 763,31mg±441,3 p=0,042. Clinical variables and the presence of motor fluctuation or dyskinesia were not different between the genotype groups, when controlling for disease duration (tables 4 and 5).

For COMT and MAOB polymorphisms, a total of 122 patients were included in this study (50% males). The genotype frequencies are depicted in table 1. The mean age was 70.77±8.76 and disease duration was 9.34±5.08 years. The frequency of motor fluctuation was 42.73%, dyskinesia was 38.46% and hallucination was 26.5%. Clinical variables and the complications were not different between the genotype groups, when controlling for disease duration (tables 3 and 5).

DISCUSSION

We demonstrated that the DAT -839C/T TT genotype was associated with more frequency of hallucination in a sample of idiopathic Parkinson disease without early age at onset subjects. Furthermore, the presence of the 9 allele of the DAT VNTR 40bp polymorphism was associated with lower dose of levodopa, a modest effect. We found no major impact of the COMT Val158Met and MAOB intron 13 polymorphism and the presence of chronic complications in a similar sample. This lack of association does not mean a lack of effect. Our sample are too small and do not have power to define this questions. Studies with larger samples would be required to confirm this impression. Almost all previous studies investigated the effect of these polymorphisms as a risk factor for Parkinson's disease and there are few work that assessed these variants with a pharmacogenetic approach.

For COMT Val158Met polymorphism, two studies using the levodopa challenge approach did not find association with the clinical pharmacological response parameters analyzed^{18,19}. Watanabe et al described a tendency without statistical significance for the low COMT activity genotype and the presence of fluctuation or dyskinesia²⁰. Bialecka et al observed that the frequency of low COMT activity genotype was higher between patients using less than 500mg of levodopa per day at the 5th year of treatment²¹. The same author, with four polymorphisms in this gene, shows an association between less levodopa dosage and a haplotype of lower activity²². For MAOB genotype, just Bialecka et al, previously cited, showed an association of A genotype with the of less than 500mg per day in the 5th year of treatment. This study raised the hypotheses, not confirmed in our study, that patients with these polymorphisms, for using less levodopa, would have less motor complication

Although we used different methodology, our results are in accordance of the Contin and Lee reports^{19,18}. They defined the presence of motor fluctuation and dyskinesia by consecutive examination of the patient after a levodopa dosage. This method is more objective but could failed in capture the presence of complications, because these phenomenon could vary in the same patient.

For DAT gene, the VNTR polymorphism, as far as we known, was assessed just in two studies. First, Contin, with the levodopa challenge approach and in accordance with our results, did not find any association between the presence of the 9 allele and the

homozygous for 10 allele and the presence of motor fluctuation or dyskinesia²³. Kaiser observed a positive association between the 9 allele and the presence of psychosis or dyskinesia. Although we did not find these results, it could suggest a role for DAT gene in the occurrence of psychosis and/or hallucination²⁴. If we consider that the higher number of repetitions is associated with high gene expression, our findings regarding the dose could be explained by the fact that patients with 9 copies could express less DAT and, consequently, reabsorbing less dopamine with less levodopa dose needed.

Regarding the effect of DAT -839C/T polymorphism and hallucination, the studies point to less gene expression for the T allele¹². Considering that the hallucination could be a state with more dopaminergic stimulation, patients homozygous for T would have less gene expression comparing with those with C allele, explaining our findings of higher presence of hallucination in the later group.

Our study has some limitations. First, the definition used in our work for the complications were too generic and could not capture the really nature of the phenomenon. We know that the motor fluctuation and dyskinesia could be subdivided in several different types and these subdivisions could be different in relation of pathophysiological process and genetics risks. Second, it will be preferable to have studies with prospective designs for determine the exact moment of the complication appearance and correlate this time with the genotype. And third, a single polymorphism, although with well established functionality as for COMT Val158Met, could not be sufficient to demonstrate small effects. For example, in the COMT gene a haplotype with four different SNPs seems to correlate better with the enzyme activity. For MAOB and DAT this same strategy could be more effective also. So, studies with haplotype analysis would be recommended.

In conclusion, our study add relevant new ideas regarding these polymorphisms in the response of levodopa in the most common form of Parkinson disease. Replication of the present findings in new studies with larger samples would be warranted. The approach for assess genetic effect pharmacological response in Parkinson disease is rare, although this could help to predict the best drug dosage, select appropriate patients based in their profile risk for complications of therapy and design future therapeutic studies and strategies.

REFERENCES

1. Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*. 2009;72(21 Suppl 4):S1-136.
2. Ahlskog JE, Muenter MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 2001;16(3):448-458.
3. Fox SH, Lang AE. Levodopa-related motor complications--phenomenology. *Mov. Disord.* 2008;23 Suppl 3:S509-514.
4. Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain*. 2000;123 (Pt 11):2297-2305.
5. Celesia GG, Barr AN. Psychosis and other psychiatric manifestations of levodopa therapy. *Arch. Neurol.* 1970;23(3):193-200.
6. Nutt JG, Carter JH, Lea ES, Sexton GJ. Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy. *Ann. Neurol.* 2002;51(6):686-693.
7. Nutt JG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa. *Mov. Disord.* 2008;23 Suppl 3:S580-584.
8. Uhl GR. Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. *Mov. Disord.* 2003;18 Suppl 7:S71-80.
9. Heinz A, Goldman D, Jones DW, et al. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(2):133-139.
10. Greenwood TA, Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics*. 2003;82(5):511-520.
11. Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, et al. Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet. Genomics*. 2005;15(9):659-668.
12. Rubie C, Schmidt F, Knapp M, et al. The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci. Lett.* 2001;297(2):125-128.
13. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, et al. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996;6(3):243-250.
14. Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1993;33(4):368-372.

