

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Estudo de fatores clínicos e genéticos associados à variabilidade da resposta farmacológica à terapia dopaminérgica na doença de Parkinson

Artur Francisco Schumacher Schuh

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

Orientadora:

Profa. Dra. Mara Helena Hutz

Co-orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Porto Alegre

Março de 2014

Instituições e Fontes Financiadoras

A parte clínica da pesquisa transcorreu no Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e contou com apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) deste hospital.

A análise genética foi realizada no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi subvencionada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Financiadora de Estudos e Projetos através do projeto Rede Nacional de Farmacogenômica – REFARGEN (FINEP 01.08.01230.00).

O aluno recebeu bolsa do Programa de Bolsa Especial para Doutorado em Pesquisa Médica (PBE-DPM) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) durante determinado período do Doutorado.

"El buen argumento, como el proyectil de las armas modernas, debe salir
de la mente sin humo, sin fuego y con el menor ruido posible"
Santiago Ramón y Cajal

Dedico este trabalho às pessoas que convivem com a doença de Parkinson.

Agradecimentos

Algumas pessoas podem ter grandes ideias, porém apenas uma pequena parcela delas tem a habilidade para executá-las. Dessas, muito poucas têm a capacidade de observar os resultados e ordená-los, sintetizá-los e comunicá-los de maneira lógica e eficiente. Esses últimos são os verdadeiros cientistas. A Profa. Mara Hutz apresenta em abundância essas três qualidades, o que a faz uma pesquisadora brilhante e um exemplo a ser seguido. A ela, agradeço, com muito carinho, por todos os ensinamentos, que serão o pilar da minha carreira acadêmica.

Os complicados caminhos da fisiopatologia da doença de Parkinson podem ser interessante objeto de estudo. Porém, para compreender verdadeiramente a doença são necessários anos de observação clínica apurada, atenção aos detalhes semiológicos, ouvidos pacientes e um coração sempre disposto a confortar. Poucas são as pessoas que reúnem essas características como o Prof. Carlos Rieder. Tive o privilégio de aprender com seus exemplos e ensinamentos e por sua influência resolvi dedicar-me à pesquisa e à assistência de pacientes com Distúrbios do Movimento. Não há como agradecer às inúmeras oportunidades por ele oferecidas. Ao professor, orientador, colega e amigo, meu profundo agradecimento.

À Profa Sídia Callegari-Jacques, pelo essencial auxílio na análise estatística e por seu entusiasmo e criatividade contagiantes.

À Profa. Márcia Chaves, pelo estímulo para seguir na pesquisa, pelas oportunidades oferecidas e pelos conselhos sobre medicina, ciência e vida.

Aos meus Professores da Medicina, sejam eles ligados ou não à UFRGS, que compartilharam comigo os caminhos da arte de curar e de confortar.

A todos os meus Professores, desde a Educação Infantil até o Ensino Médio, em especial ao meu querido Colégio Barão do Rio Branco, que proporcionou terra fértil para o desenvolvimento do meu senso crítico e sempre colocou o conhecimento como bem maior do processo educacional.

Aos colegas Carolina, Márcio, Mariana, Paulo e Vivian, que auxiliaram de maneira especial a condução deste trabalho.

À colega Thais Monte, pela ajuda no trabalho e pela amizade.

A todos os colegas de Pós-Graduação do grupo da Profa. Mara, em especial à Angélica, Luciana, Ana Paula e Janaína, por me ensinarem a operar em um laboratório de Biologia Molecular, pelo auxílio nas análises e pela amizade.

À colega Angélica Oliveira, pelo apoio em momentos difíceis e por ser a orientadora que me auxiliou na análise do vasto material emocional que pode ser gerado durante um Doutorado.

Aos colegas, professores e funcionários do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo coleguismo e pela agradável convivência.

Aos meus amigos, em especial Ana Luiza, Angélica, Felipe, Leonardo, e Iana, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A todos os membros da minha família, em especial à minha irmã Laura, por serem meu porto seguro.

Aos meus sobrinhos, por fazerem acreditar que vale a pena todo esforço e dedicação.

Aos meus primeiros e maiores Professores, meu pai e minha mãe, por todo amor a mim dedicado, por acreditar no meu potencial e por me inspirarem valores como ética, respeito, trabalho e honestidade.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	8
Resumo.....	10
Abstract	12
Capítulo 1: Introdução.....	14
1.1 Considerações sobre a doença de Parkinson	15
1.2 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson	23
1.3 Efeitos adversos do uso crônico de levodopa: flutuação motora, discinesia e alucinação visual.....	29
1.4 Farmacogenética no tratamento da doença de Parkinson.....	33
1.5 Polimorfismos estudados nesta tese	47
Capítulo 2: Justificativa e Objetivos	53
Capítulo 3: Parkinson's disease first symptom is a predictor of motor complications induced by dopaminergic therapy.	55
Capítulo 4: Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease.	71
Capítulo 5: Association of common genetic variants of <i>HOMER1</i> gene with levodopa adverse effects in Parkinson's disease patients.	80
Capítulo 6: COMT Val158Met polymorphism is associated with visual hallucinations in Parkinson's disease patients on levodopa therapy.	87
Capítulo 7: Discussão	104
Bibliografia	116
Anexos	129
<i>Outras produções científicas relacionadas no período.....</i>	<i>130</i>
<i>Cartas de aprovação no Comitê de Ética</i>	<i>141</i>

Lista de Abreviaturas

6OH-DA: 6-hidroxi-dopamina
ACE: enzima conversora da angiotensina
BDNF: "brain derived neurotrophic factor"
CCK: colecistocinina
CCKAR/CCKBR: receptor de colecistocinina A e B
COMT: catecol-O-metil transferase
DAT: transportador de dopamina
DCSR: Distúrbio Comportamental do Sono REM
DDC: dopa decarboxilase
DP: doença de Parkinson
EVH1: "Ena/Vasp homology protein 1"
GBA: gene da glicocerebrosidase
GWAS: "genome wide scan"
HOMER1: homólogo de Homer 1
IP3R: "inositol triphosphate receptor"
LBP-1: "leader binding protein 1"
LRRK2: "leucine-rich repeat kinase 2"
MAOB: monoaminaoxidase B
mGluR1/mGluR2: receptor metabotrópico de glutamato 1 e 2
MPP+: metilfenilpiridina
MPTP: metilfeniltetrahidropiridina
OCT1: "organic cation transporter 1"
PCR: "polymerase chain reaction"
PET: "positron emission tomography"
PINK1: "PTEN induced putative kinase 1"
RCD: resposta de curta duração
REM: "rapid eye movement"
RFLP: "restriction fragment length polymorphism"
RLD: resposta de longa duração
SLC22A1: "solute carrier family 22, member 1"
SNCA: gene da α -sinucleína

SPECT: "single photon emission tomography"

VNTR: "variable number tandem repeat"

VPD35: "vacuolar protein sorting 35"

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é a segunda enfermidade neurodegenerativa mais frequente e acomete cerca de 1 a 3% 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 desses pacientes.

O tratamento da DP consiste no uso de medicamentos que proporcionam estímulo dopaminérgico, principalmente a levodopa, o que possibilita um controle quase ótimo dos sintomas motores nos primeiros anos de uso. Entretanto, em aproximadamente cinco anos, cerca de metade dos pacientes apresentarão complicações (motoras ou não-motoras) induzidas pelo uso crônico destas medicações, o que determina piora da qualidade de vida. O presente trabalho tem por objetivo investigar fatores genéticos e não-genéticos associados às principais complicações induzidas pela terapia dopaminérgica (flutuação motora, discinesia e alucinação visual) e demanda dopaminérgica (dose equivalente de levodopa). Duzentos e vinte e cinco pacientes com doença de Parkinson idiopática em acompanhamento no Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre concordaram em participar do estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A avaliação clínica consistiu de entrevista estruturada, exame neurológico, aplicação de escalas e revisão de dados de prontuário. Foram obtidas amostras de sangue periférico e estudados polimorfismos nos genes da *COMT*, *DAT* e *HOMER1* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real ou por PCR seguido por análise de fragmentos de enzimas de restrição (RFLP).

Os resultados mostraram que pacientes com queixa de tremor como primeiro sintoma motor da doença possuem menor chance de apresentarem complicações motoras induzidas por levodopa, especialmente discinesia ($P = 0,005$). Esses mesmos pacientes mostraram escores de tremor maiores na avaliação presente ($P < 0,001$), consolidando a hipótese de que uma informação histórica simples pode prever fenótipos futuros e resposta farmacológica.

Alucinação visual foi associada com o alelo C do polimorfismo rs2652511 do gene *DAT* ($P = 0,02$) e com o alelo 158Met do polimorfismo Val158Met do

gene *COMT* ($P = 0,02$). Menor demanda dopaminérgica foi observada em pacientes portadores do alelo de 9 repetições da variação de número de repetições em tandem (VNTR) de 40 pares de base da região 3' do *DAT* ($P = 0,01$). Verificou-se ainda que o alelo G do polimorfismo rs4704559 do gene *HOMER1* apresentou um efeito protetor tanto para discinesia quanto para alucinação visual ($P = 0,009$ e $P = 0,02$, respectivamente).

Os resultados obtidos sugerem que a farmacogenética pode fornecer informações importantes relacionadas com a variabilidade da resposta ao tratamento na doença de Parkinson e contribuir para a busca de uma terapia farmacológica individualizada.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder and affects approximately 1-3 % of subjects older than 65 years. Since its prevalence increase with ageing and considering that our population is getting older, the management of these patients is a matter of concern.

The pharmacological treatment of PD consists in the use of drugs that provide dopaminergic stimulation, especially levodopa. It provides an almost optimal control of motor symptoms in the first years of treatment. However, in five years, about half of patients will develop complications (motor and non motor) induced by chronic use of these medications. The present study aims to investigate the development of complications induced by dopaminergic therapy (motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations) and dopaminergic demand (equivalent dose of levodopa) in relation to genetic and non-genetic factors. Two hundred and twenty five patients with idiopathic Parkinson's disease followed at the Neurology Section of the "Hospital de Clinicas de Porto Alegre" agreed to participate in the study and signed a consent form. Clinical evaluation consisted of a structured interview, neurological examination, standardized scales and review of medical records. Peripheral blood samples were obtained and polymorphisms in *COMT*, *DAT* and *HOMER1* genes were determined by polymerase chain reaction (PCR) real-time or through PCR followed by analysis of restriction enzyme length polymorphisms (RFLP).

The results showed that patients who complain of tremor as the first motor symptom are less likely to experience levodopa motor complications, especially dyskinesia ($P = 0.005$). These same patients showed higher tremor scores at the time of evaluation ($P < 0.001$), reinforcing the hypothesis that a simple historical information can predict future phenotypes and pharmacological response. Visual hallucinations were associated with *DAT* rs2652511 C allele ($P = 0.02$) and also with *COMT* 158Met allele ($P = 0.02$). Carriers of the 9 repeat allele of the 40 base pairs variable number tandem repeat (VNTR) at *DAT* 3' region showed lower dopaminergic demand ($P = 0.01$). The G allele of *HOMER1* rs4704559 polymorphism was associated with lower prevalence of both dyskinesia and visual hallucinations ($P = 0.009$ e $P = 0.02$, respectively).

The present results suggest that pharmacogenetics might provide important information for better understanding the variability of pharmacological response in Parkinson's disease and could contribute to the pursuit of an individualized therapy.

Capítulo 1: Introdução

1.1 Considerações sobre a doença de Parkinson

Histórico e epidemiologia

Ao longo do século XIX, com os avanços da patologia, o modelo clínico-patológico dominava o raciocínio médico. Este modelo estava mais preocupado em identificar a causa tangível das doenças, relevando a observação minuciosa e a descrição dos sintomas. Apesar desse cenário, James Parkinson conseguiu como poucos exercer a observação clínica e publicou em 1817 um artigo intitulado "An Essay on the Shaking Palsy", em que, valendo-se apenas da descrição nosológica detalhada, definiu o que ficou conhecido como paralisia agitante (Parkinson, 2002). Algumas décadas mais tarde, Jean-Martin Charcot identificou a bradicinesia como uma manifestação clínica diversa da paralisia e passou a chamar a síndrome de doença de Parkinson (Kempster *et al.*, 2007). Em 1919, quase cem anos após a descrição clínica, Konstantin Tretiakoff observou que no cérebro de pacientes que apresentavam a doença de Parkinson havia degeneração de uma estrutura escurecida localizada no mesencéfalo, a substância negra. A partir de então, as bases para o estudo da doença de Parkinson (DP) como a conhecemos hoje estavam estabelecidas (Lees *et al.*, 2008).

A DP tem distribuição universal e atinge a todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas, com uma discreta predominância no sexo masculino. É a segunda enfermidade neurodegenerativa mais frequente, estando atrás apenas da doença de Alzheimer (de Lau & Breteler, 2006). A prevalência em países industrializados é estimada ao redor de 0,3% para toda a população, chegando a cerca de 1 a 4% na população acima de 65 anos. A incidência varia entre 8 a 18 casos por 100.000 pessoas-ano. No Brasil, um estudo de base populacional identificou prevalência de 3,3% para a DP entre maiores de 64 anos (Barbosa *et al.*, 2006). Roriz-Cruz *et al.* (2010) determinaram uma prevalência de 3% no estado do Rio Grande do Sul em população de mesma faixa etária. Embora a idade seja o principal fator de risco para a doença, com claro aumento da prevalência e da incidência com o envelhecimento da população, há casos em pacientes jovens, principalmente nas formas monogênicas, que ocorrem em cerca de 10% do total de casos (de Lau & Breteler, 2006).

Manifestações clínicas e critérios diagnósticos

A síndrome parkinsoniana é definida pela presença de duas de seis manifestações clínicas fundamentais. São elas tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, perda de reflexos posturais, postura do tronco em flexão e bloqueios motores da marcha ("freezing"). Existem inúmeras causas para essa síndrome, que podem ser classificadas em (1) primárias, decorrentes de processo neurodegenerativo idiopático, e em (2) secundárias, provocadas por distúrbios conhecidos como acidente vascular cerebral, neoplasias, traumas cranioencefálicos, efeitos tardios de infecções no sistema nervoso, efeito colateral de medicamentos e outros. A causa mais frequente da síndrome parkinsoniana é a doença de Parkinson, em que os sintomas característicos da síndrome estão associados a alterações patológicas específicas na ausência de outras etiologias possíveis e sem características atípicas (Olanow *et al.*, 2009a).

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 só é dado pela necropsia e não existem biomarcadores confiáveis para uso na assistência. No exame do cérebro *post-mortem* encontra-se degeneração da *pars compacta* da substância negra, núcleo mesencefálico responsável por eferências dopaminérgicas para o estriado. Também são observadas inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, denominadas corpos de Lewy, nas áreas de degeneração neuronal desses pacientes.

Os critérios diagnósticos atuais para a doença de Parkinson são derivados do Banco de Cérebro de Londres, que possui vasto material patológico com descrições detalhadas das manifestações clínicas dos pacientes (Tabela 1). Esses critérios fornecem acurácia de mais de 90% quando comparados com a patologia considerada como padrão-ouro (Hughes *et al.*, 1992). O quadro típico da doença de Parkinson é caracterizado pelo início insidioso de bradicinesia, rigidez muscular do tipo plástica, tremor de repouso e instabilidade postural. Essas alterações costumam ser assimétricas, apresentam caráter progressivo, com tempo de evolução de 10 anos ou mais e os sintomas motores usualmente apresentam melhora com o uso de levodopa.

Tabela 1: Critérios diagnósticos para a doença de Parkinson de acordo com o Banco de Cérebro de Londres

I. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	
1. Presença de Bradicinesia	
2. Pelo menos 1 dos seguintes:	
2a. Rigidez	
2b. Tremor de repouso 4-6Hz	
2c. Instabilidade postural	
II. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	
1. antecedentes de AVCs repetidos	10. progressão em degraus dos sintomas parkinsonianos
2. antecedentes de TCEs repetidos	11. antecedentes de encefalites
3. crises oculóginas	12. tratamento com neurolépticos no início dos sintomas
4. remissão duradoura dos sintomas	13. sintomas unilaterais após 3 anos de evolução
5. paralisia supranuclear do olhar vertical para baixo	14. sinais cerebelares
6. sinais de disautonomia precoces e acentuados	15. sinal de Babinski
7. falta de resposta a doses adequadas de levodopa	16. exposição ao MPTP
8. demência precoce com transtornos amnésicos, da linguagem e praxia	
9. presença de tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante em exame de imagem	
III. CRITÉRIOS QUE REFORÇAM O DIAGNÓSTICO	
1. Início unilateral	
2. Tremor de repouso presente	
3. Quadro progressivo	
4. Assimetria persistente > lado início	
5. Tem resposta excelente á levodopa (70-100%)	
6. Tem coréia importante induzida pela levodopa	
7. Mantém reposta à levodopa por 5 ou mais anos	
8. Curso clínico ≥ 10 anos	

Além do conceito original de uma enfermidade com acometimento preferencialmente motor, as manifestações não motoras da doença são cada vez mais reconhecidas como as principais responsáveis pelo grau de incapacidade dos pacientes. Esse fato se deve, em parte, ao progresso das terapias dopaminérgicas, que visam primariamente restaurar o controle motor, restando uma ampla gama de sintomas não decorrentes do déficit dopaminérgico sem tratamentos específicos. Os pacientes com DP podem apresentar sintomas neuropsiquiátricos, disfunção da marcha, distúrbio do olfato, distúrbios do sono, disfunção autonômica, alterações gastrointestinais, alterações dermatológicas e sintomas sensoriais, o que expande a definição da doença em direção a um distúrbio multissistêmico.

Considerações sobre anatomopatologia e manifestações pré-motoras

Braak *et al.* (2003) fizeram um amplo estudo anatomopatológico sobre a distribuição dos achados patológicos típicos da DP e propuseram um modelo de

evolução da neurodegeneração. Segundo esse modelo, há vários estágios da doença que preservam um gradiente caudo-rostral de progressão da degeneração celular. Dessa forma, a morte neuronal começaria em regiões caudais do tronco cerebral (e.g. núcleo motor dorsal do vago e núcleos da rafe) e bulbo olfatório, atingindo a substância negra apenas em uma fase mais avançada do processo. Esse modelo corrobora a observação de que alguns sintomas tipicamente observados nesses pacientes mesmo antes do aparecimento dos sintomas motores, como distúrbios do olfato, depressão, constipação e distúrbios do sono possam representar uma DP pré-motora. Com o avanço da enfermidade, os corpos de Lewy são encontrados disseminados por todo o encéfalo, incluindo o córtex cerebral, o que explicaria o quadro demencial frequentemente sobreposto nos estágios finais.

Diversas evidências sugerem que a degeneração nigral inicia-se 6 a 8 anos antes dos sintomas motores (Schapira & Obeso, 2006). No momento do diagnóstico, a patologia da DP já se encontra estabelecida e os pacientes apresentam 50 a 60% de perda neuronal e 70 a 80% de depleção dopaminérgica. Essa latência entre as alterações patológicas e o aparecimento das manifestações clínicas possivelmente se deve ao fato de que haja uma redundância das vias dopaminérgicas e mecanismos de compensação que mantenham a função dos núcleos da base estável por vários anos (Bezard *et al.*, 2003). A latência entre a patologia e as manifestações clínicas pode ser a explicação da falha das terapias neuroprotetoras testadas até o momento, uma vez que a doença é diagnosticada quando já há grau avançado de neurodegeneração.

Como decorrência do conhecimento de que a degeneração da DP inicia-se em outras regiões que não a substância negra, maior atenção vem sendo dada às manifestações pré-motoras da doença, na tentativa de fazer diagnósticos precoces (Postuma *et al.*, 2012). Distúrbios do olfato, Distúrbio Comportamental do Sono REM (DCSR), disfunção autonômica, anormalidades cardíacas, depressão, anormalidades visuais e disfunção cognitiva são os principais marcadores clínicos do que começa a ser chamado de doença de Parkinson pré-motora, com especial atenção para os dois primeiros.

Diminuição da identificação e reconhecimento de odores é um sintoma presente em mais de 80% dos pacientes com DP e pode ser útil no diagnóstico diferencial com outras formas de parkinsonismo (Hawkes *et al.*, 1997). A ideia de que alteração do olfato possa preceder as manifestações clínicas foi reforçada pelos estudos de Braak *et al.* (2003), que demonstraram que o acúmulo de corpos de Lewy inicia-se, entre outras regiões, no bulbo olfatório. Um estudo de coorte de base populacional acompanhou idosos saudáveis e determinou que o distúrbio do olfato foi um preditor para o surgimento da DP, com a hiposmia iniciando cerca de 4 anos antes dos sintomas motores (Ross *et al.*, 2008).

O DCSR é uma condição na qual há uma perda da atonia muscular durante o sono REM e o indivíduo apresenta movimentos bruscos durante o sono. Em um estudo de seguimento de 16 anos, cerca de 80% dos sujeitos que apresentavam esse distúrbio desenvolveram alguma forma de parkinsonismo (Schenck *et al.*, 2013). Outros estudos de coorte estão em andamento e acompanham sujeitos que apresentam possíveis manifestações pré-motoras para definir com precisão o que pode ser considerada doença de Parkinson pré-motora. A definição desse conceito será importante na busca de terapias neuroprotetoras.

Genética da doença de Parkinson

O estudo das formas de DP com herança monogênica adiciona elementos que contribuem para o entendimento da fisiopatologia da forma esporádica (Farrer, 2006). Foram identificados cerca de vinte *loci* gênicos como determinantes de parkinsonismo, a maioria deles, no entanto, é bastante rara (Gasser *et al.*, 2011). Dois *loci* são os responsáveis pela maioria dos casos de parkinsonismo com herança autossômica dominante: *PARK1* e *PARK8*. O primeiro *locus* descrito para a DP foi o *PARK1* (*SNCA*), que codifica a proteína α -sinucleína, principal componente dos corpos de Lewy (Polymeropoulos *et al.*, 1997). O acúmulo desta proteína possivelmente leva à morte de células neuronais e/ou é um marcador de dano celular. Mutações de ponto, duplicações e triplicações desse *locus* já foram descritas e há uma grande variabilidade na apresentação clínica, mesmo dentro de uma mesma família. Em geral, a multiplicação do *locus* determina formas mais graves da doença (Ibáñez *et al.*,

2009). O *PARK8* é a forma autossômica dominante mais frequente da DP e o gene dessa região denomina-se *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 há evidências de que tenha papel na regulação da apoptose celular (Dächsel & Farrer, 2010). Seis mutações de ponto foram identificadas como patogênicas. Entretanto, alterações no *PARK8*, descritas em famílias com DP autossômica dominante, foram também encontradas em grande número de pacientes com formas esporádicas de início tardio e com patologia cerebral confirmada (Gilks *et al.*, 2005). Esse fato sugere que o *PARK8* apresente penetrância incompleta e seja um gene de risco para a DP esporádica. Dada a alta frequência de mutações nesse *locus*, o uso de testes genéticos na clínica é tema de debate na literatura (Klein & Djarmati, 2011; Harbo *et al.*, 2009).

As formas com herança autossômica recessiva, em sua maioria, são determinadas por três *loci* principais: *PARK2*, *PARK6* e *PARK7*. Diversas mutações de ponto foram identificadas como patogênicas nesses *loci*, além de rearranjos genômicos (e.g. deleções e multiplicações), tornando-se mandatório o sequenciamento e a dosagem de éxons na pesquisa dessas mutações. O *PARK2* 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). Mutações nesse gene correspondem a mais da metade dos casos autossômicos recessivos, em geral com início antes dos 45 anos, com boa resposta à levodopa e curso benigno em termos de disfunção para atividades de vida diária. No *locus PARK6* foi identificado o gene *PINK1*, que codifica uma quinase mitocondrial, e no *PARK7*, o gene *DJ-1*, que codifica uma proteína que protege neurônios do estresse oxidativo e da apoptose. Ambas as formas determinam DP de início precoce e, por serem mais raras, existem poucas descrições fenotípicas, em geral assemelhando-se ao *PARK2* (Djarmati *et al.*, 2004; Bonifati *et al.*, 2005).

Recentemente, estudos de sequenciamento do exoma identificaram mutações em dois novos genes. O primeiro é o gene *VPS35* (“vacuolar protein

sorting 35"), onde uma mutação foi descrita em uma família suíça e posteriormente encontrada em famílias de outras etnias. Esse gene codifica uma proteína importante no processamento de proteínas associadas a membranas, com papel na regulação da mitofagia e na função lisossomal (Zimprich *et al.*, 2011). O segundo é o gene *eIFG1* ("eukaryotic initiation fator G1), onde mutações foram associadas a formas autossômicas dominantes de DP de início tardio. O produto deste gene tem papel central na regulação da tradução do mRNA, função mitocondrial, crescimento celular e resposta ao estresse (Chartier-Harlin *et al.*, 2011). O estudo dessas formas monogênicas ajuda a compreender possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na gênese da DP esporádica e apontam para a disfunção dos sistemas de depuração de proteínas, com o consequente acúmulo anormal dessas substâncias, e para a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, como implicados na fisiopatologia da doença de Parkinson esporádica (Singleton *et al.*, 2013).

A observação de que portadores da doença de Gaucher podiam apresentar sinais parkinsonianos e de que portadores heterozigotos para a mutação desta doença apresentavam maior frequência de doença de Parkinson levou à condução de estudos que confirmaram essa hipótese (Aharon-Peretz *et al.*, 2004). A doença de Gaucher é uma enfermidade genética autossômica recessiva associada à disfunção lisossomal provocada por mutação no gene *GBA*, que codifica a enzima glicocerebrosidase. Uma mutação nesse gene foi associada ao risco cinco vezes maior de desenvolver DP (Sidransky *et al.*, 2009). Essas observações sugerem papel do lisossomo na patogênese dessa enfermidade. Recentemente, estudos preliminares com heterozigotos para outras doenças de depósito lisossômico foram conduzidos e observou-se aumento de risco para DP em heterozigotos para Niemann-Pick tipo A e tipo C (Gan-Or *et al.*, 2013; Klunenmann *et al.*, 2013).

Com o advento dos estudos de varredura genômica ("genome wide association studies", GWAS), o modelo de doença comum associada com variantes comuns pode ser testado na doença de Parkinson. Cerca de 16 *loci* foram identificados como fatores de risco ou de proteção para a doença (Singleton *et al.*, 2013). No entanto, o tamanho do efeito desses genes é

pequeno, variando entre 0,7 para proteção e 1,4 para risco, considerando cada marcador individualmente. Como o risco conferido por apenas um marcador é baixo, a determinação do perfil de risco, utilizando um modelo poligênico que incorpore diversos marcadores, é preferível. Nessas condições, indivíduos que estavam no quintil mais alto para marcadores de risco tinham probabilidade três vezes maior de apresentar a doença quando comparados com os que estavam no quintil inferior (International Parkinson's Disease Genomics Consortium & Wellcome Trust Case Control Consortium 2, 2011)

Fatores ambientais e doença de Parkinson

Além das formas genéticas, fatores ambientais foram identificados como determinantes da DP, como a intoxicação por MPTP, que é uma toxina mitocondrial, e os casos de parkinsonismo pós-encefálico. Um grande número de evidências epidemiológicas sugere que o consumo de tabaco e de cafeína sejam protetores para a DP. No entanto, o mecanismo biológico para essa associação ainda não foi identificado (Hernán *et al.*, 2002a). Atenção crescente vem sendo dada ao uso de pesticidas e solventes como fatores de risco para DP, com estudos epidemiológicos recentes reforçando essa associação (Pezzoli & Cereda, 2013). Trabalho em zona rural, trauma cranioencefálico, níveis séricos de ácido úrico e uso de anti-inflamatórios não esteroides também estariam associados com a doença; os dois primeiros seriam fatores de risco e os dois últimos fatores de proteção (Kiebertz & Wunderle, 2013).

Modelo fisiopatológico

Apesar dos avanços das últimas décadas, a causa final da DP ainda é desconhecida. Uma interação entre fatores genéticos e o ambiente parece ser a explicação mais plausível para o desenvolvimento dessa condição, sendo a idade o principal determinante. Nesse modelo, os indivíduos herdariam componentes genéticos para maior susceptibilidade neuronal a insultos, tanto exógenos (toxinas ambientais, p. ex.) quanto endógenos (estresse oxidativo celular, p.ex.). Esses insultos determinariam disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, degradação anormal de proteínas e, como ponto final, morte neuronal. O desequilíbrio da função dos núcleos da base e de outras estruturas cerebrais seriam decorrentes desse processo (Sulzer, 2007).

1.2 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson

Existem diversas classes de medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Parkinson, com indicações de uso variadas de acordo com os sintomas e com o perfil do paciente, o grau de incapacidade e a gravidade da doença. Na tabela 2, estão listadas as classes de medicamentos e os seus principais representantes no Brasil. Abaixo, segue considerações sobre essas medicações, com especial ênfase na levodopa. As diretrizes para tratamento fogem do escopo desta Tese e não serão apresentadas.

Tabela 2: Principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson no Brasil

Levodopa associada a inibidor da dopa-decarboxilase	Levodopa/carbidopa Levodopa/benserazida
Agonistas dopaminérgicos	Pramipexol Bromocriptina
Inibidores da MAOB	Selegelina
Inibidores da COMT	Tolcapone Entacapone
Anticolinérgicos	Biperideno Triexifenidila
Antiglutamatérgicos	Amantadina

Levodopa

A degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra causa deficiência de dopamina no estriado e esse fenômeno é uma constante na fisiopatologia da DP, sendo o principal responsável pelas manifestações clínicas, especialmente as motoras. 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, promovendo melhora nas atividades de vida diária, qualidade de vida e independência e 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 alucinação visual.

Na década de 50 do século XX, Arvid Carlsson, estudando a ação anti-hipertensiva da reserpina em coelhos, observou que essa medicação também provocava um efeito tranquilizador, que era prontamente revertido com a administração de levodopa (Fahn, 2008). A reserpina estimula a depleção dopaminérgica, provocando acinesia, o que explica o efeito tranquilizador observado. Em 1959, em um congresso de farmacologia, Carlsson especulou sobre o possível efeito terapêutico da levodopa na doença de Parkinson. Na década posterior, Hornykiewicz propôs a deficiência de dopamina como causa da doença de Parkinson e demonstrou marcado efeito antiparkinsoniano com a administração endovenosa de levodopa. Após esses intentos iniciais, várias tentativas surgiram com o uso oral da levodopa, 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 medicação. 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 incremento progressivo das doses e melhora clínica significativa (Cotzias *et al.*, 1969).

A levodopa é naturalmente encontrada em algumas plantas. No cérebro de mamíferos, é sintetizada a partir do aminoácido tirosina, atuando como precursora das catecolaminas, especialmente a dopamina. Após a administração via oral dessa medicação, sua absorção se dá por transporte ativo na porção proximal do intestino delgado, especialmente duodeno, pela mesma rota dos aminoácidos neutros, como leucina, valina e fenilalanina. A droga passa livremente a barreira hematoencefálica, propriedade que a diferencia da dopamina, e é convertida a este neurotransmissor nos neurônios da substância negra. Sua meia-vida sérica 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 com DP, pode aumentar esse período de latência (Olanow *et al.*, 2009a).

Os efeitos adversos agudos da levodopa são náusea, vômitos e hipotensão postural, devidos a sua conversão periférica em 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 administrada concomitantemente aos inibidores da dopa-decarboxilase, que determinam maior tolerância e aumento de cerca de quatro vezes na disponibilidade da droga (Olanow *et al.*, 2009a).

No início do tratamento com levodopa, caracteristicamente, observa-se resposta clínica marcada, com redução do tremor, da rigidez e da bradicinesia. Na fase inicial do tratamento, doses baixas, entre 300-400mg/dia, costumam ser suficientes. De fato, esse período inicial é chamado como “honey moon” (lua de mel), pelo motivo de que os pacientes vivem um momento completamente livre de sintomas. 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 à levodopa se fizer uso de 1000mg/dia por várias semanas, sem resposta favorável (Olanow *et al.*, 2009a). Essas variações individuais ainda não estão bem explicadas e acredita-se que possa existir, ao menos em parte, uma base genética para as mesmas.

Desde a disseminação do uso desta medicação no tratamento da DP, intenso debate se estabeleceu 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 submetidas às células nigrais remanescentes e atenuar

o estresse oxidativo associado ao processamento dopaminérgico. Algumas evidências de estudos *in vitro*, no entanto, apontaram um efeito neurotóxico da levodopa, o que não foi demonstrado *in vivo*. Com o reconhecimento de que as complicações crônicas induzidas pela levodopa são dependentes do tempo de uso da medicação, há uma tendência em iniciar a medicação apenas quando houver algum grau de limitação funcional. Entretanto, tendo em vista a eficácia dessa medicação no controle dos sintomas e seu impacto na qualidade de vida, não se recomenda postergar seu uso, pois estaríamos privando os pacientes da melhora sintomática (Fahn, 2008).

O ELLDOPA foi um grande estudo prospectivo, duplo-cego, patrocinado pelo NIH, realizado com o objetivo de determinar a potencial toxicidade da levodopa em contexto clínico (Fahn *et al.*, 2004). Pacientes com DP inicial foram randomizados em quatro grupos: um que recebeu placebo e outros três que receberam doses 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 do uso da levodopa, como esperado, mas ainda assim significativamente menor que o grupo que usou placebo. Sugeriu-se então que (1) a levodopa não apresenta efeito neurotóxico e que (2) apresenta possível efeito neuroprotetor. Os achados do ELLDOPA podem ser criticados pelo fato de poder haver efeito sintomático residual da levodopa após duas semanas da suspensão do uso.

Anticolinérgicos

Foi a primeira classe de medicamentos utilizados no tratamento da DP. Com a degeneração da substância negra, ocorre uma reorganização dos circuitos dos núcleos da base e uma hiperatividade colinérgica surge, o que explica o efeito antiparkinsoniano desses medicamentos. Apresentam discreto efeito sobre bradicinesia e rigidez e melhor efeito sobre tremor. Estão associados a efeitos colaterais que limitam seu uso, como alteração de memória e de comportamento, constipação e boca seca. Atualmente, são usados apenas em casos de tremor

refratário ao tratamento dopaminérgico em pacientes jovens (Olanow *et al.*, 2009a).

Agonistas dopaminérgicos

São moléculas diversas da dopamina, que estimulam diretamente o receptor dopaminérgico pós-sináptico. Apresentam efeito antiparkinsoniano menor que a levodopa e podem ser utilizados em monoterapia em casos leves ou em associação com a levodopa para minimizar as flutuações motoras. Pacientes que iniciam em monoterapia com essas medicações demoram mais tempo para desenvolver flutuação motora e discinesia. Porém, uma vez que se torna necessário o uso de levodopa para melhor controle dos sintomas, aqueles que iniciaram em monoterapia com agonistas apresentam o mesmo risco de desenvolver as complicações em relação aos pacientes que iniciaram o tratamento com levodopa (Olanow *et al.*, 2009a).

Inibidores da MAOB

A monoamina oxidase (MAO) é 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 uma vez liberado na fenda sináptica. Dois inibidores da MAO-B estão disponíveis para o uso clínico, a selegilina e a rasagilina, este último ainda não disponível no Brasil. 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.*, 2009a). O estudo ADAGIO testou a hipótese de que a rasagilina seria modificadora do curso da doença (Olanow *et al.*, 2009b). Para isso, conduziu-se um ensaio clínico com um desenho especial ("delayed start") e demonstrou-se que os pacientes que iniciaram com rasagilina apresentaram benefícios que se mantiveram no tempo. Muitas críticas surgiram contra esse estudo e a real interpretação deste achado é ainda um tema controverso.

Inibidores da COMT

Resta ainda uma 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 DP com flutuação da resposta motora (Olanow *et al.*, 2009a). Seu uso na fase inicial da doença, associado à levodopa, na tentativa de prover estimulação dopaminérgica mais estável e diminuir a incidência de discinesia foi testado no estudo STRIDE-PD (Stocchi *et al.*, 2010). Os resultados mostraram que a associação de entacapone ao uso de levodopa e inibidor da dopa descarboxilase nas fases iniciais da doença aumentou a frequência de discinesia, não sendo recomendados nesta situação.

Antiglutamatérgicos

A amantadina possui ação antiglutamatérgica, anticolinérgica e dopaminérgica discreta. Apresenta efeito antiparkinsoniano leve e pode ser utilizada em casos iniciais com sintomas pouco incapacitantes. Porém, seu principal uso é em casos avançados para controlar a discinesia induzida por levodopa, sendo a única droga aprovada para esse fim. O uso dessa medicação em pacientes idosos deve ser feito com cautela, pois aumenta o risco de alterações cognitivas e comportamentais (Olanow *et al.*, 2009a; Rodnitzky & Narayanan, 2014).