15. Balciuniene J, Emilsson L, Oreland L, Pettersson U, Jazin E. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum. Genet.* 2002;110(1):1-7.
16. Costa-Mallen P, Kelada SN, Costa LG, Checkoway H. Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene. *Neurosci. Lett.* 2005;383(1-2):171-175.
17. 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. Psychiatr.* 1992;55(3):181-184.
18. Lee MS, Lyoo CH, Ulmanen I, Syvänen AC, Rinne JO. Genotypes of catechol-O-methyltransferase and response to levodopa treatment in patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2001;298(2):131-134.
19. Contin M, Martinelli P, Mochi M, et al. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2005;20(6):734-739.
20. Watanabe M, Harada S, Nakamura T, et al. Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease. *Neuropsychobiology.* 2003;48(4):190-193.
21. Białecka M, Drożdżik M, Klodowska-Duda G, et al. 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.* 2004;110(4):260-266.
22. Białecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, et al. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenet. Genomics.* 2008;18(9):815-821.
23. Contin M, Martinelli P, Mochi M, et al. Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol.* 2004;27(3):111-115.
24. Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, et al. L -dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology.* 2003;60(11):1750-1755.

Table and Figure legends

Table 1: MAOB and COMT genotypes frequencies.

Table2: DAT genotypes frequencies.

Table 3: Clinical characterization of COMT and MAOB sample.

Table 4: Clinical characterization of DAT sample.

Table 5: chronic levodopa adverse events distribution between COMT, MAOB and DAT genotypes.

*difference between homozygous.

**difference between DAT -839C/T TT genotype against pooled CT and CC.

COMT		MAOB		MAOB males		MAOB females	
<i>ValVal</i>	38(31,15%)	<i>GG</i>	38(31,15%)	<i>G</i>	23(37,7%)	<i>GG</i>	15(24,6%)
<i>ValMet</i>	58(47,54%)	<i>AG</i>	33(27,05%)	<i>A</i>	38(62,3%)	<i>AG</i>	33(54,1%)
<i>MetMet</i>	26(21,31%)	<i>AA</i>	51(41,8%)			<i>AA</i>	13(21,3%)

Table 1

DAT VNTR		DAT -839C/T	
<i>10111</i>	3(1,8%)	<i>CC</i>	38(24,5%)
<i>10110</i>	83(50%)	<i>CT</i>	73(47,1%)
<i>9110</i>	63(38%)	<i>TT</i>	44(28,4%)
<i>919</i>	12(7,2%)		
<i>6110</i>	1(0,6%)		
<i>619</i>	1(0,6%)		
<i>3110</i>	2(1,2%)		
<i>8110</i>	1(0,6%)		

Table 2

	COMT				MAO-B males			MAO-B females			
	All 61(50%)	HH 17(44.7%)	HL 32(55.2%)	LL 12(46.2%)	G *	A *	p	GG *	AG *	AA *	p
Males											
Age	70.77±8.76	68.71±8.99	71±8.43	73.27±8.76	68.26±8.41	72.66±8.35	0.05	72±7.6	70.33±9.08	69.38±10.69	0.74
Age at onset	61.89±9.5	60.16±8.86	61.84±8.82	64.54±11.46	58.74±8.31	62.89±9.71	0.09	63.6±8.05	62.76±10.17	60.38±10.51	0.67
Disease duration	9.34±5.08	8.4±4.95	9.25±4.88	8.96±5.47	9.41±5.09	9.75±4.18	0.78	8.36±6.18	9.15±6.41	7.81±4.68	0.76
Levodopa equivalent dosage	856.36±462.08	855±516.89	754.52±340.39	809.78±476.97	879±568.36	875.88±465.75	0.98	900.15±407.04	708.09±345.83	626.63±240.73	0.05

Table 3

	DAT VNTTR				DAT -839C/T				
	All (n=217)	9 allele present	9 allele absent	p	All (155)	CC	CT	TT	p
Males	122(56.2%)	44(57.9%)	45(50.6%)	0.4	84(54.2%)	20(52.6%)	41(56.2%)	23(52.3%)	0.93
Age at onset	60.64+9.8	62.05+8.99	60.62+10.64	0.26	61.37+9.81	59.82+10.95	61.37+9.9	62.73+8.56	0.44
Disease duration	9.21+5.1	9.71+5.36	9.22+5.16	0.15	9.29+5.15	9.45+5.18	9.42+5.06	8.93+5.39	0.62
Levodopa equivalent dosage	702.28+397.27	665.8+370.09	763.31+441.32	0.04	716.56+407.9	756.18+492.38	731.5+401.7	657.52+334.34	0.42