1.3 Efeitos adversos do uso crônico de levodopa: flutuação motora, discinesia e alucinação visual

Flutuação motora e discinesia induzida por levodopa: definições e fisiopatologia

Flutuação motora é definida como a alternância da resposta clínica da levodopa. 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 (Fox & Lang, 2008). As flutuações 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. Na tabela 3, os principais tipos de flutuações motoras e o manejo das mesmas são listados (Fox & Lang, 2008).

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. Na tabela 4 estão descritos os principais tipos de discinesias e o manejo das mesmas (Fox & Lang, 2008).

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 & Muentner, 2001). Alguns fatores clínicos parecem predispor à presença dessas complicações. Para as flutuações motoras, os fatores mais importantes são tempo de doença, dose de levodopa e gravidade no início do uso (De Jong *et al.*, 1987; Denny & Behari, 1999; Schrag & Quinn, 2000). Para discinesia, somam-se aos fatores expostos para as flutuações um risco aumentado para o sexo feminino (Zappia *et al.*, 2005). Entretanto, a DP de início precoce parece ser o principal fator de risco para ambas as complicações, com a quase totalidade desses pacientes apresentando-as 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 pulsátil dos núcleos da base provocada pelo uso de levodopa. Esses eventos adversos 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.

Tabela 3: Principais formas de flutuação motora e sugestões de manejo.

"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 de levodopa, fracionamento das mesmas, ou uso de agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B ou inibidores da COMT.
"Off" matinal	Momento de maior gravidade 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.
"Off" imprevisível	Retorno súbito 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 da medicação, 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-	No momento do declínio do efeito da medicação pode haver exacerbação súbita dos sintomas ("super-off"), com a

off	posterior recuperação para o período “off” usual do paciente. Pode-se aumentar a frequência da tomada da medicação, aumentar a dose, associar agonistas dopaminérgicos ou inibidores da MAO-B ou da COMT.
“On-off” ou “yo-yoing”	Alternância súbita e imprevisível entre os estados “on” e “off” ao longo do período de uma dose. Poucas opções de manejo.

Tabela 4: Principais formas de discinesias e sugestões de manejo

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. O manejo dessa complicação pode ser a diminuição do aporte dopaminérgico, fracionamento das doses de levodopa ou uso de amantadina.
Discinesia bifásica	Correlaciona-se com os períodos de início e de final de ação da medicação, antes e após o pico de dose, temporalmente relacionados ao aumento e ao decréscimo da concentração de levodopa. Afeta preferencialmente os membros inferiores, com movimentos estereotipados, frequentemente associados com balismo e distonia. O manejo dessa complicação pode ser a diminuição do aporte dopaminérgico, fracionamento das doses de levodopa ou uso de amantadina.
Distonia do período “off”	Ocorre no período de pior resposta à levodopa, representando uma intrusão de um quadro hiperkinético em um contexto geral hipocinético. Usualmente costuma acometer os membros inferiores, com predileção pelos pés, e pode ser acompanhada de dor. Para manejar essa situação recomenda-se aumentar a dose de levodopa

Para o entendimento da fisiopatologia da flutuação motora e da discinesia, é necessário considerar que 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. Nos pacientes com DP em tratamento com levodopa essa estimulação passa a ser descontínua, o que apresenta papel importante no surgimento das complicações

motoras. Sugere-se que o uso de levodopaterapia contínua possa reverter as complicações motoras em pacientes parkinsonianos e previni-las em modelo animal de DP (Nutt, 2007).

O uso da levodopa se associa com dois tempos diferentes de resposta clínica: a resposta de curta duração (RCD), que acompanha a meia-vida sérica da droga, e a resposta de longa duração (RLD), que pode persistir por até quatro semanas e representa o armazenamento de dopamina nas células remanescentes da substância negra. Essas duas respostas sempre estão presentes desde o início do tratamento, porém são imperceptíveis para o paciente. Com o avanço da doença, ocorre diminuição da RLD, o que leva a um aumento da oscilação da concentração intrassináptica de dopamina, que se manifesta clinicamente como os estados “on” e “off” (Nutt *et al.*, 2002). Esse aumento da oscilação é explicado (1) por um estado “off” basal de maior intensidade e (2) por uma diminuição da RLD, ambos devidos à maior degeneração das células dopaminérgicas, e também (3) por um maior efeito da medicação no pico de dose, justamente por haver menos células absorvendo o excesso de dopamina (Nutt, 2001). Essa estimulação crônica intermitente de dopamina provoca alteração nos receptores glutamatérgicos, também presentes nesses neurônios, deixando-os mais sensíveis ao glutamato e ativando mecanismos de plasticidade sináptica e neuronal, o que exacerba o fenômeno tanto da flutuação quanto da discinesia (Linazasoro, 2005). Em resumo, a evolução da doença, somada ao uso da levodopa, provocam diminuição do estímulo dopaminérgico tônico fisiológico e aumento da sua pulsatilidade. Esse processo leva a uma sensibilização exacerbada do estriado, o que altera a regulação interna dos núcleos da base.

Alucinação visual na doença de Parkinson: definição e fisiopatologia

Alucinação visual é outra complicação frequente que acomete cerca de um terço dos pacientes em uso de terapia dopaminérgica no curso da doença e determina impacto negativo na qualidade de vida desses pacientes e sobrecarga ao cuidador (Celesia & Barr, 1970; Graham *et al.*, 1997). O mecanismo neuroquímico responsável pelo surgimento dessa complicação é desconhecido, porém são estabelecidos alguns fatores de risco associados a ela, como

comprometimento cognitivo, depressão, duração e gravidade da doença (Morgante *et al.*, 2012). 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). Atrofia cortical foi descrita em associação com alucinação visual, sugerindo que a disseminação do processo de neurodegeneração também tenha uma contribuição expressiva no surgimento desse fenômeno (Shin *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2013).

1.4 Farmacogenética no tratamento da doença de Parkinson

Com o objetivo de fornecer um panorama dos artigos publicados sobre farmacogenética na doença de Parkinson, foi realizada uma revisão sobre estudos de associação entre gene e resposta ao tratamento da doença de Parkinson. Foram incluídos estudos transversais e longitudinais, observacionais e de intervenção. Estudos de revisão, relatos ou séries de casos foram excluídos. Pelo menos um dos grupos do estudo deveria ser de pacientes com doença de Parkinson esporádica. Os fatores em estudo considerados para inclusão nesta revisão foram qualquer forma de marcador genético. Os desfechos considerados foram qualquer fenômeno que pudesse estar associado ao uso de medicamentos antiparkinsonianos (e.g. flutuação motora, discinesia, psicose, alucinação, sonolência excessiva e dose de medicamentos). Os fármacos considerados foram as drogas antiparkinsonianas disponíveis na rede pública do Brasil: levodopa/benserazida, levodopa/carbidopa, pramipexol, selegelina, entacapone e tolcapone. A prospecção dos estudos foi feita na base de dados do PubMed, com última data de acesso em 12 de novembro de 2013. As bibliografias dos estudos encontrados e de artigos de revisão sobre o tema também foram revisadas. Os termos de busca foram os seguintes: "pharmacogen* AND Parkinson", "polymorphism* AND Parkinson AND levodopa", "polymorphism* AND Parkinson AND pramipexol", "polymorphism* AND Parkinson AND selegelina",

"polymorphism* AND Parkinson AND tolcapone" e "polymorphism* AND Parkinson AND entacapone".

Os estudos encontrados foram classificados de acordo com a plausibilidade biológica dos genes candidatos estudados nos seguintes grupos: (1) estudos de genes associados à farmacocinética ou farmacodinâmica das medicações antiparkinsonianas, (2) estudos de genes associados à possível fisiopatologia dos eventos adversos em estudo e (3) estudos mistos, que analisaram genes dos dois grupos anteriores. Os dados estão disponíveis nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5: Estudos de farmacogenética na doença de Parkinson (genes associados à farmacocinética/farmacodinâmica das medicações antiparkinsonianas)

Autor e ano	Fármacos	Amostra	Etnia	Cenário clínico	Desenho do estudo	Genes	Polimorfismos	Desfechos	Controle de confundidores	Resultados
Oliveri <i>et al.</i> 1999	Levodopa.	136 DP. 224 controles.	Europeus.	Clínica de Neurologia vinculada à Universidade.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD1 e DRD2	DRD1: três polimorfismos diferentes detectados pela clivagem com as enzimas <i>Ddel</i> , <i>PvuI</i> e <i>BspI</i> . DRD2: (CA) _n STR.	Risco para DP. Discinesia induzida por levodopa.	Pacientes pareados por tempo de doença e ajustado por sexo.	Alelo de 15x do DRD2 mais frequente em DP. Presença dos alelos de 13x e 14x do DRD2 protetores para discinesia.
Makoff <i>et al.</i> 2000	Levodopa e agonista dopaminérgico	155 PD.	Europeus	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD2 e DRD3.	DRD2: - 141CIns/Del; TaqIA. DRD3: Ser9Gly	Alucinação de qualquer tipo. Dividiu em alucinação precoce (< 5 anos de doença) e tardia (> 5 anos)	Grupo controle pareado para tempo de doença, idade de início, tempo de uso de terapia dopaminérgica e gênero.	Ausência de associação para alucinação tardia associada com alelo C do TaqIA do DRD2.
Chong <i>et al.</i> 2000	Tolcapone.	24 DP.	Sem menção.	Clínica de Distúrbios do Movimento de Hospital Universitário.	Coorte. Análise de dados de um ensaio clínico.	COMT	Val158Met	Mudança da UPDRS III na linha de base, 1-2 semanas e 6 meses após tratamento.	Controle estatístico de gravidade de doença e dose de tolcapone.	Não houve diferença da UPDRS III de acordo com os grupos genotípicos. Também não houve diferença para mudança da dose de levodopa e nem para diarreia como evento adverso ao fármaco.
Lee <i>et al.</i> 2001	Levodopa.	73 DP. 29 AMS. 49 controles.	Coreanos.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	COMT	Val158Met	Risco para DP e AMS. Resposta motora ao desafio oral com levodopa.	Sem menção de controle.	Não houve associação dos genótipos com DP ou AMS. Não houve associação dos genótipos com resposta à levodopa.
Wang <i>et al.</i> 2001	Levodopa.	120 DP. 110 controles.	Sem menção.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD5	T978C	Risco para DP. Flutuação motora.	Controles pareados para idade, gênero, etnia e área de residência. Sem menção de controle para a análise farmacogenética.	Ausência de associação com DP e com flutuação motora.

Continua

Wang <i>et al.</i> 2001	Levodopa.	140 DP. 140 controles.	Sem menção.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD2 e DRD3.	DRD2: TaqIA. DRD3: dois polimorfismos detectados pela clivagem pelas enzimas <i>Ball</i> e <i>Mspl</i> .	Risco para DP. Flutuação motora.	Controles pareados para idade, gênero, etnia e área de residência. Para análise de farmacogenética, 40 pares de pacientes com e sem flutuação foram formados com base na duração da doença.	Ausência de associação com a doença. Genótipo A1A1 do DRD2 TaqIA associou-se a flutuação motora.
Kaiser <i>et al.</i> 2003	Levodopa	183 DP.	Europeus.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos.	DRD2, DRD3, DRD4 e DAT.	DRD2: <i>TaqIA</i> , <i>TaqIB</i> , <i>TaqID</i> , <i>Pro310Ser</i> , <i>Ser311Cys</i> . DRD3: <i>Ser9Gly</i> e <i>Mspl</i> . DRD4: VNTR 48pb, 12pb e 13pb. DAT: VNTR 40pb.	Tempo para desenvolver discinesia, psicose e flutuação motora.	Sem menção.	A presença do alelo de 9 repetições do DAT VNTR 40pb foi preditor de discinesia e psicose.
Watanabe <i>et al.</i> 2003	Levodopa.	121 DP. 100 controles.	Japoneses.	Sem acesso pela CAPES.	Sem acesso pela CAPES.	COMT	Val158Met	Risco para DP. Discinesia e flutuação motora.	Sem acesso pela CAPES.	MetMet associou-se com a DP. Sem associação com flutuação motora ou discinesia.
Paus <i>et al.</i> 2004	Terapia dopaminérgica.	102 DP com ataque de sono. 102 DP sem ataque de sono.	Europeus.	Organização alemã de pacientes com DP.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD2, DRD3, DRD4 e 5HTT.	DRD2: -141C ins/del, <i>TaqIA</i> DRD3: <i>Ser9Gly</i> DRD4: VNTR 48pb 5HTT: 44pb ins/del	Ataques de sono.	Pareados para tipo de terapia dopaminérgica em uso, duração da doença e idade.	Homozigotos para alelo curto do DRD4 associado com maior frequência de ataques de sono.
Rissling <i>et al.</i> 2004	Terapia dopaminérgica.	137 DP com ataque de sono. 137 DP sem ataque de sono.	Sem menção.	Organização alemã de pacientes com DP.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD2, DRD3, DRD4	DRD2: <i>TaqIA</i> DRD3: <i>MscI</i> DRD4: 120pb duplicação em tandem	Ataques de sono.	Pareados para tipo de agonista dopaminérgico e dose em uso, dose de levodopa, duração da doença, gênero, idade e uso de outros antiparkinsonianos.	Alelo A2 do DRD2 <i>TaqIA</i> associado com maior frequência de ataques de sono.
Contin <i>et al.</i> 2004	Levodopa.	36 DP.	Sem menção.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos.	DAT	DAT VNTR 40pb	Captação de radiotraçador no putâmen, parâmetros de resposta clínica e presença de discinesia após desafio oral com levodopa.	Sem menção.	Ausência de associação entre o polimorfismo e os desfechos.

Continua

Frauscher <i>et al.</i> 2004	Terapia dopaminérgica.	46 DP.	Sem acesso pela CAPES.	Sem acesso pela CAPES.	Transversal. Estudo de casos.	COMT	Val158Met	Sonolência diurna excessiva (escala de Epworth).	Sem acesso pela CAPES. Não houve diferença de dose de levodopa ou agonista dopaminérgico entre os grupos	Associação entre alelo Met e maior pontuação na escala de Epworth.
Bialecka <i>et al.</i> 2004	Levodopa.	95 DP.	Europeus	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos.	COMT e MAOB.	COMT: Val158Met. MAOB: íntron 13 A>G (<i>Tsp451</i>)	Uso de 500mg/dia de levodopa nos primeiros 5 anos de doença.	Sem menção.	Genótipo MetMet da COMT associado com o grupo tratado com menores doses. Haplótipo ValVal – AG associado com o grupo tratado com maiores doses quando comparado com o grupo MetMet – AG em mulheres.
Zappia <i>et al.</i> 2005	Levodopa	215 DP	Europeus	Clínica especializada em Distúrbios do Movimento	Transversal. Estudo de casos.	DRD2	(CA) _n STR	Discinesia de pico de dose após administração de levodopa.	Controle estatístico de sexo, idade de início, tempo de tratamento e dose de levodopa.	Presença dos alelos 13x e 14x foram protetores para discinesia em homens.
Contin <i>et al.</i> 2005	Levodopa	104 PD.	Sem menção.	Sem menção.	Transversal. Desafio oral à levodopa.	COMT	COMT Val158Met	Parâmetros de farmacocinética. Resposta clínica no exame motor seriado. Discinesia.	Sem controle de confundidores. Os grupos genotípicos eram comparáveis em relação às características possivelmente confundidoras.	Ausência de associação com os três desfechos descritos.
Rissling <i>et al.</i> 2006	Terapia dopaminérgica.	240 DP.	Sem menção.	Clínica de Distúrbios do Movimento de dois Hospitais Universitários.	Transversal. Estudo de casos e controles.	COMT	Val158Met	Sonolência diurna.	Pareados para drogas antiparkinsonianas, duração da doença, gênero e idade.	Ausência de associação.
Paus <i>et al.</i> 2008	Terapia dopaminérgica	503 PD.	Europeus.	Estudo multicêntrico com 35 clínicas especializadas em Distúrbios do Movimento ou Hospitais Universitários.	Transversal.	DRD2	TaqIA	Demanda dopaminérgica, definida como dose equivalente de levodopa.	Controle estatístico de tempo de doença.	Ausência de associação com o desfecho.

Continua

Bialecka <i>et al.</i> 2008	Levodopa	322 PD. 357 controles.	Europeus.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	COMT	rs6269, rs4633, rs4818 e rs4680	Risco para doença de Parkinson. Dose de levodopa e complicações da terapia como desfechos secundários.	Para dose de levodopa, considerou a tomada em 5 anos de doença. Não descreve outros controles.	Haplótipo GCGG associado com DP início tardio. Dose de levodopa prescrita para pacientes com o haplótipo que codifica atividade enzimática rápida era maior. Ausência de influência sobre discinesia.
Liu <i>et al.</i> 2009	Pramipexol	30 PD.	Chineses.	Sem menção.	Estudo longitudinal. Dois meses de seguimento.	DRD2 e DRD3.	DRD2: TaqIA. DRD3: Ser9Gly.	Melhora mínima de 20% do escore total da UPDRS.	Avaliadores cegos para o genótipo do paciente. Controle para tempo de doença ou gravidade dos sintomas não foi realizado.	DRD3 Ser9Gly associou-se com resposta à droga. Grupo Ser/Ser apresentou melhora superior aos outros. Ausência de associação com o DRD2.
Arbouw <i>et al.</i> 2009	Ropinirol e pramipexol.	38 PD	Europeus.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário	Coorte histórica.	DRD2 e DRD3	DRD2: 141-C ins/del; TaqIA; (CA) _n STR. DRD3: Ser9Gly; MspI A>G	Descontinuação do uso dos agonistas.	Controle estatístico de gênero, duração da doença, tipo de agonista, uso concomitante de outras drogas antiparkinsonianas, dose diária de levodopa e uso concomitante de atípicos ou antidepressivos.	Ausência do alelo de 15x do DRD2 (CA) _n STR associado com menor taxa de descontinuação de agonistas.
Paus <i>et al.</i> 2009	Terapia dopaminérgica.	690 DP.	Sem menção.	Multicêntrico, 35 clínicas de hospitais universitários da Alemanha.	Transversal. Estudo de casos.	DRD3	Ser9Gly	Discinesia coreica, discinesia distônica e flutuação motora.	Controle estatístico de gênero, idade, idade de início, tempo de doença, dose de levodopa e Hoehn & Yahr.	Ausência de associação.
Becker <i>et al.</i> 2011	Levodopa.	7.983 sujeitos.	Europeus.	Base comunitária.	Análise de dados da coorte de Rotterdam	SLC22A1 (OCT1)	rs622342	Dose de antiparkinsonianos e sobrevida.	Coorte de casos incidentes.	Alelo C associado a maior dose de antiparkinsoniano e maior taxa de mortalidade após início da terapia com levodopa.
Corvol <i>et al.</i> 2011	Entacapone.	33 PD	Sem menção.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Ensaio clínico randomizado cruzado duplo-cego.	COMT	Val158Met	Primário: ganho no período "on". Secundário: farmacocinética da levodopa e atividade da COMT em eritrócitos.	Randomização	O ganho no período "on" foi maior no grupo Val/Val do que no grupo Met/Met. O efeito do entacapone sobre a farmacocinética da levodopa foi maior no grupo Val/Val.