Table 4

	Motor Fluctuation		P	OR (95% CI)	Dyskinesia		P	OR (95% CI)	Hallucination		P	OR (95% CI)
	Present	Absent			Present	Absent			Present	Absent		
COMT	(n=50)	(n=67)			(n=45)	(n=72)			(n=31)	(n=86)		
HH	25	11	0.89*	1.07(0.41-2.81)	17	20	0.21*	1.71(0.73-3.96)	8	29	0.4*	0.67(0.27-1.7)
HL	15	42			19	37			20	37		
LL	10	14			9	15			3	20		
MAOB male	(n=43)	(n=15)			(n=20)	(n=38)			(n=18)	(n=40)		
G	18	5	0.12	3.54(0.71-17.67)	9	14	0.28	1.98(0.58-6.78)	6	17	0.49	0.66(0.2-2.17)
A	25	10			11	24			12	23		1.51(0.46-4.97)
MAOB female	(n=38)	(n=21)			(n=25)	(n=34)			(n=13)	(n=46)		
GG	8	6	0.23*	0.38(0.08-1.81)	9	5	0.07*	3.48(0.92-13.14)	5	8	0.32*	0.42(0.07-2.38)
AG	20	11			10	21			5	26		
AA	10	4			6	8			2	12		
DATVNT	(n=87)	(n=63)			(n=42)	(n=67)			(n=36)	(n=119)		
9 absent	46	33	0.99	0.95(0.46-1.94)	22	40	0.54	1.29(0.57-2.88)	18	63	0.62	1.22(0.56-2.62)
9 present	41	30			20	27			18	52		
DAT-839C/T	(n=88)	(n=64)			(n=42)	(n=68)			(n=36)	(n=117)		
CC	21	17	0.6**	1.24(0.55-2.81)	10	17	0.74**	1.17(0.46-2.98)	3	35	0.01**	5.17(1.45-18.41)
CT	44	27			21	33			26	46		
TT	23	20			11	18			7	36		

Table 5

Considerações finais

A fisiopatologia da doença de Parkinson insere-se no conceito de herança complexa ou multifatorial. Esse tipo de herança é estudada pela Genética Quantitativa, que difere da Genética Clássica no ponto em que esta se preocupa com o efeito de um genótipo específico causando um fenótipo claramente distinguível, com pouca influência de outros genes ou mesmo de fatores ambientais, e aquela se propõe a analisar a contribuição relativa de múltiplos genes interagindo com fatores ambientais para a geração de um fenótipo específico. Estudos de herança complexa são recentes e foram impulsionados pelas modernas técnicas de biologia molecular, que possibilitaram explorar a intimidade do genoma e sua relação com o ambiente.

Nesse modelo, onde se inserem a maioria das doenças neurodegenerativas e desordens comuns, como diabetes melito e hipertensão arterial sistêmica, é imperativo investigar a associação entre variações genéticas com plausibilidade biológica e fenótipos clínicos. Os resultados desta dissertação, além de achados farmacogenéticos, podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença de Parkinson idiopática, uma vez que correlacionaram polimorfismos específicos com a idade de início dos sintomas. Reveste-se de especial importância este achado se considerarmos as recentes pesquisas que demonstram que os mecanismos fisiopatológicos e as manifestações clínicas da doença podem variar muito de acordo com a idade de início. Em relação à fisiopatologia, como já discutido anteriormente, sabe-se que cerca de 50% dos casos que iniciam antes dos 45 anos apresentam como causa a mutação em um único gene, valor que cai para 2-3% dos casos que iniciam após os 45 anos. Já o estudo de parkinsonianos que iniciam após os 60 anos também tem revelado peculiaridades em termos de riscos específicos, manifestações clínicas, resposta farmacológica e evolução. Os pacientes idosos, por exemplo, apresentam

menor chance de apresentarem complicações do uso da medicação, quiçá devido a sua menor plasticidade neuronal, e a evolução da doença costuma dar-se de maneira mais acelerada (dados já expostos ao longo da dissertação).

Tendo em mente essas considerações sobre a idade de início, torna-se mais interessante examinar os achados desta dissertação. Encontramos que o polimorfismo Val158Met do gene da COMT, com funcionalidade indiscutível, determina impacto sobre o início dos sintomas motores da doença de Parkinson. Os pacientes homozigotos para o alelo lento (LL), com cerca de 3-4 vezes menor atividade enzimática, apresentaram idade de início cerca de 5 anos mais tarde quando comparados com os pacientes com genótipos HL e HH. Uma interpretação racional para esse resultado seria a de que os pacientes com genótipo lento, por degradarem menos dopamina, apresentariam os sintomas da doença em uma fase mais tardia em relação àqueles que degradam mais dopamina através da COMT. Algo análogo a um paciente hipotético que em uma fase pré-clínica fizesse uso de um inibidor da COMT. Este interessante efeito tornou-se mais forte entre aqueles pacientes homozigotos para o alelo A do polimorfismo do íntron A da MAO-B, com a diferença passando de 5 para 8 anos e com aumento da significância estatística. Se considerarmos que este alelo da MAO-B associa-se com menor atividade enzimática, podemos considerar que nesses pacientes o efeito específico da atividade da COMT pode ser magnificado, como se tivéssemos abolido o efeito da atividade enzimática da MAO-B.

Examinando o mesmo desfecho, só que associando ao polimorfismo da MAO-B, observamos um efeito discreto: homens hemizigotos para o alelo G apresentavam idade de início precoce em relação aos com alelo A. Há maior debate acerca do significado funcional deste polimorfismo da MAO-B. Encontrou-se maior expressão desta enzima em cérebro de humanos para o alelo A, mas a atividade enzimática em células de astrocitoma e

em plaquetas foi maior para o alelo G. Assim, tendo em vista sua localização preferencialmente glial, parece mais plausível a hipótese de que o alelo G esteja associado à maior atividade em contexto clínico. Da mesma forma que para a COMT, o polimorfismo da MAO-B que determina maior atividade enzimática degrada mais dopamina e determina início de sintomas precocemente.

Ainda em relação aos polimorfismos nos genes da COMT e da MAO-B, nosso trabalho não demonstrou evidência de que essas variantes polimórficas possam estar envolvidas na gênese da flutuação motora, discinesia e alucinação e nem de que estão influenciando a dose ótima para o controle dos sintomas motores. Contudo, essa falta de associação só poderá ser firmada com estudos de maior poder estatístico. Apesar disso, através do escore da UPDRS-IV (parte da escala UPDRS que avalia complicação da terapia; quanto maior a pontuação mais complicação o paciente apresenta) constatamos que os pacientes homozigotos para o alelo lento da COMT (LL) apresentavam menor pontuação quando comparados àqueles com genótipos HL e HH. Analisando cada um dos subítens que compõem esta escala, observamos que esse efeito deve-se particularmente à questão 39, que avalia flutuação motora (tempo de “off” durante o dia; ver escala em anexo). Trata-se de um achado inicial, que necessita de confirmação por outros estudos com metodologias mais específicas, como o desafio com levodopa, por exemplo. Entretanto, podemos sugerir que os pacientes com atividade enzimática lenta podem se beneficiar de tratamento mais precoce com levodopa, com menor risco de desenvolvimento de flutuação da resposta motora.

Estudando os polimorfismos do DAT, transportador de dopamina que apresenta papel fundamental na patogenia do Parkinson induzido por MPTP e que é o grande responsável pelo término da ação da dopamina na fenda sináptica, encontramos associação

com a presença de alucinação e com a dose de levodopa. Pacientes homozigotos para o alelo C do polimorfismo -839C/T da região promotora 5' apresentam mais alucinações visuais quando comparados com os pacientes portadores do alelo T, determinando um OR 5,17 com IC de 95% 1,45-18,41 e $p=0,01$. Essa é a primeira associação de um polimorfismo da região promotora 5' do DAT com aspectos farmacogenéticos da doença de Parkinson e o estudo de outros alelos desta região pode trazer outros achados interessantes. Acredita-se que os pacientes homozigotos para o alelo C apresentam maior expressão do transportador, o que poderia estar influenciando a ocorrência de alucinação. Pacientes portadores do alelo de 9 repetições do VNTR da região 3' não traduzida do DAT fazem uso de menor dose de levodopa, cerca de 100mg de diferença, com $p=0,042$. Foi um efeito pequeno, que necessita de outros estudos para confirmar essa associação. Entretanto, apresenta plausibilidade biológica se considerarmos que alelos de mais repetições determinam maior expressão do transportador, com maior recaptação pré-sináptica da dopamina.

Dentro do universo das desordens neurodegenerativas, a doença de Parkinson pode ser considerada como privilegiada, por ser a única com tratamento sintomático eficaz. A terapia dopaminérgica, que surgiu com a levodopa, foi um grande salto no sentido de melhorar a funcionalidade e a qualidade de vida e diminuir a mortalidade dos pacientes parkinsonianos. Porém, como não há nada como um simples milagre, seu uso prolongado pode trazer complicações que limitam a qualidade de vida dos pacientes e cujo manejo requer atendimento especializado e uso de outros fármacos de alto custo. Nesse sentido, nosso trabalho procurou entender parte da variabilidade da resposta farmacológica à levodopa, a fim de acumular conhecimento para que se possa chegar a um dia em que o momento da prescrição e a dose de levodopa necessária possam ser determinados por

critérios mais específicos, como uma avaliação genética. Dessa forma, diminuindo a incidência das complicações da terapia, melhorando a qualidade de vida e otimizando custos da terapêutica.