Continua

Rieck <i>et al.</i> 2012	Levodopa.	199 PD.	Multiétnico	Clínica de Distúrbios do Movimento de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos.	DRD2/ANKK1	-141Cins/del, rs2283265, rs1076560, C957T, TaqIA e rs2734849.	Flutuação motora e discinesia.	Controle estatístico. Flutuação: idade, tempo de uso de levodopa, dose diária de levodopa e etnia. Discinesia: idade, tempo de uso de levodopa, dose diária de levodopa e etnia.	Haplótipo TTCTA associado com discinesia.
De Lau <i>et al.</i> 2012	Levodopa.	219 DP.	Sem menção.	Sem menção.	Coorte.	COMT	Val158Met	Risco de discinesia.	Controle estatístico de idade, gênero, duração da doença, gravidade da doença, dose de levodopa e uso de agonistas dopaminérgicos.	Alelo Met associado com maior risco de desenvolver discinesia.
Devos <i>et al.</i> 2014	Levodopa.	33 PD.	Europeus.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos.	DDC	rs921451 e rs3837091	Resposta motora determinada pela UPDRS III após desafio oral com levodopa. Parâmetros farmacocinéticos da levodopa.	Sem menção de controle. Principais características dos grupos genotípicos eram semelhantes.	Os dois polimorfismos individualmente influenciaram a resposta motora. Não houve diferença para os parâmetros farmacocinéticos.

Tabela 6: Estudos de farmacogenética na doença de Parkinson (genes associados à fisiopatologia dos eventos adversos)

Autor e ano	Fármacos	Amostra	Etnia	Cenário clínico	Desenho do estudo	Genes	Polimorfismos	Desfechos	Controle de confundidores	Resultados
De la Fuente-Fernández <i>et al.</i> 1999	Terapia dopaminérgica	105 DP.	Sem menção.	Sem acesso pela CAPES.	Transversal. Estudo de casos e controles.	APOE	Alelo $\epsilon 4$.	Alucinação.	Controle estatístico de idade, gravidade da doença, duração do tratamento, dose de levodopa e uso de agonistas.	Alelo $\epsilon 4$ associado com alucinação.
Fujii <i>et al.</i> 1999	Terapia dopaminérgica	116 DP.	Japoneses.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	CCK	-196G>A, -45C>T, 1270C>G, 6662C>T	Risco para doença de Parkinson. Alucinação.	Sem menção.	Polimorfismo -45C>T associado com alucinação.
Inzelberg <i>et al.</i> 2000	Terapia dopaminérgica	75 PD.	Israelenses.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	APOE	Alelo $\epsilon 4$.	Alucinação.	Sem menção.	Ausência de associação.
Wang <i>et al.</i> 2003	Levodopa e agonista dopaminérgico	166 PD. 160 controles	Chineses	Clínica Neurológica de Hospital Universitário	Transversal. Estudo de casos e controles.	CCK, CCKAR e CCKBR.	CCK: -45C>T. CCKAR: 779T>C. CCKBR: 1550G>A	Risco para doença de Parkinson. Alucinação visual como desfecho secundário.	Para o estudo de risco: controle pareado para idade, gênero, etnia e área de residência. Para o estudo da alucinação, grupo pareado para tempo de doença, idade de início, duração da terapia dopaminérgica e gênero.	Ausência de associação com DP. Alelo C do CCK associado com alucinação. Essa associação foi maior naqueles portadores do alelo C do CCKAR.
Goldman <i>et al.</i> 2004	Terapia dopaminérgica	86 DP.	Europeus.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Transversal. Estudo de casos e controles.	CCK, CCKAR e CCKBR.	CCK: -45C>T CCKAR: 779T>C CCKBR: 1550G>A	Alucinação.	Pareados por idade e uso de antiparkinsonianos.	Ausência de associação.
Rissling <i>et al.</i> 2005	Terapia dopaminérgica	264 DP.	Europeus.	Sem acesso pela CAPES.	Transversal. Estudo de casos e controles.	HCRT	-909T>C, -22C>T e -20C>A.	Ataque de sono.	Pareados para drogas em uso, duração de doença, gênero e idade.	Homozigoto para alelo T do polimorfismo -909T>C associado a risco de desfecho.
Feldman <i>et al.</i> 2006	Terapia dopaminérgica	87 DP.	Sem menção.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Coorte histórica.	APOE	Alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$.	Tempo para desenvolver psicose.	Controle estatístico de idade de início e presença de demência.	Maior risco para portadores do alelo $\epsilon 4$.

Continua

Lin <i>et al.</i> 2007	Levodopa.	251 DP.	Chineses.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Transversal. Estudo de casos.	ACE (gene da enzima conversora da angiotensina I)	Ins/Del do íntron 16	Flutuação motora, discinesia e psicose.	Controle estatístico de sexo, idade de início, dose de levodopa, duração da doença e duração do tratamento com levodopa.	Genótipo Ins/Ins associado com psicose induzida por levodopa.
Pascale <i>et al.</i> 2009	Levodopa	120 DP (91 em uso de levodopa). 132 controles.	Europeus	Clínica de Distúrbios do Movimento de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos e controles.	ACE (gene da enzima conversora da angiotensina I)	Ins/Del do íntron 16	Risco de doença. Flutuação motora, discinesia e psicose.	Sem menção.	Ausência de associação com risco para a doença e complicações da terapia.
Yuan <i>et al.</i> 2009	Levodopa.	48 DP em uso de levodopa. 28 DP sem uso de levodopa. 110 controles.	Sem menção.	Sem menção.	Transversal. Estudo de casos e controles.	MTHFR	C677T e A1298C.	Aumento de homocisteína.	Controle estatístico de idade, gênero e concentração sérica de vitamina B12.	Ausência de associação.
Foltynie <i>et al.</i> 2009	Levodopa	315 PD	Maioria de europeus.	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Coorte.	BDNF	Val66Met	Tempo para desenvolver discinesia.	Controle estatístico de gênero, idade de início, duração da doença e dose equivalente de levodopa.	Alelo Met associado com menor tempo para discinesia.
De Luca <i>et al.</i> 2009	Terapia dopaminérgica.	131 DP.	Europeus.	Clínica de Neurologia.	Transversal. Estudo de casos.	HOMER1	rs4704559, rs10942891 e rs4704560.	Alucinação.	Controle estatístico de gênero, idade, idade de início, Hoehn & Yahr, MEEM e UPDRS.	Alelo A do rs4704559 associado a alucinação.
Molchadski <i>et al.</i> 2011	Levodopa	155 DP.	Sem menção.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Coorte histórica.	APOE	Alelos ε2, ε3 e ε4.	Tempo para desenvolver discinesia.	Controle estatístico de gênero, idade de início, tempo de uso de levodopa e história de tabagismo.	Ausência de associação.

Tabela 7: Estudos de farmacogenética na doença de Parkinson (genes associados tanto à farmacocinética/farmacodinâmica das drogas quanto à fisiopatologia dos eventos adversos)

Autor e ano	Fármacos	Amostra	Etnia	Cenário clínico	Desenho do estudo	Genes	Polimorfismos	Desfechos	Controle de confundidores	Resultados
Goetz <i>et al.</i> 2001	Terapia dopaminérgica.	88 DP.	Europeus.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Transversal. Estudo de casos e controles.	DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 e APOE.	DRD1: -48A>G DRD2: Ser311Cys DRD3: Ser9Gly DRD4: VNTR 48pb APOE: alelo ε4.	Alucinação visual.	Pareados para idade e uso de antiparkinsonianos.	Associação com alelo do gene DRD3.
Camicioli <i>et al.</i> 2005	Terapia dopaminérgica.	47 DP.	Sem menção.	Clínica de Distúrbios do Movimento.	Coorte histórica	COMT e APOE.	COMT: Val158Met. APOE: alelos ε2, ε3 e ε4.	Alucinação.	Controle estatístico de idade de início, presença de demência, duração do tratamento e gênero.	Ausência de associação.
Strong <i>et al.</i> 2006	Levodopa.	92 PD com discinesia .	Maioria europeus	Clínica de Neurologia de Hospital Universitário.	Transversal. Estudo de casos.	Gene do receptor opioide mu. DRD2.	Mu: A118G. DRD2: (CA) _n STR,	Tempo para desenvolver discinesia.	Quinze marcadores de ancestralidade para avaliar estrutura populacional (sem evidência de estratificação).	Alelo G do A118G do gene do receptor opioide mu associado com discinesia precoce. Genótipo 14x/15x do DRD2 também associou-se a discinesia precoce.
Lee <i>et al.</i> 2011	Levodopa.	503 DP. 559 controles.	Coreanos.	Clínica de Distúrbios do Movimento de Hospital Universitário.	Coorte.	DRD2, DRD3, GRIN2B e SLC6A4.	DRD2: Taq1A. DRD3: Ser9Gly. GRIN2B: 2664C>T, 366C>G e -200T>G. SLC6A4: região promotora.	Discinesia bifásica e discinesia de pico de dose.	Controle estatístico de gênero, idade de início, Hoehn & Yahr, tempo de uso de levodopa.	Genótipo AA do DRD3 Ser9Gly associou-se com discinesia bifásica.

Nas tabelas 5 a 7, encontram-se o conjunto de publicações que utilizaram como fator de estudo polimorfismos em genes que estivessem diretamente relacionados ao transporte, ação e metabolização da dopamina e das principais drogas dopaminérgicas. Os genes dos receptores de dopamina (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* e *DRD5*) foram os mais estudados e codificam as moléculas responsáveis pela ação da dopamina e seus agonistas nos neurônios pré- e pós-sinápticos. Ênfase maior foi dada ao estudo do *DRD2*, pois apresenta importante função no controle motor da via nigroestriatal. Os genes que codificam as enzimas responsáveis pela degradação da dopamina (*COMT* e *MAOB*) foram alvo de estudos e menção especial deve ser feita a um polimorfismo da *COMT*. O polimorfismo Val158Met foi escolhido como gene candidato em diversos estudos de farmacogenética da DP pois apresenta funcionalidade biológica; homozigotos para o alelo Met apresentam atividade enzimática 3-4 vezes menor (Lachman *et al.*, 1996). Na linha das moléculas transportadoras, diversos estudos avaliaram o gene do transportador de dopamina *DAT*. O transportador de serotonina *5HTT* também foi estudado, uma vez que apresenta função no transporte de dopamina. Um estudo avaliou o gene *SLC22A1* (*OCT1*), que codifica um transportador de diversos compostos endógenos e drogas, incluindo dopamina, levodopa, pramipexol e amantadina (Koepsell *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2011). Por fim, um estudo recente avaliou polimorfismos no gene que codifica a enzima dopa-decarboxilase (*DDC*), que é responsável pela conversão da levodopa, tanto endógena como exógena, em dopamina (Devos *et al.*, 2014).

Ainda considerando esse grupo de estudos, os desfechos e suas definições foram variados. Paus *et al.* (2004) e Rissling *et al.* (2004) avaliaram ataques de sono, efeito adverso bem conhecido com o uso de agonista dopaminérgico, mas que também pode ocorrer com o uso de levodopa. O primeiro encontrou associação do desfecho com o gene *DRD4* e o segundo com o *DRD2*. Sonolência diurna excessiva foi associada com o polimorfismo Val158Met da *COMT* por Frauscher *et al.* (2004), porém esse mesmo efeito não foi observado por Rissling *et al.* (2006) em uma amostra maior.

Avaliando alterações neuropsiquiátricas, Makoff *et al.* (2000) estudaram alucinação de qualquer modalidade e dividiram os pacientes entre os que

apresentavam esse sintoma antes ou depois de 5 anos de doença. Alucinação tardia, após 5 anos de doença, foi associada com o *DRD2*. Já Kaiser *et al.* (2003) relataram associação do *DAT* com o surgimento precoce de sintomas psicóticos. Goetz *et al.* (2001) associaram alucinação visual com polimorfismo do *DRD3*.

Bialecka *et al.* (2004) associaram o genótipo Met/Met do polimorfismo Val158Met da *COMT* com o uso de doses menores de levodopa em 5 anos de doença. Esse mesmo grupo avaliou quatro polimorfismos diferentes na *COMT*, na tentativa de melhor predição da atividade enzimática, e associaram o haplótipo que determinava atividade rápida com maiores doses de levodopa (Bialecka *et al.*, 2008). Becker *et al.* (2011) também estudaram a dose utilizada de levodopa e demonstraram que o alelo C do polimorfismo rs622342 no gene *SLC22A1* (*OCT1*) associou-se com o uso de doses maiores de levodopa.

Ao estudar discinesia induzida por levodopa, Oliveri *et al.* (1999), Zappia *et al.* (2005) e Strong *et al.* (2006) demonstraram associação deste desfecho com polimorfismos no gene *DRD2*. Mais recentemente, Rieck *et al.* (2012) demonstraram efeito semelhante ao estudar um haplótipo do *DRD2*, enquanto que Wang *et al.* (2001) encontraram associação deste gene também com flutuação motora. Kaiser *et al.* (2003) descreveram a associação de discinesia com um polimorfismo no gene do *DAT*. Lee *et al.* (2011) foram os únicos até o momento a dividir os pacientes entre discinesia de pico de dose e discinesia bifásica. Encontraram associação apenas da discinesia bifásica com um polimorfismo no gene *DRD3*. De Lau *et al.* (2012), ao seguir um grupo de 219 pacientes livres de discinesia, observaram que portadores do alelo Met do polimorfismo Val158Met da *COMT* apresentavam um maior risco de discinesia. Esse achado, no entanto, não foi observado em outros estudos (Watanabe *et al.*, 2003; Contin *et al.*, 2005).

Devos *et al.* (2014) avaliaram a resposta motora e parâmetros farmacocinéticos da levodopa após desafio oral com esta medicação e encontraram associação de dois polimorfismos no gene *DDC* com resposta motora, medida pela UPDRS. A ausência de efeito deste polimorfismo sobre parâmetros farmacocinéticos pode sugerir um efeito apenas central deste polimorfismo.

Corvol *et al.* (2011) inovaram no sentido de realizar um ensaio clínico orientado por informação genética. Esses pesquisadores selecionaram dois grupos de pacientes com doença de Parkinson homozigotos para o polimorfismo Val158Met da *COMT* (um grupo Val/Val e outro Met/Met) e observaram o efeito da administração concomitante de entacapone (inibidor da *COMT*) e levodopa sobre a resposta motora e parâmetros farmacocinéticos. Eles demonstraram que a resposta motora com o uso de entacapone foi maior entre os homozigotos Val/Val (atividade enzimática rápida). Esses autores verificaram também maior variação nos parâmetros farmacocinéticos.

Liu *et al.* (2009) conduziram um estudo de seguimento de 2 meses com pacientes em uso de pramipexol, um agonista dopaminérgico, e associaram melhor resposta motora a um polimorfismo no *DRD3*. Arbouw *et al.* (2009) associaram maior taxa de descontinuação de agonistas dopaminérgicos (pramipexol e ropinirole) a um polimorfismo do *DRD2*.

Nas tabelas 6 e 7, encontram-se o conjunto de publicações que utilizaram como fator de estudo polimorfismos em genes associados à possível fisiopatologia dos eventos adversos em estudo. O gene da apolipoproteína E (*APOE*) talvez seja o caso de maior sucesso da época dos estudos de associação de risco de doença esporádica com genes candidatos. A presença do alelo $\epsilon 4$ é um fator de risco estabelecido para a doença de Alzheimer esporádica, aumentando em até 7 vezes o seu risco (Corder *et al.*, 1993). É uma molécula com papel na depuração do β -amiloide e tem importância na manutenção da sinapse colinérgica. Estudos deste polimorfismo na doença de Parkinson são inconsistentes, porém esse gene parece estar associado com demência na doença de Parkinson (Huang *et al.*, 2006). De la Fuente-Fernández *et al.* (1999) mostraram associação do alelo $\epsilon 4$ com alucinação e Feldman *et al.* (2006) com sintomas psicóticos. Entretanto, três outros estudos não encontraram associação da *APOE* com psicose (Inzelberg *et al.*, 2000; Goetz *et al.*, 2001; Camicioli *et al.*, 2005).

A colecistocinina (CCK) é uma proteína que desempenha um papel na modulação da neurotransmissão dopaminérgica no sistema nervoso central, especialmente no circuito mesocorticolímbico (Rotzinger *et al.*, 2002).

Polimorfismos no gene *CCK* e nos seus receptores *CCKAR* e *CCKBR* foram estudados por três grupos (Fujii *et al.*, 1999; Jian Wang *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Apenas Wang *et al.* (2003) encontraram associação entre polimorfismos nos genes *CCK* e *CCKAR* e alucinação visual.

A enzima conversora da angiotensina tem seu papel mais conhecido como sendo a conversão de angiotensina I para angiotensina II. Entretanto, alta concentração dessa enzima foi encontrada nos núcleos da base e evidências sustentam sua relação com a neurotransmissão dopaminérgica e a doença de Parkinson (Labandeira-Garcia *et al.*, 2013). Lin *et al.* (2007) estudaram um polimorfismo no gene que codifica essa enzima, *ACEI*, e encontraram associação com psicose induzida por levodopa. Esse achado não foi confirmado em uma investigação posterior (Pascale *et al.*, 2009).