ANEXOS

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
SERVIÇO DE NEUROLOGIA
GRUPO DE DISTÚRBIOS DO MOVIMENTO
Farmacogenética da Levodopa na Doença de Parkinson
Protocolo de Avaliação

Número identificador:

Examinador:

Presença de acompanhante: 0. Não 1. Cuidador 2. Parente 3. Outro

***Orientações ao examinador:** antes de aplicar este protocolo, obtenha o Termo de Consentimento Informado e certifique-se de que o paciente preenche os critérios de inclusão e exclusão. Todos os campos abaixo devem ser preenchidos, com um círculo ao redor do número correspondente. Caso algum dos itens não se aplique ao paciente, deve ser marcado com a sigla NA (não aplicável). As escalas em anexo também devem ser obrigatoriamente preenchidas. Os dados devem ser coletados, preferencialmente, através de entrevista com o paciente e o seu cuidador. Pode-se conferir algumas informações no prontuário do paciente.*

DADOS PESSOAIS

NOME:

PRONTUÁRIO HCPA:

DATA DA COLETA DE SANGUE:

DATA DA APLICAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO:

DATA DE NASCIMENTO:

SEXO: F M

ESCOLARIDADE (ANOS):

COR: branca negra mulato outra:

ESTADO CIVIL: solteiro casado viúvo

divorciado

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Críticos de inclusão:

- Pacientes com doença de Parkinson idiopática, diagnosticada de acordo com os critérios de Gelb, que estejam em atendimento no Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e que concordem em participar do estudo (assinando o termo de consentimento informado).
- Pacientes em uso de levodopa/benserazida ou levodopa/carbidopa por tempo mínimo de dois anos e com resposta inicial favorável à droga.
- Pacientes com idade de início dos sintomas parkinsonianos acima dos 45 anos.
- Pacientes com tempo de doença entre 3 e 15 anos.

Críticos de exclusão:

- Síndromes Parkinson-plus.
- Manifestações atípicas da doença.

DADOS DA HISTÓRIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Ano de início dos sintomas:

Tempo total de doença (anos):

O primeiro sintoma percebido foi:

1. Tremor 2. Rigidez 3. Bradicinesia 4. Instabilidade Postural 9. Não lembra

A localização do sintoma no início da doença era no:

1. MSD 2. MSE 3. MID 4. MIE 5. hemicorpo E 6. hemicorpo D
7. generalizado/simétrico 9. Não lembra

Que medicamentos já usou anteriormente a levodopa:

0. Nunca tratou 1. Anticolinérgicos 2. Amantadina
3. Selegiline/rasagilina 4. Agonistas dopaminérgico: qual? _____
5. Outros

A resposta inicial ao tratamento com levodopa foi:

1. Melhora total
2. Melhora significativa porém parcial dos sintomas
3. Somente algum grau de melhora parcial dos sintomas
4. Sem melhora
8. Não aplicável (não usou)

Qual a dose diária inicial usada de levodopa?

Tabagismo atual: 1. não 2. sim: ___anos.

Tabagismo no passado: 1.não 2.sim:___anos.

ESQUEMA TERAPÊUTICO ATUAL

Há quanto tempo o paciente encontra-se em uso de levodopa?

0. Não usa levodopa
1. ___meses/ ___anos

Qual a dose diária atual usada de levodopa?

Que medicamentos para a Doença de Parkinson está usando?

	MEDICAMENTO	DOSE DIARIA	INTERVALO DE DOSE
1.	_____	_____	

2.	_____	_____	

3.	_____	_____	

4.	_____	_____	

5.	_____	_____	

Qual é a resposta motora ao atual esquema terapêutico?

1. Melhora Total
2. Melhora significativa porém parcial dos sintomas
4. Sem resposta
3. Somente algum grau de melhora parcial dos sintomas
8. Não se aplica (não esta em tratamento medicamentoso)

O paciente apresenta algum efeito colateral da medicação?

0. Não apresenta
1. Sim. Especifique:

Que outros medicamentos está usando?

	NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1.	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____	_____

COMORBIDADES E HISTÓRIA FAMILIAR

Existe na história algum fator mórbido que possa ser relevante para a doença atual (ex: exposição a produtos tóxicos, uso de qualquer medicamento implicado como causa de parkinsonismo etc)?

1. Sim: qual _____ 2. Não _____

Na família do paciente alguém tem o diagnóstico da doença de Parkinson?

1. Sim: quem _____ 2. Não _____

Anote outras doenças que o paciente tenha:

Diagnóstico	Data
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____

COMPLICAÇÕES MOTORAS

O paciente apresenta fenômeno de “wearing off” (encurtamento da duração do efeito da levodopa; perda do efeito antes da próxima dose; utiliza pelo menos quatro tomadas diárias; uma hora e meia diárias de período “off”, excluindo o “off” matinal) ?

0. Não 1. Sim, há _____ anos/ _____ meses.

O paciente apresenta fenômeno de “on-off” (interrupção súbita da ação da levodopa)?

0. Não 1. Sim, há _____ anos/ _____ meses.

O paciente apresenta episódios de “congelamento” ?

0. Não 1. Sim, há _____ anos/ _____ meses.

O paciente apresenta discinesias?

0. Não 1. Sim, pico de dose, há _____ anos/ _____ meses.
2. Sim, bifásica, há _____ anos/ _____ meses 3. Sim, combinação dos dois anteriores, há _____ anos/ _____ meses

O paciente apresentava distonias antes do início do tratamento?

0. Não 1. Sim

O paciente apresenta distonias no momento?