Considerando a ideia de que as complicações induzidas pelo uso crônico de terapia dopaminérgica podem estar relacionadas a mecanismos alterados de plasticidade sináptica e neuronal (Linazasoro, 2005), alguns estudos começaram a ser realizados com genes associados a fatores de crescimento neuronal e genes associados a neurotransmissão glutamatérgica. Foltynie *et al.* (2009) acompanharam 315 pacientes com doença de Parkinson livres de discinesia para determinar o tempo para o desenvolvimento de discinesia. Nessa coorte, o tempo para desenvolver discinesia foi menor nos portadores do alelo Met do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. De Luca *et al.* (2009) investigaram o gene *HOMER1*, que codifica uma molécula chave na transdução de sinal glutamatérgico e tem papel nos mecanismos de plasticidade celular. Esse grupo encontrou associação de um polimorfismo neste gene com alucinação visual.

1.5 Polimorfismos estudados nesta tese

DAT

O transportador de dopamina (DAT) é um dos principais responsáveis pela eliminação da dopamina da fenda sináptica, transportando esse neurotransmissor para dentro do neurônio pré-sináptico. Uma vez no neurônio, a dopamina é levada para as vesículas sinápticas por transportadores específicos. 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 uma relação direta com a expressão gênica desta molécula, ressaltando sua importância como um possível fator determinante para a 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). Muitos polimorfismos já foram descritos neste gene, tanto na região codificadora quanto intrônica. No entanto, o polimorfismo mais investigado é um VNTR (“variable number of tandem repeat”) no éxon 15 na região 3’ não traduzida do gene. Dez alelos diferentes já foram identificados correspondendo a presença de 3 a 13 cópias da unidade de repetição de 40 pares de base. O alelo de 10 cópias é o mais prevalente em todo o mundo, embora o alelo de 9 repetições também seja comum (Vandenberg *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1999).

Através de estudo de imagem (SPECT) com beta-CIT (um ligante do DAT), observou-se que alelos com menos repetições se associaram a menor ligação ao DAT, sugerindo menor expressão gênica para esses alelos (Heinz *et al.*, 2000). Esse achado foi também encontrado em estudos de expressão gênica (Fuke *et al.*, 2001; Michelhaugh *et al.*, 2001; VanNess *et al.*, 2005), porém não foi confirmada por outros (Martinez *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2003). Ainda com a

mesma técnica de SPECT, demonstrou-se maior disponibilidade de DAT para os portadores do alelo de 9 repetições (van de Giessen *et al.*, 2009). O verdadeiro efeito funcional deste polimorfismo ainda é tema para discussão.

Essa possível diferença da expressão do DAT poderia tornar indivíduos com alelos associados à maior expressão mais susceptíveis à DP, uma vez que a captação de neurotoxinas se dá através desse transportador. Um estudo australiano descreveu risco aumentado de DP para os portadores do alelo de 11 repetições (Le Couteur *et al.*, 1997), posteriormente replicado em uma população oriental (Kim *et al.*, 2000). Entretanto, outros estudos não replicaram esse resultado (Planté-Bordeneuve *et al.*, 1997; Leighton *et al.*, 1997; Mercier *et al.*, 1999; Nicholl *et al.*, 1999; Goudreau *et al.*, 2002). Contrariamente, há ainda evidências que apontam para um efeito pequeno, mas significativo, para a presença do alelo de 9 repetições como fator de risco para doença de Parkinson (Kelada *et al.*, 2005; Ritz *et al.*, 2009). Kelada *et al.* (2005) observaram que o alelo de 9 repetições era mais frequente apenas na população com idade de início da doença igual ou acima de 60 anos, o que vai ao encontro da ideia de que hajam diferentes “doenças de Parkinson” que poderiam ter a idade de início como fator discriminante. Já Ritz *et al.* (2009), observaram que a frequência do alelo de 9 repetições estava aumentada em pacientes expostos a pesticidas, sugerindo uma interação entre genética e toxinas ambientais. Lin *et al.* (2003) observaram ainda que os pacientes homocigotos para o alelo de 10 repetições poderiam estar protegidos para o desenvolvimento da doença. No entanto, a metanálise realizada por Tan *et al.* (2000) não demonstrou efeito para a presença dos alelos 9 e 10 repetições no risco de doença de Parkinson.

Os estudos que buscaram associação deste polimorfismo com resposta à levodopa são escassos. Contin *et al.* (2004), utilizando a metodologia do desafio oral de levodopa, não encontraram associação entre os portadores do alelo de 9 ou 10 repetições com discinesia ou flutuação motora. Enquanto que Kaiser *et al.* (2003) observaram associação entre a presença do alelo de 9 repetições e a ocorrência de psicose ou discinesia.

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 & Kelsoe, 2003; Kelada *et al.*, 2005). Essa região é um forte promotor não-específico em estudos *in vitro*, o que levantou a hipótese da presença de regiões silenciadoras que se ligassem a moléculas tecido-específicas, explicando sua expressão exclusiva em neurônios dopaminérgicos (Kouzmenko *et al.*, 1997; Sacchetti *et al.*, 1999; Bannon *et al.*, 2001). Rubie *et al.* (2001) identificaram cinco polimorfismos da região 5' que estariam relacionados a sítios de ligação com silenciadores da expressão gênica. Dentre esses polimorfismos, o alelo T do polimorfismo -839C/T determinaria a introdução de um sítio de ligação para uma proteína líder 1 (LBP-1), que inibiria a transcrição. Entretanto, Kelada *et al.* (2005) demonstraram menor expressão gênica *in vitro* para portadores do alelo C.

Apesar de muitos trabalhos estudando a relação dos polimorfismos da região 5' do *DAT* em outras doenças, apenas dois avaliaram essa região na DP. Ritz *et al.* (2009) associaram polimorfismos da região promotora 5' com maior risco para a doença, principalmente em pacientes expostos a pesticidas. Já Kelada *et al.* (2005) não observaram associação entre haplótipos dessa região e a DP. 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.

COMT

Uma das principais rotas de degradação enzimática da dopamina, e das demais catecolaminas, é a catecol-orto-metil transferase (COMT). É uma enzima intracelular, localizada nos neurônios pós-sinápticos, que age através da ligação de um grupo metila na molécula de catecolamina. A COMT também é encontrada em outras partes do corpo, com alta concentração no fígado, rins e trato gastrointestinal, o que contribui, em parte, para a degradação periférica da levodopa administrada aos pacientes. A função geral dessa enzima é a eliminação tanto de endo- quanto de xenobióticos que apresentam grupo catecol e alguns metabólitos hidroxilados (Männistö *et al.*, 1992; Zhu, 2002).

Desde a década de 70, através de estudos em hemácias, é conhecida uma variação interindividual na atividade da COMT que, posteriormente, atribuiu-se, em parte, a um polimorfismo genético (Zhu, 2002). O gene da *COMT* está

localizado no cromossomo 22q11 e apresenta um polimorfismo, uma transição de guanina (G) por adenina (A) na posição 158 do éxon 4, que determina uma substituição de valina (Val) por metionina (Met) na estrutura primária da proteína. A homozigose para o alelo A (Met) determina uma diminuição de três a quatro vezes na atividade enzimática (Lachman *et al.*, 1996). Os estudos deste polimorfismo na DP iniciaram com a busca de algum efeito no risco de desenvolver a enfermidade. Kunugi *et al.* (1997) encontraram uma maior frequência do genótipo Met/Met em uma amostra de parkinsonianos de origem oriental, enquanto que Yoritaka *et al.* (1997) encontraram resultados opostos. Bialecka *et al.* (2005), em uma amostra de poloneses, descreveram resultados contrários aos de Kunugi *et al.* (1997), sugerindo que o genótipo Met/Met poderia exercer um efeito protetor para a doença. Wu *et al.* (2001) observaram uma interação entre esse polimorfismo e outro no gene *MAOB*. Portadores do alelo G do polimorfismo do íntron 13 da *MAOB* apresentaram maior risco para desenvolver DP e esse efeito foi potencializado pela presença do alelo Met da *COMT*, sugerindo uma interação entre esses dois polimorfismos. Entretanto, a associação do polimorfismo Val158Met da *COMT* não foi confirmada em outros estudos (Syvänen *et al.*, 1997; Hernán *et al.*, 2002b) e nem em duas meta-análises (Tan *et al.*, 2000; Wang & Yang, 2012). Recentemente, Klebe *et al.* (2013) demonstraram que o alelo Val estava associado a idade de início precoce da doença entre os homens em uma amostra de aproximadamente 6 mil pacientes.

Antes dos estudos farmacogenéticos deste polimorfismo com a levodopa, Rivera-Calimlim *et al.* (1977) observaram que pacientes com atividade eritrocitária rápida da *COMT* apresentavam pior resposta à levodopa, o que foi confirmado por Reilly *et al.* (1980). Porém, Woitalla *et al.* (2000) não encontraram diferença na atividade enzimática da *COMT* entre pacientes com ou sem flutuação da resposta motora (“wearing-off” e “on-off”).

Lee *et al.* (2001) e Contin *et al.* (2005), utilizando desafio oral com levodopa e determinando resposta clínica e perfil farmacocinético e farmacodinâmico, não encontraram associação do polimorfismo Val158Met da *COMT* com os parâmetros avaliados. Watanabe *et al.* (2003) descreveram uma

tendência à maior frequência do genótipo Met/Met estar presente entre os pacientes com flutuação ou discinesia. Bialecka *et al.* (2004) dividiram a amostra de pacientes entre aqueles que usavam mais ou menos de 500mg de levodopa por dia no quinto ano de tratamento e encontraram frequência aumentada do genótipo Met/Met da *COMT* entre aqueles que necessitavam de doses menores que 500mg/dia, sugerindo que os pacientes com genótipo lento poderiam obter maior benefício da levodopa. Através de análise conjunta de quatro polimorfismos distintos no gene da *COMT*, Bialecka *et al.* 2008 encontraram 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. Ausência de associação entre presença de psicose e esse polimorfismo foi descrita em apenas um trabalho (Camicoli *et al.*, 2005). Em uma coorte que acompanhou 219 pacientes livres de discinesia, de Lau *et al.* (2012) encontraram associação entre o alelo Met com maior risco de discinesia.

HOMER1

HOMER1 é uma proteína localizada na densidade pós-sináptica altamente expressa no cérebro, com menor expressão em outros tecidos. Apresenta papel importante nos processos de plasticidade sináptica e neurotransmissão glutamatérgica (Thomas, 2002; Luo *et al.*, 2012). Sua extremidade N-terminal apresenta um domínio conservado EVH1, que interage com proteínas que apresentam motivo PPXXF, como receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1 e mGluR2), IP₃R, Shank e outras. Sua extremidade C-terminal apresenta um domínio helicoidal que proporciona auto-associação. O gene que codifica essa proteína está localizado no cromossomo 5 e se expressa com dois produtos gênicos diferentes, determinados por "splicing" alternativo. Homer1b/c apresenta os domínios N- e C- terminais previamente descritos e é chamado de forma longa. É expresso de maneira constitutiva e forma dímeros conectando proteínas diferentes (e.g. conecta mGluR1 com proteínas sinalizadoras, como Shank ou IP₃R). Homer1a é a forma curta da proteína e não apresenta o domínio C-terminal, o que impede a formação dos dímeros. É considerado um produto gênico de resposta imediata sendo traduzido apenas sob ativação neuronal.

Estudos prévios com modelo animal de parkinsonismo demonstraram uma superexpressão da forma Homer1a após a administração de agonistas dopaminérgicos (Berke *et al.*, 1998; Sgambato-Faure *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2007). Henning *et al.* (2007) observaram que a estimulação elétrica em alta frequência do núcleo subtalâmico, semelhante à estimulação administrada aos pacientes com implante de eletrodo cerebral profundo para tratamento da DP, apresentaram aumento da expressão de Homer1a. Essas evidências sugerem associação desta proteína com as terapias sintomáticas atualmente utilizadas no tratamento da DP.

Polimorfismos no gene *HOMER1* já foram associados com autismo, depressão e adição à cocaína (Dahl *et al.*, 2005; Rietschel *et al.*, 2010; Kelleher *et al.*, 2012; Strauss *et al.*, 2012). Um estudo prévio encontrou associação do alelo A do polimorfismo rs4704559 deste gene com alucinação em pacientes com DP (De Luca *et al.*, 2009).

Capítulo 2: Justificativa e Objetivos

Justificativa

Com a estimativa de envelhecimento populacional para as próximas décadas em nosso país (Carvalho & Rodríguez-Wong, 2008), as doenças neurodegenerativas, que usualmente acometem indivíduos a partir da sexta década de vida, sofrerão um incremento significativo em sua incidência e prevalência, determinando novos cenários para a saúde pública e um desafio crescente para a Medicina. Entre essas afecções, a doença de Parkinson é a segunda mais freqüente. O estudo de seus mecanismos fisiopatológicos e estratégias de tratamento tornam-se um tema cada vez mais importante para a sociedade. A levodopa proporciona um bom controle dos sintomas motores da doença de Parkinson, entretanto, em uma parcela dos pacientes, seu uso se restringe, tendo em vista as complicações que surgem do seu uso crônico. Essas complicações determinam diminuição da qualidade de vida, aumento de custos do tratamento e são um desafio ao médico assistente. Portanto, é fundamental o estudo de fatores que possam estar associados a essas complicações induzidas pela terapia dopaminérgica, o que poderá fornecer valiosas ferramentas para orientar as condutas clínicas, tanto no sentido de minimizar esses efeitos adversos quanto no sentido de tentar evitá-los.

Objetivos

1. Determinar marcadores clínicos em associação com as complicações induzidas pela terapia dopaminérgica.
2. Determinar a possível associação entre polimorfismos nos genes *DAT*, *COMT* e *HOMER1* e complicações induzidas por levodopa (flutuação motora, discinesia e alucinação visual) e demanda dopaminérgica (dose equivalente de levodopa) em uma amostra de pacientes com doença de Parkinson.

Capítulo 3: Parkinson's disease first symptom is a predictor of motor complications induced by dopaminergic therapy.

Manuscrito em fase de preparação a ser submetido ao periódico Parkinsonism and Related Disorders.

Parkinson's disease first symptom is a predictor of motor complications induced by dopaminergic therapy

Artur F Schumacher-Schuh^{1,2}; Mariana Rieck¹; Márcio S Medeiros²; Mara H Hutz¹; Carlos RM Rieder².

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Artur F Schumacher-Schuh

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS.

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2040

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS

Brazil

Phone: +55 51 3359 8520

E-mail: aschuh@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background: Parkinson's disease (PD) has an effective symptomatic treatment. However, the long-term use of this treatment is associated with unwanted events in a proportion of patients, like motor fluctuation and dyskinesia. The study of factors associated with these complications is warranted.

Objectives: to determine the association of first motor symptom and the development of motor complications induced by dopaminergic therapy in Brazilian PD patients.

Methods: unrelated PD patients in use of chronic dopaminergic therapy were enrolled in a cross-sectional study. They were submitted to a structured interview and a trained physician applied UPDRS scale, Hoehn & Yahr Scale and Schwab & England scale. Main outcome measures were motor fluctuation and dyskinesia, defined by Unified Parkinson Disease Rating Scale part IV.

Results: a total of 225 patients were included. Tremor as first symptom manifestation was associated with a lower prevalence of dyskinesia. Moreover, these patients presented higher scores of tremor in the current examination.

Conclusions: these results suggest that a simple historical information like the first motor symptom could predict development of complications induced by levodopa therapy.

Keywords: Parkinson's disease, motor fluctuation, dyskinesia, levodopa.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that affects 1-3% of people older than 60 years and is characterized by motor and non-motor symptoms (de Lau and Breteler, 2006). A deficiency of dopaminergic transmission has a major role in the development of motor symptoms and drugs that enhance this neurotransmission are used as treatment. Levodopa is a dopamine precursor and provides the best symptomatic effect, but its chronic use is associated with complications, like motor fluctuation and dyskinesia (Hauser et al., 2006).

Motor complications induced by levodopa (MCL) impact patients' quality of life and have few management options (Dodel et al., 2001). Approximately 40% of patients treated with levodopa may develop dyskinesia and/or motor fluctuation by 4-6 years of treatment, increasing the frequency over the years (Ahlskog and Muentner, 2001). Little is known about the development of these side effects and the prediction of a subgroup of patients more susceptible is a matter of interest. The association of MCL with different clinical subtypes of PD and other clinical features has been poorly investigated, but a protective effect of tremor as the first motor symptom manifestation on the development of dyskinesia was suggested (Kipfer et al., 2011). Recently, this finding was replicated in another investigation (Zhang et al., 2013). The relation of the first motor symptom and the risk of motor fluctuation is not clear.

To better delineate risk profiles for the development of motor complications induced by levodopa is an important effort that can help understand these phenomena and could impact clinical practice. In this cross-sectional study our aim was to determine the association of first motor symptom with dyskinesia and motor fluctuation in Brazilian PD patients. The impact of the first motor symptom on the future PD phenotype was also investigated.

METHODS

This report is part of an ongoing cohort for the investigation of chronic complications of levodopa in Brazilian Parkinson's disease patients. More information could be assessed in previous studies (Rieck et al., 2012; Schumacher-Schuh et al., 2013). Briefly, PD patients were recruited and evaluated at the Movement Disorder Clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from 2006 to 2012. Diagnosis of idiopathic PD was made in accordance with UK Parkinson Disease Society Brain Bank criteria (Hughes et al., 1993) and revised by one of the investigators (CRMR), an experienced neurologist in movement disorders. The inclusion criteria were the use of at least 200mg of levodopa for one year or more with an initial good response to the drug. Patients with atypical manifestations or secondary parkinsonism were excluded. The hospital Ethics Committee approved the study and all participants gave written informed consent.

Patients were submitted to a structured interview and a trained physician applied the four parts of the Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS) (Fahn and Elton, 1987), Hoehn & Yahr (HY) scale (Hoehn and Yahr, 1967) and Schwab & England (SE) scale (Schwab and England, 1969) while they were "on" antiparkinsonian drugs effect. From UPDRS part III (motor examination), subscores were calculated with the sum of questions: rest tremor, question 20; action tremor, question 21; rigidity, question 22; bradykinesia, questions 23, 24, 25 and 26; axial motor symptoms, questions 18, 27, 28, 29 and 30. First motor symptom was defined as the first and most important cardinal motor symptom perceived by patient and/or family members. It was categorized between tremor and rigidity/bradykinesia. The main outcomes investigated were dyskinesia, defined by (1) a score of one or more in question 32 of the UPDRS and/or (2) any change in medical treatment due to dyskinesia (e.g. adjustment in dopaminergic therapy or use of amantadine due to dyskinesia) and motor fluctuation, defined by (1) a score of one or more in question 39 of the UPDRS and/or (2) use of COMT inhibitors. Levodopa equivalent dose was defined by the equation that included dopamine agonists and COMT inhibitors as previously described (Tomlinson et al., 2010). Historical information was corroborated by caregivers or relatives as well as reviewed in medical records.