0. Não 1. Sim, localização:

MANIFESTAÇÕES SECUNDÁRIAS

O paciente apresenta alucinações e/ou delírios? 1. Sim 2. Não

O paciente sente-se deprimido? 1. Sim 2. Não

O paciente sente-se ansioso? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta insônia? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta perturbações na fala? 1. Sim 2. Não

O paciente tem episódios de disfagia? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta sialorréia? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta constipação? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta alterações urinárias? 1. Sim: que tipo? _____ 2. Não

O paciente apresenta câimbras? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta redução da libido e/ou impotência? 1. Sim 2. Não 8. Não se aplica

O paciente refere episódios de síncope? 1. Sim 2. Não

O paciente apresenta dor? 1. Sim. Especifique: _____ 2. Não

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, Thaís Monte, Carolina Francisconi, 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 frequentemente 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 20__.

Ass: _____

() paciente () familiar responsável – nome: _____

ESCALA UNIFICADA PARA AVALIAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

I. Cognição, Comportamento e Humor

1. Prejuízo Intelectual

0. Nenhum

1. Leve. Consistente perda de memória, com lembrança parcial dos eventos e sem outras dificuldades.
2. Moderada perda de memória, com desorientação e dificuldade moderada para resolver problemas complexos. Leve mas definitivo prejuízo na realização das tarefas domésticas, necessitando ajuda ocasionalmente.
3. Perda severa de memória com desorientação no tempo e freqüentemente no espaço. Total prejuízo na resolução de problemas.
4. Total perda de memória com orientação preservada somente para pessoa. Incapaz de realizar julgamentos ou solucionar problemas. Necessita muito auxílio nos cuidados pessoais. Não pode sair sem acompanhante.

2. Alteração do Pensamento

0. Não

1. Sonhos vívidos / sonhando acordado
2. Alucinações "benignas" com "insight"/ discernimento retido.
3. Alucinações ou ilusões ocasionais ou freqüentes, sem "insight", podendo interferir com as atividades diárias.
4. Alucinações persistentes, ilusões ou psicoses elaboradas. Inabilidade para cuidar de si mesmo.

3. Depressão

0. Ausente

1. Períodos de tristeza ou culpa maior que o normal, nunca persiste por dias ou semanas.
2. Depressão persistente (uma semana ou mais)
3. Depressão persistente com sintomas vegetativos (insônia, anorexia, perda de peso e perda de interesse)
4. Depressão persistente com sintomas vegetativos e pensamentos suicidas.

4. Motivação/ Iniciativa

0. Normal

1. Perda do interesse maior que o usual; mais passivo.
2. Perda da iniciativa ou desinteresse em atividades eletivas (fora da rotina).
3. Perda de iniciativa ou desinteresse em atividades do dia-a-dia (rotineiras).
4. Retraído/ Isolacionismo, completa perda da motivação.

II. Atividades da vida diária

5. Fala

0. Normal.

1. Levemente afetada. Sendo compreendido sem dificuldade.
2. Moderadamente afetada. Às vezes pedindo para repetir as declarações para que sejam compreendidas.
3. Severamente afetada. Freqüentemente pedindo para repetir as declarações para que sejam compreendidas.
4. Ininteligíveis na maior parte do tempo.

6. Salivação

0. Normal

1. Leve mas definido excesso de saliva na língua; podendo "babar"

durante o sono

2. Moderado excesso de saliva; podendo "babar" um pouco.
3. Marcado excesso de saliva com alguma "baba".
4. "Babando" muito, necessitando constantemente de lenço ou toalha.

7. Ao engolir

0. Normalmente
1. Se afogando raramente.
2. Ocasionalmente se afogando.
3. Necessitando alimento macios.
4. Necessitando de Sonda NG ou Gastrostomia para alimentar-se.

8. Caligrafia

0. Normal
1. Um pouco vagarosa e caligrafia reduzida de tamanho.
2. Moderadamente lenta com caligrafia reduzida de tamanho, todas as palavras são legíveis.
3. Severamente afetada; nem todas as palavras são legíveis.
4. A maioria das palavras não são legíveis.

9. Ao cortar alimentos e manusear utensílios

0. Normal
1. Um tanto quanto vagaroso ou desajeitado, mas sem necessitar de auxílio.
2. Pode cortar a maior parte da comida, de modo vagaroso e desajeitado; algumas vezes necessitando de auxílio.
3. Comida tem que ser cortada por alguém, mas pode alimentar-se lentamente.
4. Necessita ser alimentado.

10. Ao trocar de roupa

0. Normalmente
1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Ocasionalmente auxiliado com botões, coloca os braços nas mangas.
3. Muita necessidade de auxílio, podendo fazer algumas coisas sozinho.
4. Necessita ser vestido.

11. Higiene pessoal

0. Normal.
1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Necessita auxílio para tomar banho; ou muito vagaroso nos cuidados de higiene.
3. Requer ajuda para escovar os dentes, tomar banho, pentear os cabelos, indo ao banheiro.
4. Cateter de Foley ou outros auxílios mecânicos.

12. Ao trocar de posição na cama e arrumar os lençóis

0. Normal.
1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Vira-se na cama e ajusta os lençóis sozinho, mas tem grande dificuldade
3. É capaz de iniciar a tentar, mas não se vira ou ajusta os lençóis sozinho.
4. Não consegue executar, realizado por outra pessoa.