Univariate analyses were performed with Student t-test for parametric data and with Wilcoxon-Mann-Whitney U test for non-parametric data. Association between two categorical data was determined by χ^2 or Fisher's exact test. Multiple Poisson regression analysis with robust variance estimators was used to assess the effect of the first symptom (tremor vs. non-tremor) in the occurrence of outcomes. Confounders to be entered in the models were defined based on literature review or on statistical criteria (association with study factor and outcome with a $P \leq 0.10$) (Kipfer et al., 2011; Zhang et al., 2013). Conceptual confounders were age at onset, disease duration and levodopa equivalent dose. Poisson regression was employed because the outcomes were not rare events in our sample (Barros and Hirakata, 2003). All analyses were performed using SPSS version 18 software and a 2-tailed significance level of 5% was considered significant.

RESULTS

A total of 225 patients were included in this study. Demographic and clinical characteristics of the patients, overall and according to first motor symptom or to outcomes (motor fluctuation and dyskinesia) are given in tables 1 and 2. The mean age at onset was 58.29 ± 11.41 years old and disease duration was 8.62 ± 5.13 years. Tremor as first motor symptom occurred in 163 (72.4%) patients. These patients presented higher scores of rest and action tremor in the present evaluation.

Motor fluctuation affected 183 (81.3%) patients and they had an earlier age at onset, longer disease duration, were on higher doses of dopaminergic agents and had higher intakes of levodopa per day. These patients also had higher disease severity (HY scale), higher impact in daily living activities (SE scale and UPDRS II) and higher scores in UPDRS I (measure of cognitive and behavioral problems) and UPDRS IV (composite score for complications of levodopa therapy). The subscores of motor examination showed that patients with motor fluctuation had higher score in bradykinesia and axial motor symptoms. Motor fluctuation was also associated with a lower prevalence of subjects experiencing tremor as first motor symptom.

Dyskinesia affected 97 (43.1%) patients and they had an earlier age at onset, longer disease duration, were on higher doses of dopaminergic agents and had higher intakes of levodopa per day. This outcome was not associated with disease severity, activities of daily living or scores in UPDRS I, II and III. They presented higher scores in UPDRS IV. The subscores of motor examination showed that patients with dyskinesia presented lower tremor scores, mainly rest tremor. Dyskinesia was also associated with a lower prevalence of subjects experiencing tremor as first motor symptom. Motor fluctuation and dyskinesia were associated ($\chi^2 = 10.77$; $P < 0.001$).

Multiple Poisson regression analysis was conducted to assess the association of first motor symptom and motor fluctuation and dyskinesia, as shown in univariate analyses. For dyskinesia, confounders to be entered in the model were age at onset, through statistical and conceptual criteria, and disease duration and levodopa equivalent dose through conceptual criteria (Kipfer et al., 2011;

Zhang et al., 2013). Since age at onset and disease duration was highly correlated ($P < 0.001$), just age at onset was included in the model to avoid multicollinearity. Tremor as first motor symptom manifestation showed a protective effect for the development of dyskinesia (Prevalence Ratio = 0.66 [95%CI 0.50 – 0.88]; $P = 0.005$; table 3). For motor fluctuation, confounders to be entered in the model were disease duration and levodopa equivalent dose through conceptual criteria. Age at onset qualified as a statistical confounder, but, as the same case for dyskinesia, was not included in the model. Tremor as first motor symptom manifestation was not associated with motor fluctuation after adjustment for confounders (Prevalence Ratio = 0.92 [95%CI 0.82 – 1.02]; $P = 0.114$; table 3).

DISCUSSION

The main finding of this study is that first motor symptom manifestation can predict the appearance of dyskinesia in PD patients on dopaminergic agents therapy. We also demonstrated that those patients referring tremor as first motor symptom persisted with higher scores of rest tremor in the evolution of the disease. Patients with dyskinesia had lower current tremor scores.

PD is marked by a considerable heterogeneity in clinical presentation and in pharmacological response and efforts were made in order to establish criteria to subtype the disorder (Marras and Lang, 2013). Tremor is a common symptom of PD, especially rest tremor. In a study with pathologically confirmed PD sample, resting tremor was present in 69% of patients at the time of diagnosis and was never experienced in 23% only (Hughes et al., 1993). The first symptom appearance other than tremor was also associated with more severe Lewy body pathology with an increased risk of dementia (Selikhova et al., 2009). Resting tremor as a predominant manifestation is usually associated with a slower progression and milder parkinsonian signs other than tremor, suggesting a subgroup of patients with a “benign tremulous parkinsonism” (Josephs et al., 2006; Rajput et al., 2009). Although this symptom was consistently associated with dopaminergic deficit, it was not related to the degree of nigral degeneration, which could explain the relatively refractoriness of this symptom to dopaminergic therapies. Its pathophysiology is poorly understood and it is not explained solely by dopaminergic deficit, but by a proposed complex network interaction with different brain regions and neurotransmitters (Timmermann et al., 2003).

Asking patients if their first motor symptom manifestation was tremor is an easily elicited question that was poorly investigated in the literature. Kipfer et al. (2011) evaluated 85 patients in a cross-sectional study and found that those patients referring tremor as first motor symptom had a lower prevalence of dyskinesia. The present work replicated this result in a larger sample, which strengthens the evidence for this feature as a predictor of future dyskinesia and suggests that motor fluctuation is also influenced by first motor symptom. Moreover, our data suggested that this simple historical information predicted future phenotype, since patients referring tremor as first motor symptom also had

a higher score of tremor in the present evaluation. Zhang et al. (2013) conducted a similar study, but instead of using historical information of first motor symptom, they used tremor dominant subtype, derived from the UPDRS III score in the time of examination. They found that those patients classified as tremor dominant had a decreased prevalence of dyskinesia. Taken together, these results suggest that if a patient refers that his or her first motor symptom was tremor, this could predict current phenotype (higher tremor scores) and a lower risk for development of dyskinesia.

Levodopa response diary is the best method to assess MCL and is used in clinical trials, but demands an increased effort to be achieved (Hauser et al., 2004). Most cross-sectional studies assessed this outcome asking the patient if he or she experience parkinsonian symptoms before the next levodopa dose (Kipfer et al., 2011; Zhang et al., 2013). This is the method used in UPDRS and in this present work, but is quite imprecise, since levodopa response depends on a wide variety of factors and a memory bias could not be excluded. In univariate analysis, tremor as first motor symptom was associated with lower prevalence of motor fluctuation, but this result was not significant after controlling for confounders. Of note, patients with tremor as first motor symptom had a lower number of levodopa intakes per day, what could indirectly represents less motor fluctuation. Future studies, preferably with levodopa response diary, are warranted to elucidate this point.

Motor fluctuation was present in 183 (81.3%) patients and dyskinesia in 97 (43.1%) of our sample, in the same range described by previous studies (Ahlskog and Muenter, 2001; Hauser et al., 2006). These outcomes were associated with each other, what could represent a similar pathogenesis. Age at onset was earlier in the presence of both motor complications, a feature previously recognized and in accordance with the neuroplastic hypothesis for development of dyskinesia (Linazasoro, 2005). Use of dopaminergic agents were higher both in patients with motor fluctuation and dyskinesia; if this finding represents a simple consequence of a more advanced disease or if it has any influence in the presence of motor complications is a matter of debate. Motor fluctuation was associated with higher disease severity and greater impact in activities of daily living, but this was not

observed in patients with dyskinesia, reinforcing the idea that dyskinesia, at least in mild forms, causes little impact in patients' lives.

These results should be interpreted considering some limitations. The present study is cross-sectional, which is always a concern, especially in a progressive disorder like PD. Conducting a longitudinal study applying levodopa response diaries to detect motor fluctuation and sequential evaluation of levodopa challenge test to detect dyskinesia would be preferable, although it would be difficult in a large sample. At last, a memory bias for the assessment of first motor symptom could not be excluded. However, our results were robust enough to replicate the findings of Kipfer et al. (2011) and are in accordance with the results of Zhang et al. (2013).

The findings reported herein add important concepts to achieve personalized medicine in PD. Our results suggest that the first motor symptom referred by the patient in PD can delineate subtypes of patients more predisposed to develop important side effects of levodopa therapy, especially dyskinesia. Since PD is a progressive disorder with a great variability in pharmacological response, this simple information could be used to guide long-term strategies of treatment and better select patients for future clinical trials of drugs or surgical procedures.

BIBLIOGRAPHY

- Ahlskog, J.E., Muentner, M.D., 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord* 16, 448–458.
- Barros, A.J.D., Hirakata, V.N., 2003. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* 3, 21.
- De Lau, L.M.L., Breteler, M.M.B., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 5, 525–535.
- Dodel, R.C., Berger, K., Oertel, W.H., 2001. Health-related quality of life and healthcare utilisation in patients with Parkinson's disease: impact of motor fluctuations and dyskinesias. *Pharmacoeconomics* 19, 1013–1038.
- Fahn and Elton, 1987. UPDRS Program Members. Unified Parkinson Disease Rating Scale. In *Recent Developments in Parkinson Disease 2*, 153-63. Florham Park, NJ: Macmillan Healthcare Information.
- Hauser, R.A., Deckers, F., Leher, P., 2004. Parkinson's disease home diary: further validation and implications for clinical trials. *Mov. Disord.* 19, 1409–1413.
- Hauser, R.A., McDermott, M.P., Messing, S., 2006. Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 63, 1756–1760.
- Hoehn, M.M., Yahr, M.D., 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17, 427–442.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Blankson, S., Lees, A.J., 1993. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 50, 140–148.
- Josephs, K.A., Matsumoto, J.Y., Ahlskog, J.E., 2006. Benign tremulous parkinsonism. *Arch. Neurol.* 63, 354–357.
- Kipfer, S., Stephan, M.A., Schüpbach, W.M.M., Ballinari, P., Kaelin-Lang, A., 2011. Resting tremor in Parkinson disease: a negative predictor of levodopa-induced dyskinesia. *Arch. Neurol.* 68, 1037–1039.
- Linazasoro, G., 2005. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol. Sci* 26, 391–397.
- Marras, C., Lang, A., 2013. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 84, 409–415.
- Rajput, A.H., Voll, A., Rajput, M.L., Robinson, C.A., Rajput, A., 2009. Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. *Neurology* 73, 206–212.
- Rieck, M., Schumacher-Schuh, A.F., Altmann, V., Francisconi, C.L., Fagundes, P.T., Monte, T.L., Callegari-Jacques, S.M., Rieder, C.R., Hutz, M.H., 2012. DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics* 13, 1701–1710.
- Schumacher-Schuh, A.F., Francisconi, C., Altmann, V., Monte, T.L., Callegari-Jacques, S.M., Rieder, C.R., Hutz, M.H., 2013. Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1–8.

- Schwab, England, 1969. Projection technique for evaluating surgery in Parkinson's disease., in: Third Symposium on Parkinson's Disease. E&S Livingstone Ltd, Edinburgh and London, pp. 152–7.
- Selikhova, M., Williams, D.R., Kempster, P.A., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J., 2009. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain* 132, 2947–2957.
- Timmermann, L., Gross, J., Dirks, M., Volkmann, J., Freund, H.-J., Schnitzler, A., 2003. The cerebral oscillatory network of parkinsonian resting tremor. *Brain* 126, 199–212.
- Tomlinson, C.L., Stowe, R., Patel, S., Rick, C., Gray, R., Clarke, C.E., 2010. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 25, 2649–2653.
- Zhang, Y.-H., Tang, B.-S., Song, C.-Y., Xu, Q., Lou, M.-X., Liu, Z.-H., Yu, R.-H., Yan, X.-X., Guo, J.-F., 2013. The relationship between the phenotype of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Neurosci. Lett.*

Table 1: Demographic and clinical characteristics according to first motor symptom

	All	First motor symptom		P
		Tremor	Bradykinesia and rigidity	
Patients, count (%)	225	163 (72.4)	62 (27.6)	
Males, count (%)	117 (52.0)	88 (54.0)	29 (46.8)	0.333
Age at onset, years, mean \pm SD	58.29 \pm 11.41	60.47 \pm 10.87	52.56 \pm 10.90	< 0.001
Disease duration, years, mean \pm SD	8.62 \pm 5.13	8.44 \pm 5.18	9.10 \pm 5.00	0.295
Levodopa therapy duration, years, mean \pm SD	8.00 \pm 10.55	7.47 \pm 9.86	9.35 \pm 12.11	0.161
Levodopa dose, mg, mean \pm SD	708.67 \pm 298.08	678.68 \pm 277.72	787.50 \pm 335.74	0.021
Intakes of levodopa per day, mean \pm SD	4.75 \pm 1.56	4.54 \pm 1.39	5.31 \pm 1.84	0.006
Dopamine agonist use, count (%)	48 (21.3)	28 (17.2)	20 (32.3)	0.014
COMT inhibitor use, count (%)	24 (10.7)	13 (8.1)	11 (17.7)	0.037
Levodopa equivalent dose, mg, mean \pm SD	804.09 \pm 392.65	755.28 \pm 361.46	932.40 \pm 442.80	0.004
Hoehn&Yahr stage scale (HY), mean \pm SD	2.73 \pm 0.85	2.69 \pm 0.87	2.83 \pm 0.79	0.252
Schwab&England scale (SE), mean \pm SD	71.34 \pm 24.12	72.23 \pm 23.69	68.98 \pm 25.31	0.399
UPDRS part I, mean \pm SD	3.55 \pm 2.69	3.66 \pm 2.72	3.27 \pm 2.64	0.352
UPDRS II, mean \pm SD	15.91 \pm 2.69	15.43 \pm 8.99	17.16 \pm 8.33	0.110
UPDRS III, mean \pm SD	34.32 \pm 18.01	35.06 \pm 18.74	32.20 \pm 15.69	0.334
Subscore: rest tremor	4.00 \pm 3.79	4.69 \pm 3.92	2.04 \pm 2.54	< 0.001
Subscore: action tremor	2.45 \pm 1.86	2.62 \pm 1.93	2.00 \pm 1.57	0.025
Subscore: rigidity	6.57 \pm 4.80	6.60 \pm 4.64	6.48 \pm 5.22	0.872
Subscore: bradykinesia	11.86 \pm 6.80	11.78 \pm 6.71	12.07 \pm 7.09	0.944
Subscore: axial	5.66 \pm 4.26	5.72 \pm 4.38	5.49 \pm 3.93	0.961
UPDRS IV, mean \pm SD	5.45 \pm 3.42	4.89 \pm 3.39	6.52 \pm 3.26	0.008

SD: standard deviation.

Table 2: Demographic and clinical characteristics according to the presence of motor complications

	Motor fluctuation			Dyskinesia		
	Absent	Present	P value	Absent	Present	P value
Patients, count (%)	42 (18.7)	183 (81.3)		128 (56.9)	97 (43.1)	
Males, count (%)	20 (47.6)	97 (53.0)	0.529	70 (54.7)	47 (48.5)	0.354
Age at onset, years, mean \pm SD	65.33 \pm 10.78	56.68 \pm 10.97	< 0.001	62.03 \pm 10.51	53.36 \pm 10.72	< 0.001
Disease duration, years, mean \pm SD	5.48 \pm 3.63	9.34 \pm 5.16	< 0.001	7.01 \pm 4.59	10.75 \pm 5.05	< 0.001
Levodopa therapy duration, years, mean \pm SD	4.26 \pm 5.66	8.88 \pm 11.23	< 0.001	5.88 \pm 5.83	10.86 \pm 14.23	< 0.001
Tremor as first motor symptom, count (%)	36 (85.7)	127 (69.4)	0.033	108 (84.4)	55 (56.7)	< 0.001
Levodopa dose, mg, mean \pm SD	493.45 \pm 213.57	753.14 \pm 302.35	< 0.001	638.09 \pm 260.36	801.80 \pm 319.75	< 0.001
Intakes of levodopa per day, mean \pm SD	3.50 \pm 1.06	5.04 \pm 1.52	< 0.001	4.35 \pm 1.32	5.28 \pm 1.70	< 0.001
Dopamine agonist use, count (%)	6 (14.3)	42 (23.0)	0.216	15 (11.7)	33 (34.0)	< 0.001
COMT inhibitor use, count (%)	0	24 (13.2)	0.014	6 (4.7)	18 (18.9)	0.001
Levodopa equivalent dose, mg, mean \pm SD	548.21 \pm 317.11	862.81 \pm 385.39	< 0.001	691.18 \pm 340.10	953.07 \pm 409.03	< 0.001
Hoehn & Yahr scale (HY), mean \pm SD	2.42 \pm 0.92	2.81 \pm 0.82	0.007	2.66 \pm 0.88	2.83 \pm 0.80	0.119
Schwab & England scale (SE), mean \pm SD	79.75 \pm 22.47	69.43 \pm 24.14	0.001	73.25 \pm 23.35	68.67 \pm 25.05	0.155
UPDRS part I, mean \pm SD	2.83 \pm 2.27	3.72 \pm 2.76	0.055	3.47 \pm 2.70	3.66 \pm 2.69	0.513
UPDRS II, mean \pm SD	12.28 \pm 8.78	16.84 \pm 8.62	0.001	15.13 \pm 8.91	16.98 \pm 8.65	0.114
UPDRS III, mean \pm SD	29.22 \pm 15.55	35.53 \pm 18.38	0.055	35.03 \pm 16.63	33.39 \pm 19.77	0.531
Subscore: rest tremor	3.65 \pm 2.50	4.09 \pm 4.03	0.774	4.91 \pm 3.55	2.73 \pm 3.77	< 0.001
Subscore: action tremor	2.15 \pm 1.56	2.52 \pm 1.91	0.331	2.60 \pm 1.78	2.24 \pm 1.94	0.047
Subscore: rigidity	5.53 \pm 3.94	6.80 \pm 4.95	0.235	7.04 \pm 4.66	5.92 \pm 4.93	0.095
Subscore: bradykinesia	9.64 \pm 5.92	12.36 \pm 6.90	0.026	11.59 \pm 6.37	12.22 \pm 7.35	0.895
Subscore: axial	4.73 \pm 4.28	5.88 \pm 4.23	0.055	5.48 \pm 4.08	5.90 \pm 4.49	0.557
UPDRS IV, mean \pm SD	2.13 \pm 2.06	5.91 \pm 3.32	< 0.001	3.58 \pm 2.18	7.30 \pm 3.43	< 0.001

SD: standard deviation.

Table 3: Multiple Poisson regression for dyskinesia and motor fluctuation

Variables	PR	95% Confidence Interval	P
<i>Dyskinesia</i>			
Tremor as first motor symptom	0.66	0.50 – 0.88	0.005
Age at onset, 10y	0.78	0.69 – 0.88	< 0.001
Levodopa equivalent dose, 200mg	1.1	1.04 – 1.17	0.002
<i>Motor Fluctuation</i>			
Tremor as first motor symptom	0.92	0.82 – 1.02	0.114
Disease duration, 10y	1.21	1.09 – 1.35	0.001
Levodopa equivalent dose, 200mg	1.05	1.02 – 1.09	0.001

PR: Prevalence Ratio

Capítulo 4: Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease.

Artigo publicado no periódico International Journal of Neuropsychopharmacology, julho de 2013, vol 16(6), 1251 – 1258.



Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease

Artur F Schumacher-Schuh^{1,2}, Carolina Francisconi², Vivian Altmann¹, Thais L Monte², Sidia M Callegari-Jacques³, Carlos RM Rieder² and Mara H Hutz¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Abstract

The requirement for dopaminergic drugs in Parkinson's disease (PD) is highly variable. Visual hallucinations are a frequent and serious complication of chronic levodopa therapy. Polymorphisms in the *DAT1* gene might affect the reuptake of dopamine in the synaptic cleft, but the influence of this variability on adverse effects or levodopa equivalent dose on PD patients is still poorly investigated. Therefore, the aim of the present study was to investigate *DAT1* gene polymorphisms on levodopa equivalent dose and visual hallucination occurrence in PD patients. Altogether, 196 PD patients in treatment with at least 200 mg levodopa equivalent dose for at least 1 yr were included. These patients were genotyped for the $-839\text{ C}>\text{T}$ and 3' VNTR *DAT1* polymorphisms by PCR-based methodologies. Visual hallucinations occurred in 25.5% of the sample. After controlling for confounders, the dopamine transporter (DAT) -839 C allele was associated with visual hallucinations (prevalence ratio 2.5, 95% confidence intervals 1.13–5.5, $p=0.02$). Levodopa equivalent dose was lower in carriers of the nine repeat allele of the DAT 3'UTR VNTR (741.2 ± 355.0 vs. 843.4 ± 445.7), explaining 21% of dose variability ($p=0.01$). Our results support an effect of *DAT1* polymorphisms in adverse effects of anti-Parkinsonian drugs and in levodopa equivalent dose usage.

Received 15 August 2012; Reviewed 3 October 2012; Revised 19 November 2012; Accepted 18 December 2012;
First published online 30 January 2013

Key words: DAT1 polymorphisms, levodopa, Parkinson's disease, visual hallucinations.

Introduction

Parkinson's disease (PD) affects approximately 1–3% of subjects >65 yr and it is mainly characterized by bradykinesia, rigidity and resting tremor (de Lau and Breteler, 2006). These core symptoms result from a progressive degenerative process that affects the dopaminergic neurons in the mesencephalon, leading to a dopamine deficit. In order to restore this deficiency, the dopamine precursor levodopa is used as a major pharmacological strategy. Although it is the most effective therapy for PD, long-term levodopa treatment contributes to adverse effects such as visual hallucinations (Fénelon and Alves, 2010).

Visual hallucinations have a prevalence of 22–38% in PD patients in the use of dopaminergic therapy (Fénelon

and Alves, 2010). Once present, this symptom persists and has a tendency to worsen (Goetz et al., 2006). It is a risk factor for dementia (Hobson and Meara, 2004; Galvin et al., 2006), nursing home placement (Aarsland et al., 2000) and mortality (Goetz and Stebbins, 1995). The pathophysiology of visual hallucinations results from an interaction of multiple factors, such as disease severity, disease duration, cognitive impairment, depression, dysautonomia, sleep disorders and dysfunction in visual processing (Fénelon and Alves, 2010).

The dopamine transporter (DAT1) is a plasma membrane protein that controls dopaminergic neurotransmission by reuptake of released dopamine into pre-synaptic neurons. A gene mapped to chromosome 5p15 encodes this transporter; the most studied polymorphism in this locus is a 40 bp variable number of tandem repeats (VNTR; rs28363170) in the 3' untranslated region (UTR). This polymorphism was associated with a variety of neuropsychiatric conditions, including PD. In younger individuals, the nine repeat (9R) allele was associated with higher DAT1 expression in the striatum, but this

Address for correspondence: Dr Mara H. Hutz, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa postal 15053, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.
Tel.: +55 51 3308 6720 Fax: +55 51 3308 7311
Email: mara.hutz@ufrgs.br

seems to decrease faster with ageing, leading to a probably lower DAT1 expression in older populations with this genotype (Bannon and Whitty, 1997; van Dyck et al., 2005; Shumay et al., 2011). Homozygosity for the 9R allele was associated with PD risk (Ritz et al., 2009), whereas homozygosity for the 10 repeat (10R) allele was associated with PD protection (Lin et al., 2003). Nevertheless, few studies investigated its relation with pharmacological response in PD patients. Kaiser et al. (2003) described an increased frequency of dyskinesia and psychosis in patients who were 9R allele carriers.

Rubie et al. (2001) reported four polymorphisms in linkage disequilibrium ($-67T>A$, $-839C>T$, $-1169C>G$, $-1476T>G$) in the DAT1 promoter region that were potentially related to transcriptional recognition sites, suggesting that they may be functional, and therefore good candidates for association studies between DAT1 and disease. This 5' UTR region is not in linkage disequilibrium with the 3' UTR, where the 40 bp VNTR (rs28363170) was mapped (Genro et al., 2008). The possible functional effect of these 5'UTR polymorphisms was also observed *in vitro* (Greenwood and Kelsoe, 2003; Kelada et al., 2005). Genetic variants in this 5' region was mostly studied in psychiatric conditions (Genro et al., 2008; Zhou et al., 2008; Xu et al., 2009, 2010; Contini et al., 2010); only one study evaluated the association of the 5'UTR polymorphisms with PD susceptibility, with negative results (Kelada et al., 2005).

Pharmacogenetic studies aim to identify genes associated with variations in efficacy and side-effects secondary to a medication regimen. Polymorphisms in the *DAT1* gene might affect the reuptake of dopamine in the synaptic cleft, but the influence of this variability on adverse effects or levodopa equivalent dose in PD patients is still poorly investigated. Therefore, the goal of this study was to determine the contribution of two *DAT1* gene polymorphisms (rs28363170 and rs2652511) on levodopa equivalent dose prescription and on the occurrence of visual hallucinations as a side-effect of therapy.

Method

Patients

A total of 196 Brazilian PD patients were recruited and evaluated at the Movement Disorder Clinics at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from 2006 to 2011. Diagnosis of idiopathic PD was made in accordance with UK Parkinson Disease Society Brain Bank criteria (Hughes et al., 1992) and revised by one of us (C. R. M.R.), an experienced neurologist in movement disorders. The inclusion criterion for this study was a prescribed dose of at least 200 mg levodopa equivalent dose for at least 1 yr. Levodopa equivalent dose was defined by the equation that included dopamine agonists and COMT inhibitors as previously described (Hobson et al., 2002). Patients with atypical manifestations or

secondary Parkinsonisms were excluded. The hospital ethics committee approved the study and all participants gave written informed consent to participate.

Clinical evaluation

Patients and their care-givers underwent a structured interview for collecting clinical and demographic data. Information was also obtained from medical records. A trained physician applied the four parts of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS; Martínez-Martín et al., 1994), the Hoehn & Yahr Scale (Hoehn and Yahr, 1967), the Schwab & England Activities of Daily Living Scale (Schwab, 1969) and the Mini Mental State Examination (Folstein et al., 1975). The definition of hallucination incorporated two concepts. First, a score of ≥ 2 in the second question of the UPDRS part I was used to identify present hallucinators. Past occurrence of hallucinations was obtained directly from patients and/or care-givers and after a careful revision of medical records. A past history of hallucination was considered based on any change in medical treatment due to hallucinations that included the use of neuroleptics or modification in pharmacological treatment, which included lowering dopaminergic agents or suspension of amantadine. The non-hallucinator group included only patients who had never experienced hallucination.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by a salting out method (Lahiri et al., 1992). The DAT 3' UTR VNTR (rs28363170) and the $-839 C>T$ SNP (rs28363170) genotypes were determined as previously reported (Roman et al., 2001; Genro et al., 2007).

Statistical analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. Agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using a goodness of fit χ^2 test.

Potential confounders were evaluated using χ^2 test for categorical variables and *t* test or Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test for continuous variables with and without normal distribution respectively. Potential confounders to be entered in models were defined based on conceptual analyses of the literature and/or by means of a statistical definition (association with the study factor and with the outcome at $p \leq 0.2$). Correlations between variables were evaluated with Spearman coefficient.

Multiple Poisson regression analyses with robust standard errors were used to assess the effect of polymorphisms on the occurrence of visual hallucinations, since the outcome was a frequent event in our sample (Greenland, 2004). Taking into account the differential effects of dopamine agonists and levodopa itself on nigrostriatal synapsis and on the risk of psychotic symptoms, we considered a modified levodopa equivalent dose

Table 1. Clinical and demographic characteristics according to the occurrence of visual hallucinations

Characteristic	Visual hallucination			<i>p</i>
	Overall	Present	Absent	
Study population	196	50 (25.5)	146 (74.5)	
Gender (males)	100 (51.0)	32 (64.0)	68 (46.6)	0.03
European ancestry	170 (86.7)	41 (83.7)	129 (89.0)	0.33
Age	68.0 ± 10.3	66.2 ± 9.2	68.5 ± 10.6	0.31
Age at onset	59.2 ± 11.0	56.3 ± 9.5	60.2 ± 11.3	0.03
Tremor as first motor symptom	144 (73.5)	34 (23.6)	110 (76.4)	0.3
Disease duration	8.8 ± 4.8	10.0 ± 5.1	8.3 ± 4.6	0.05
Equivalent levodopa dosage (mg/d)	793.2 ± 409.1	959.2 ± 456.4	740.7 ± 375.1	<0.01
Duration of levodopa therapy	6.6 ± 4.7	7.6 ± 5.2	6.2 ± 4.5	0.07
MMSE	24.9 ± 4.1	23.7 ± 5.8	25.2 ± 3.4	0.21
Education (yr)	5.9 ± 3.8	5.8 ± 3.9	6.1 ± 3.8	0.50
H&Y stage				0.04
1	7 (3.6)	0 (0.0)	7 (4.8)	
2	92 (46.7)	19 (38.0)	73 (50.0)	
3	60 (30.5)	18 (36.0)	42 (28.8)	
4	32 (16.2)	9 (18.0)	22 (15.1)	
5	6 (3.0)	4 (8.0)	2 (1.4)	

H&Y, Hoehn and Yahr; MMSE, Mini-Mental State Examination.

Number (percentage) for categorical data; mean ± S.D. for quantitative data.

Significant *p*-values are shown in bold.

(total levodopa dose corrected for the use of COMT inhibitors) and the use of dopamine agonist as two separate variables.

Linear regression analysis was used to test for the effect of polymorphisms on levodopa equivalent dose. Levodopa dose was ln-transformed to remove skewness, but untransformed means are shown in tables. Since the outcome was the dopaminergic demand, we used the levodopa equivalent equation, including dopamine agonist use corrected for the concomitant use of COMT inhibitors (Hobson et al., 2002). This procedure was employed in order to include the overall need for dopamine stimulation.

All analyses were performed using SPSS version 18 software and a significance level of 5% was set in all analyses with two-tailed tests.

Results

Demographic and clinical characteristics of patients according to the presence of visual hallucinations are shown in Table 1. Visual hallucinations were present in 25.5% of the sample, affecting more males than females (*p* = 0.03). Disease duration, levodopa equivalent dose and disease severity (assessed by Hoehn & Yahr Scale) were higher in patients presenting visual hallucinations, while age at onset of motor symptoms of PD was lower. Age at the time of evaluation and cognitive function (assessed by Mini Mental State Examination) did not differ between groups. These characteristics according to *DAT1*

genotypes are presented in Table 2. The frequency of the -839T allele was 0.48. The frequency of the 9R allele was 0.25 and of the 10R allele was 0.72, the length repeat alleles varied from 3 to 11. These genotype and allele frequencies were similar to those reported in other populations of European descent (Kelada et al., 2005; Genro et al., 2008). Genotypes from both polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. As previously reported by Genro et al. (2008) in this Brazilian population, no linkage disequilibrium was observed between these two polymorphisms in this sample.

Univariate analysis for the polymorphisms, based on a dominant model, showed that *DAT* -839C allele was associated with visual hallucination [crude prevalence ratio (PR) = 2.2; *p* = 0.05]. Potential confounding effects of age at onset, current age, disease severity and medication use on this association were evaluated. Levodopa dose modified for the concomitant use of COMT inhibitors was included in the Poisson regression because it was associated with both the *DAT* -839 C/T polymorphism (*p* = 0.099) and visual hallucinations (*p* < 0.001). Age was highly correlated to age at onset (*r* = 0.9; *p* < 0.001). Therefore, it was not included in the regression to avoid multi-collinearity. Age at onset of disease and Hoehn & Yahr Scale, which represents disease severity, were associated with visual hallucination (*p* = 0.03 and *p* = 0.04, respectively), but not with the polymorphism (*p* = 0.28 and *p* = 0.84, respectively). Concomitant use of dopamine agonist was neither associated with outcome nor with exposure (*p* = 0.21 and *p* = 0.24). Nevertheless, these three

Table 2. Clinical and demographic characteristics according to DAT genotypes

Characteristics	CC	CT	TT	<i>p</i>	9R allele present	9R allele absent	<i>p</i>
Study population	54 (27.6)	94 (48.5)	46 (23.7)		91 (46.4)	105 (53.6)	
Gender (males)	23 (42.6)	54 (57.4)	22 (47.8)	0.2	45 (49.5)	56 (53.3)	0.6
European ancestry	47 (88.7)	80 (86.0)	41 (89.1)	0.8	81 (89.0)	89 (86.4)	0.6
Age	68.3 ± 9.6	68.3 ± 10.5	67.4 ± 10.8	0.9	68.3 ± 10.5	67.7 ± 10.3	0.7
Age at onset	59.8 ± 11.0	59.6 ± 10.8	58.2 ± 11.4	0.7	59.2 ± 10.4	59.2 ± 11.6	1.0
Tremor as first motor symptom	42 (29.4)	69 (48.3)	32 (22.4)	0.7	60 (42)	83 (58)	0.05
Disease duration	8.6 ± 5.0	8.7 ± 4.7	9.3 ± 5.1	0.8	9.1 ± 5.1	8.5 ± 4.5	0.5
Equivalent levodopa dosage, (mg/d)	780.3 ± 385.8	776.9 ± 393.4	858.0 ± 470.8	0.6	741.2 ± 355.0	843.4 ± 445.7	0.4
Duration of levodopa therapy	6.7 ± 5.0	6.5 ± 4.4	6.7 ± 5.4	0.9	6.7 ± 5.1	6.5 ± 4.4	0.2
Dopamine agonist use	8 (14.8)	14 (14.7)	10 (22.2)	0.5	14 (15.6)	18 (17.1)	0.7
MMSE	24.2 ± 5.1	25.4 ± 3.8	24.7 ± 3.5	0.3	24.2 ± 4.6	25.4 ± 3.6	0.1
H&Y stage				0.9			0.3
1	3 (5.6)	4 (4.3)	0 (0.0)		2 (2.2)	5 (4.8)	
2	24 (44.4)	45 (47.9)	22 (47.8)		40 (44.0)	52 (49.5)	
3	14 (25.9)	27 (28.7)	17 (37.0)		25 (27.5)	34 (32.4)	
4	11 (20.4)	15 (16.0)	6 (13.0)		19 (20.9)	13 (12.4)	
5	2 (3.7)	3 (3.2)	1 (2.2)		5(5.5)	1 (1.0)	

DAT, Dopamine transporter; H&Y, Hoehn and Yahr; MMSE, Mini-Mental State Examination. Number (percentage) for categorical data; mean ± S.D. for quantitative data.

Table 3. Multiple Poisson regression analysis of DAT-839 polymorphism predicting visual hallucination as a side-effect of levodopa therapy in Parkinson's disease patients

	Prevalence ratio	95% CI	<i>p</i>
Age at onset (>59 yr)	0.6	0.3–1.0	0.07
Modified levodopa equivalent dose*	2.1	1.2–3.6	0.005
Agonist use	1.3	0.7–2.5	0.4
European ancestry	0.8	0.5–1.3	0.3
Hoehn & Yahr Scale	1.7	1.0–2.8	0.05
Presence of DAT –839 C allele	2.6	1.1–5.7	0.02

DAT, dopamine transporter; CI, confidence intervals.

Goodness of fit $\chi^2=19.1$; $p=0.004$.

* Total levodopa dose corrected for the use of COMT inhibitors.

variables were included in the regression for conceptual reasons; because of a nonlinear effect, age at onset was dichotomized at 59 yr. Although ethnicity was also not related to polymorphism or visual hallucinations, it was included in the model to control for a potential population stratification effect.

After controlling for confounders, the C allele of DAT C>T –839 polymorphism was associated with visual hallucinations (PR 2.5, 95% confidence intervals 1.13–5.5, $p=0.02$). Levodopa dose corrected for the use of COMT inhibitors and Hoehn & Yahr Scale were also associated with hallucination risk while age of disease onset was associated with lower risk (Table 3). The overall model adequacy was estimated by the likelihood-ratio χ^2 test ($\chi^2=17.95$, d.f. =4; $p=0.001$).

The effect of covariates on levodopa equivalent dose was assessed using similar procedures. No statistical significant results were observed for Hoehn & Yahr Scale and ethnicity ($p=0.6$ and $p=0.6$). The DAT polymorphism was also not associated with these variables ($p=0.3$ and $p=0.6$ respectively). Gender and disease duration were associated with levodopa equivalent dose ($p<0.001$ for both) but were not associated with DAT VNTR polymorphism ($p=0.6$ and $p=0.5$). Disease first symptom presented a significant association with levodopa equivalent dose ($p=0.01$) and with DAT ($p=0.05$). Based on statistical and conceptual criteria, disease first symptom, disease duration and ethnicity were included as covariates in a multiple linear regression model for the effect of the 9R allele of DAT VNTR on levodopa

Table 4. Linear regression analysis for levodopa equivalent dose prediction

	β	p
Disease duration	0.4	<0.001
Rigidity/bradykinesia as first symptom	0.3	0.01
European ancestry	0.03	0.7
Presence of 9 repeat DAT VNTR 3' UTR allele	-0.2	0.01

DAT, Dopamine transporter; VNTR, variable number of tandem repeats; UTR, untranslated region.