13. Quedas [não relacionadas ao "congelamento"]

0. Nunca.
1. Raramente tem quedas.
2. Ocasionalmente cai, menos de uma vez por dia.
3. Quedas cerca de uma vez por dia.

4. Quedas mais que uma vez por dia.

14. "Congelamento" quando caminha

0. Nunca.

1. Raramente ocorre "congelamento" quando caminha; pode ter hesitação inicial.
2. Ocasionalmente ocorre "congelamento" quando caminha.
3. Frequentemente ocorre "congelamento". Ocasionalmente cai por "congelamento"
4. Frequentemente cai por "congelamento".

15. Marcha

0. Normal.

1. Dificuldade leve. Pode não balançar os braços ou pode tender a arrastar as pernas (marcha arrastada).
2. Dificuldade moderada, mas requer pouca ou nenhuma assistência
3. Distúrbio severo da marcha, necessitando de auxílio.
4. Não pode caminhar, mesmo com auxílio.

16. Tremor

0. Ausente.

1. Leve e raramente presente
2. Moderado; aborrecendo o paciente.
3. Severo; interferindo com muitas atividades.
4. Marcado; interferindo com a maioria das atividades.

17. Sintomas sensoriais relacionados ao Parkinsonismo

0. Ausente.

1. As vezes tem amortecimentos, formigamentos, ou dor leve
2. Frequentemente tem amortecimentos, formigamento ou dor; sem produzir estresse.
3. Frequentemente tem sensações dolorosas.
4. Dor excruciante.

III. Exame Motor

18. Fala

0. Normal.

1. Leve perda da expressão, dicção e/ou volume.
2. Monótona, inarticulada mas compreensível; moderadamente prejudicada.
3. Marcadamente prejudicada, difícil de compreender.
4. Ininteligível.

19. Expressão Facial

0. Normal.

1. Mínima hipomímia, podendo ser "face de pôquer".
2. Leve mas definida diminuição anormal da expressão facial.
3. Moderada hipomímia; lábios separados algumas vezes.
4. Facies em máscara ou fixa com severa ou completa perda da expressão facial; lábios separados mais de 0.5 cm.

20. Tremor de repouso

0. Ausente.

1. Leve e raramente presente.
2. Leve em amplitude e persistente. Ou moderado na amplitude, mas somente intermitentemente presente.
3. Moderada amplitude e presente a maior parte do tempo.
4. Marcada amplitude e presente a maior parte do tempo.

Face, lábios e queixo:

Mão direita:
Mão esquerda:
Pé direito:
Pé esquerdo:

21. Tremor postural e de ação das mãos

0. Ausente.
1. Leve, presente com a ação.
2. Moderado em amplitude, presente com a ação.
3. Moderado em amplitude, postural e de ação.
4. Marcado em amplitude, interferindo com a alimentação.

Direita:
Esquerda:

22. Rigidez [*movimento passivo das articulações maiores com o paciente relaxado em posição sentada, ignore a roda dentada*]

0. Ausente
1. Leve ou detectável só quando ativado por outros movimentos.
2. Leve a moderada.
3. Marcada, mas total extensão de movimentos obtida facilmente.
4. Severa, total extensão de movimentos obtida com dificuldade.

Pescoço:
Superior direita:
Superior esquerda:
Inferior direita:
Inferior esquerda:

23. "Finger Taps" [*paciente bate o polegar com o dedo indicador em rápida sucessão com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal
1. Um tanto quanto lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço definido e inicial. Pode apresentar pausas ocasionais durante o movimento.
3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar o movimento ou pausas no movimento continuado.
4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:
Esquerda:

24. Movimentos manuais [*Paciente abre e fecha as mãos sucessivamente e rapidamente com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal
1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.
3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.
4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:
Esquerda:

25. Movimentos rápidos alternantes das mãos [*movimentos de pronação-supinação das mãos, verticalmente ou horizontalmente, com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal
1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.
3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.
4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

26. Agilidade das pernas [*paciente bate sucessivamente e rapidamente o calcanhar no chão, erguendo totalmente a perna. Amplitude deve ser aproximadamente de 8 cm*].

0. Normal.
1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.
3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.
4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

27. Ao levantar-se da cadeira [*paciente tentando levantar de uma cadeira de metal ou madeira reta com os braços mantidos cruzados*]

0. Normal
1. Lento; ou pode necessitar mais que uma tentativa.
2. Impulsiona-se com os braços da cadeira.
3. Tende a cair para trás e pode ter que tentar mais que uma vez, mas pode levantar sem auxílio.
4. Sem capacidade de levantar sem auxílio.

28. Postura

0. Normalmente ereto.
1. Não fica totalmente ereto, postura levemente inclinada, poderia ser normal para pessoas mais idosas.
2. Coloca-se moderadamente inclinado, definidamente anormal; pode estar ligeiramente inclinado para um lado.
3. Postura severamente inclinada com cifose; pode estar moderadamente inclinado para um lado.
4. Marcada flexão com extrema anormalidade de postura.

29. Marcha

0. Normal
1. Caminha lentamente, pode ter marcha arrastada com passos curtos, mas sem festinação (acelerando os passos) ou propulsão.
2. Caminha com dificuldade, mas requer pouca ou nenhuma assistência; pode ter alguma festinação, passos curtos ou propulsão.
3. Severo distúrbio da marcha, necessitando auxílio.
4. Não pode caminhar, mesmo com auxílio.

30. Estabilidade Postural [*Resposta ao súbito deslocamento posterior produzido por puxada nos ombros enquanto o paciente está de pé com os olhos abertos e os pés ligeiramente separados. Paciente é preparado, podendo ser repetido algumas vezes a manobra*]

0. Normal

1. Retropulsão, mas volta à posição original sem auxílio.

2. Ausência de resposta postural, podendo cair se não for amparado pelo examinador.

3. Muito instável, tende a perder o equilíbrio espontaneamente.

4. Não consegue parar sem auxílio.

31. Bradicinesias e hipocinesias corporais [*Combinando lentificação, hesitação, diminuição do balanço dos braços, pequena amplitude, e pobreza dos movimentos em geral*]

0. Sem.

1. Mínima lentificação, dando ao movimento um caráter “deliberado”; poderia ser normal para algumas pessoas. Possivelmente amplitude reduzida.

2. Leve grau de lentificação e pobreza dos movimentos que é definitivamente anormal. Alternativamente, alguma redução da amplitude.

3. Moderada lentificação, pobreza ou diminuição da amplitude dos movimentos.

4. Marcada lentificação, pobreza ou diminuição da amplitude dos movimentos.

IV. Complicações da Terapia [*na última semana*]

A. Discinesias

32. Duração: Qual a proporção do dia (acordado) em que as discinesias estão presentes? [*Informação histórica*]

0. Nenhuma

1. 1-25%

2. 26-50%

3. 51-75%

4. 76-100%

33. Incapacidade: o quanto as discinesias são incapacitantes?

0. Não incapacitante.

1. Levemente incapacitante.

2. Moderadamente incapacitante.

3. Gravemente incapacitante.

4. Totalmente incapacitante.

34. Discinesias dolorosas: o quanto as discinesias são dolorosas?

0. Nenhuma discinesia dolorosa.

1. Leve.

2. Moderada.

3. Grave.

4. Acentuada.

35. Presença de distonia no início da manhã:

0. Não.

1. Sim.

B. Flutuações Clínicas

36. Os períodos ‘off’ são previsíveis?

0. Não.

1. Sim

37. Os períodos 'off' são imprevisíveis?

0. Não.

1. Sim.

38. Os períodos 'off' surgem repentinamente, em questão de segundos?

0. Não.

1. Sim.

39. Qual a proporção do dia acordado em que o paciente fica 'off', em média?

0. Nenhuma.

1. 1-25%

2. 26-50%

3. 51-75%

4. 76-100%

C. Outras complicações

40. O paciente tem anorexia, náusea ou vômitos?

0. Não

1. Sim

41. Algum distúrbio do sono, como hipersonia ou insônia?

0. Não.

1. Sim.

42. O paciente tem ortostase sintomática?

0. Não.

1. Sim.

Escala de Hoehn e Yahr

Estágio 0	Sem sinais da doença.
Estágio 1	Doença unilateral.
Estágio 1.5	Acometimento unilateral e axial.
Estágio 2	Acometimento bilateral, sem prejuízo do equilíbrio.
Estágio 2.5	Leve acometimento bilateral, recuperação no teste de equilíbrio (“pull test”).
Estágio 3	Acometimento leve a moderado; alguma instabilidade postural; independente fisicamente.
Estágio 4	Acometimento severo; ainda capaz de caminhar ou permanecer em pé sem auxílio.
Estágio 5	Usando Cadeira de rodas ou acamado exceto se auxiliado.

Escala de "Schwab and England Activities of Daily Living"

- **100%** - Completamente independente. Capaz de realizar atividades rotineiras sem lentidão, dificuldade ou prejuízo. Não percebe dificuldades. Essencialmente normal.
- **90%** - Completamente independente. Capaz de realizar atividades rotineiras porém com algum grau de lentidão, dificuldade e prejuízo funcional. Pode tomar o dobro do tempo. Começa perceber suas dificuldades.
- **80%** - Independente para maioria das atividades rotineiras. Toma cerca do dobro do tempo na realização das mesmas. Consciente das dificuldades e lentificação.
- **70%** - Não é completamente independente. Maior dificuldade na realização de atividades rotineiras. Algumas atividades rotineiras tomam 3-4x mais tempo. Pode tomar grande parte do dia para realização dessas atividades.
- **60%** - Algum grau de dependência. Pode realizar a maioria das atividades rotineiras porém com muita lentidão, dificuldade e prejuízo funcional. Erros; algumas atividades são impossíveis.
- **50%** - Mais dependente. Necessita auxílio na metade das atividades rotineiras. Dificuldades em todas atividades.
- **40%** - Muito dependente. Pode auxiliar nas atividades rotineiras porém necessitando auxílio em quase todas.
- **30%** - Com esforço ocasionalmente (porém não sempre) realiza ou inicia algumas atividades sozinho. Necessita de muito auxílio.
- **20%** - Não realiza nada sozinho. Pode auxiliar muito pouco em algumas atividades da rotina.
- **10%** - Totalmente dependente, incapaz de auxiliar em atividades rotineiras.
- **0%** - Funções vegetativas tais como deglutição e controle vesical e intestinal não são funcionantes. Restrito ao leito.