$F_4 = 12.6$, $p < 0.001$; $R^2 = 0.2$; Cohen's $f^2 = 0.25$.

equivalent dose. In this model, the 9R allele was associated with lower levodopa equivalent dose (741.2 ± 355.0 vs. 843.4 ± 445.7), explaining 20% of the dose variance ($p = 0.01$). Longer disease duration and rigidity/bradykinesia as the first symptom were also associated with higher levodopa equivalent dose (Table 4). The overall model adequacy was estimated by the F test ($F = 16.8$, d.f. = 3; $p < 0.001$).

Interaction effects between variables included in both analyses were tested but no significant results were observed (data not shown, but available upon request). The DAT C>T -839 polymorphism was not associated with dose and the 3'UTR DAT VNTR was not associated with visual hallucinations in this sample.

Discussion

In the present study, visual hallucinations were observed with a prevalence of 25.5% among PD patients treated with levodopa and other dopaminergic drugs. The major findings reported herein were the association of the DAT -839C allele with visual hallucinations and of the DAT 3'UTR VNTR 9R allele with lower levodopa equivalent dose.

The literature about visual hallucinations in PD is conflicting, due to diverse sample selection criteria and to a lack of a gold standard clinical assessment (Goetz, 2009). Visual hallucinations are an end-point that few patients report spontaneously (Fénelon and Alves, 2010), but it is easily elicited by direct specific questions, because generally it causes concern to patients and caregivers and, once present, has a persistent and progressive nature (Goetz et al., 2001). The visual hallucination prevalence of 25.5% observed herein is in the same range (22–38%) previously reported (Fénelon and Alves, 2010). This adverse effect was associated with higher levodopa dose, corrected for the concomitant use of COMT inhibitors in accordance with the assumption that visual hallucinations are related to dopaminergic therapy (Forsaa et al., 2010); however, this relation is not always accepted (Goetz et al., 2001). In the present study, visual hallucinations were not associated with older age or cognitive dysfunction, as would be expected based on

previous studies (Biglan et al., 2007; Forsaa et al., 2010). Notwithstanding, the age at onset of motor symptoms was lower in patients with visual hallucinations, this feature could represent higher disease duration and therefore more time on medication, because these variables were highly correlated in the present sample.

Since visual hallucinations are a clinical phenomenon conceptually linked to hyperdopaminergic states, earlier studies investigated the association of this side-effect with genetic variants that regulate distinct points of dopaminergic neurotransmission, most of them with conflicting results. In Asians, cholecystokinin gene polymorphisms, which codify a peptide that regulates dopamine neurotransmission, were associated with visual hallucinations (Fujii et al., 1999; Wang et al., 2003), but these results were not replicated in European samples (Goldman et al., 2004, 2011). Contin et al. (2004) did not observe differences in levodopa-related complications associated with the 3' VNTR alleles.

Kaiser et al. (2003) reported an association between the DAT 3' VNTR 9R allele and psychosis, which included hallucinations. Although we did not observe an association with the 3' VNTR, visual hallucinations were associated in this Brazilian sample with the DAT -839 C allele at the 5'UTR. The most likely explanation for the inconsistencies regarding the role of the *DAT1* gene in PD is that a combination of susceptibility variants across the gene exists and these combinations differ between distinct populations. Our results suggest that allele heterogeneity should be considered in pharmacogenomics studies. This allele heterogeneity is commonly seen in several single gene disorders but it is not generally considered in complex phenotypes. Simply genotyping one marker per gene will provide little (if any) conclusive evidence for association of that gene with treatment outcomes.

Kelada et al. (2005) observed that a 5' region haplotype including the -839 C>T polymorphism affects transcriptional activity *in vitro*. The biological role of these 5'UTR markers is yet unclear; however, they are located in an important region for *DAT1* expression. Moreover, Rubie et al. (2001), after *in silico* screening, suggested that the T allele of SNP rs2652511 (-839 C>T) introduces a leader binding protein 1 (LBP-1) binding site. Therefore, this 5'UTR polymorphism may point to differences in transcriptional activation and/or cell-type specific expression of the DAT protein. If a LPB-1-like transcription factor binds around the rs2652511T allele repressing its expression, carriers of rs2652511 C allele would have higher DAT expression than their counterparts with a T allele. The *DAT1* gene exhibits a very high specificity of expression and contains a strong tissue non-specific essential promoter, suggesting a complex combination of positive and negative regulatory factors. Drgon et al. (2006) confirmed that this variant (rs2652511) is associated with higher *DAT1* expression based on two lines of evidences: *In vivo* by positron emission tomography

studies; post mortem by saturation radioligand binding studies. More recently, van de Giessen et al. (2009) showed that striatal DAT availability observed by SPECT was associated with decreased DAT expression. Clearly, more studies are needed to disclose the exact functional role of this variant.

We did not observe differences in visual hallucination prevalence between individuals with different genotypes at the DAT 3' VNTR, but 9R allele carriers were on levodopa equivalent lower dose. In young people, recent evidence showed increased DAT density for 9R allele (van de Giessen et al., 2009), even with an additive effect (Shumay et al., 2011). However, DAT levels in the brain decrease with age (Volkow et al., 1996; Bannon and Whitty, 1997) and that decrease might be higher in carriers of the 9R/9R genotype (Shumay et al., 2011). Although this polymorphism has a theoretical effect in dopaminergic transmission, few studies investigated its relation with pharmacological response to levodopa or other dopaminergic agent to treat PD. The finding of the 9R allele in association with lower levodopa equivalent dose could be explained by probable lower reuptake of dopamine in carriers of this allele.

The use of levodopa equivalent dose as a measure of dopaminergic demand in relation to genetic polymorphism was studied just once and no association was found with the DRD2 Taq IA SNP (Paus et al., 2008). The use of levodopa equivalent dose is a naturalistic design that captures more precisely the clinical ground scenario. According to Paus et al. (2008), the concept of 'dopaminergic demand', when applied in a naturalistic study would be a better representation of the patient's overall needs for dopamine stimulation. However, some limitations in this measure must be pointed out. First, patients and clinicians have different perceptions of what is a good pharmacological response. Second, the individual disease severity was not accounted for. Third, PD has heterogeneous clinical presentations with distinctive responses for dopaminergic therapy. Fourth, patients frequently have different rhythms of disease progression.

Two other variables were associated with levodopa equivalent dose in this sample: disease duration; first motor symptom. In a progressive disorder like PD, it was expected that levodopa equivalent dose would increase with disease duration. On the other hand, tremor as the first PD motor symptom was previously associated with a mild disease progression that could explain the lower levodopa equivalent dose used by these patients (Josephs et al., 2006). The worst response of tremor to levodopa could also be considered as another possible reason.

Although our sample size has power to find the differences observed, additional studies with larger samples are needed to confirm the present findings. Longitudinal studies would be preferred to better delineate risk factors and to improve accuracy, with the use of time to develop hallucination as the outcome as well as to find potential interactions between variables not observed in

the present study. Moreover, measures of the visual pathway function should also be explored, since it could be a potential confounder for visual hallucinations (Ibarretxe-Bilbao et al., 2011).

In a chronic disabling disease like PD, with multiple pharmacological treatment options, predicting patients' dose response and profiles more prone to adverse effects are important. These predictions could lead to a more personalized pharmacological prescription and to better selection of groups for future clinical trials. The findings described in this paper aggregate important evidence in order to achieve these goals.

Acknowledgements

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), 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (Capes) and 'Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE - HCPA).

Statement of Interest

None.

References

- Aarsland D, Larsen JP, Tandberg E, Laake K (2000) Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: a population-based, prospective study. *J Am Geriatr Soc* 48:938-942.
- Bannon MJ, Whitty CJ (1997) Age-related and regional differences in dopamine transporter mRNA expression in human midbrain. *Neurology* 48:969-977.
- Biglan KM, Holloway Jr. RG, McDermott MP, Richard IH (2007) Risk factors for somnolence, edema, and hallucinations in early Parkinson disease. *Neurology* 69:187-195.
- Contin M, Martinelli P, Mochi M, Albani F, Riva R, Scaglione C, Dondi M, Fanti S, Pettinato C, Baruzzi A (2004) Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 27:111-115.
- Contini V, Victor MM, Marques FZC, Bertuzzi GP, Salgado CAI, Silva KL, Sousa NO, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, Bau CHD (2010) Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117:269-276.
- de Lau LML, Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525-535.
- Drgon T, Lin Z, Wang G-J, Fowler J, Pablo J, Mash DC, Volkow N, Uhl GR (2006) Common human 5' dopamine transporter (SLC6A3) haplotypes yield varying expression levels *in vivo*. *Cell Mol Neurobiol* 26:875-889.
- Fénelon G, Alves G (2010) Epidemiology of psychosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 289:12-17.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) 'Mini-mental state examination': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.
- Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Goetz CG, Stebbins GT, Aarsland D, Alves G (2010) A 12-year population-based

- study of psychosis in Parkinson disease. *Arch Neurol* 67:996–1001.
- Fujii C, Harada S, Ohkoshi N, Hayashi A, Yoshizawa K, Ishizuka C, Nakamura T (1999) Association between polymorphism of the cholecystokinin gene and idiopathic Parkinson's disease. *Clin Genet* 56:394–399.
- Galvin JE, Pollack J, Morris JC (2006) Clinical phenotype of Parkinson disease dementia. *Neurology* 67:1605–1611.
- Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2008) A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1568–1575.
- Genro JP, Zeni C, Polanczyk GV, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2007) A promoter polymorphism (–839C>T) at the dopamine transporter gene is associated with attention deficit/hyperactivity disorder in Brazilian children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:215–219.
- Goetz CG (2009) Scales to evaluate psychosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl. 3:S38–S41.
- Goetz CG, Stebbins GT (1995) Mortality and hallucinations in nursing home patients with advanced Parkinson's disease. *Neurology* 45:669–671.
- Goetz CG, Fan W, Leurgans S, Bernard B, Stebbins GT (2006) The malignant course of 'benign hallucinations' in Parkinson disease. *Arch Neurol* 63:713–716.
- Goetz CG, Leurgans S, Pappert EJ, Raman R, Stemer AB (2001) Prospective longitudinal assessment of hallucinations in Parkinson's disease. *Neurology* 57:2078–2082.
- Goldman JG, Goetz CG, Berry-Kravis E, Leurgans S, Zhou L (2004) Genetic polymorphisms in Parkinson disease subjects with and without hallucinations: an analysis of the cholecystokinin system. *Arch Neurol* 61:1280–1284.
- Goldman JG, Marr D, Zhou L, Ouyang B, Leurgans SE, Berry-Kravis E, Goetz CG (2011) Racial differences may influence the role of cholecystokinin polymorphisms in Parkinson's disease hallucinations. *Mov Disord* 26:1781–1782.
- Greenland S (2004) Model-based estimation of relative risks and other epidemiologic measures in studies of common outcomes and in case-control studies. *Am J Epidemiol* 160:301–305.
- Greenwood TA, Kelsoe JR (2003) Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 82:511–520.
- Hobson DE, Lang AE, Martin WRW, Razmy A, Rivest J, Fleming J (2002) Excessive daytime sleepiness and sudden-onset sleep in Parkinson disease: a survey by the Canadian Movement Disorders Group. *J Am Med Assoc* 287:455–463.
- Hobson P, Meara J (2004) Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom. *Mov Disord* 19:1043–1049.
- Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427–442.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 55:181–184.
- Ibarretxe-Bilbao N, Junque C, Marti MJ, Tolosa E (2011) Cerebral basis of visual hallucinations in Parkinson's disease: structural and functional MRI studies. *J Neurol Sci* 310:79–81.
- Josephs KA, Matsumoto JY, Ahlskog JE (2006) Benign tremulous parkinsonism. *Arch Neurol* 63:354–357.
- Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, Gasser T, Kupsch A, Roots I, Brockmüller J (2003) L-dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology* 60:1750–1755.
- Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller T-S, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth Jr. WT, Afsharinejad Z, Costa LG (2005) Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity *in vitro* but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 15:659–668.
- Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Hodes ME, Crisp M (1992) A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods* 25:193–205.
- Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, Chang CY, Yeh YH, Lin SZ (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. *J Neurol Sci* 209:87–92.
- Martínez-Martín P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gómez JB, Martínez-Sarriés J, Bermejo F (1994) Unified Parkinson's disease rating scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord* 9:76–83.
- Paus S, Grünewald A, Klein C, Knapp M, Zimprich A, Janetzky B, Möller JC, Klockgether T, Wüllner U (2008) The DRD2 TaqIA polymorphism and demand of dopaminergic medication in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:599–602.
- Ritz BR, Manthripragada AD, Costello S, Lincoln SJ, Farrer MJ, Cockburn M, Bronstein J (2009) Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 117:964–969.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2001) Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 105:471–478.
- Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stöber G (2001) The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett* 297:125–128.
- Schwab E (1969) Projection technique for evaluating surgery in Parkinson's disease. In: *Third Symposium on Parkinson's Disease*, pp 152–157. Edinburgh and London: E&S Livingstone Ltd.
- Shumay E, Chen J, Fowler JS, Volkow ND (2011) Genotype and ancestry modulate brain's DAT availability in healthy humans. *PLoS ONE* 6:e22754.
- van de Giessen EM, de Win MML, Tanck MWT, van den Brink W, Baas F, Booij J (2009) Striatal dopamine transporter availability associated with polymorphisms in the dopamine transporter gene SLC6A3. *J Nucl Med* 50:45–52.
- van Dyck CH, Malison RT, Jacobsen LK, Seibyl JP, Staley JK, Laruelle M, Baldwin RM, Innis RB, Gelernter J (2005) Increased dopamine transporter availability associated with the 9-repeat allele of the SLC6A3 gene. *J Nucl Med* 46:745–751.
- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Smith G, Fields SD, Gur R (1996) Dopamine transporters decrease with age. *J Nucl Med* 37:554–559.
- Wang J, Si Y-M, Liu Z-L, Yu L (2003) Cholecystokinin, cholecystokinin-A receptor and cholecystokinin-B receptor

- gene polymorphisms in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13:365–369.
- Xu M, et al. (2010) Pharmacogenetic effects of dopamine transporter gene polymorphisms on response to chlorpromazine and clozapine and on extrapyramidal syndrome in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1026–1032.
- Xu X, Mill J, Sun B, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P (2009) Association study of promoter polymorphisms at the dopamine transporter gene in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *BMC Psychiatry* 9:3.
- Zhou K, et al. (2008) Genetic heterogeneity in ADHD: DAT1 gene only affects probands without CD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1481–1487.

Capítulo 5: Association of common genetic variants of *HOMER1* gene with levodopa adverse effects in Parkinson's disease patients.

Artigo publicado no periódico The Pharmacogenomics Journal, outubro de 2013.

ORIGINAL ARTICLE

Association of common genetic variants of *HOMER1* gene with levodopa adverse effects in Parkinson's disease patients

AF Schumacher-Schuh^{1,2}, V Altmann¹, M Rieck¹, L Tovo-Rodrigues¹, TL Monte², SM Callegari-Jacques³, MS Medeiros², CRM Rieder² and MH Hutz¹

Levodopa is the most effective symptomatic therapy for Parkinson's disease, but its chronic use could lead to chronic adverse outcomes, such as motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations. *HOMER1* is a protein with pivotal function in glutamate transmission, which has been related to the pathogenesis of these complications. This study investigates whether polymorphisms in the *HOMER1* gene promoter region are associated with the occurrence of the chronic complications of levodopa therapy. A total of 205 patients with idiopathic Parkinson's disease were investigated. Patients were genotyped for rs4704559, rs10942891 and rs4704560 by allelic discrimination with Taqman assays. The rs4704559 G allele was associated with a lower prevalence of dyskinesia (prevalence ratio (PR) = 0.615, 95% confidence interval (CI) 0.426–0.887, $P = 0.009$) and visual hallucinations (PR = 0.515, 95% CI 0.295–0.899, $P = 0.020$). Our data suggest that *HOMER1* rs4704559 G allele has a protective role for the development of levodopa adverse effects.

The *Pharmacogenomics Journal* advance online publication, 15 October 2013; doi:10.1038/tpj.2013.37

Keywords: dyskinesia; *homer1*; levodopa; Parkinson's disease; pharmacogenetics; visual hallucinations.

INTRODUCTION

Idiopathic Parkinson's disease (PD) affects 1–3% of people older than 65 years, and its core symptoms are slowness of movements, rigidity and resting tremor.¹ The complete pathological pathway underlying this condition remains unknown, but the mechanism involved in the cardinal motor manifestations of disease results from a progressive loss of dopaminergic cells in the midbrain, leading to a dopamine deficit in the striatum. Levodopa is a dopamine precursor, and it is used as the major pharmacological agent to restore this deficiency. Despite the important symptomatic effect provided by levodopa, its long-term use is associated with adverse outcomes such as motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations, which could severely impair daily life.^{2,3}

Motor fluctuation is a phenomenon characterized by a predictable (wearing-off) or an unpredictable (on-off) loss of levodopa effects, and dyskinesia consists of hyperkinetic involuntary movements triggered by the drug. Both phenomena affect 40% of patients after 4–6 years of treatment.^{3,4} Visual hallucinations' estimated prevalence is about 22–38% of PD patients who use dopaminergic therapy.² These complications are phenotypic features that vary between patients, and their risk factors are not completely understood. The theoretical framework to explain this differential individual response to the drug incorporates at least two concepts: (1) disease-associated features, such as severity of nigrostriatal denervation, and (2) pharmacological factors, given the non-physiological dopaminergic stimulation provided by levodopa.^{5–7} However, a growing body of evidence points to aberrant neuroplasticity, along with glutamatergic hyperactivity, as a third concept in this model, especially for dyskinesia.⁸

HOMER1 encodes a postsynaptic density protein highly expressed in the brain. This protein has important roles in synaptic plasticity and glutamate signal transduction.^{9,10} This gene was mapped at chromosome 5, and it has two major products determined by alternative splicing. Homer1b/c is the long variant constitutively expressed and forms dimers that connect glutamate receptors (mGluR1 α and mGluR5) with signaling proteins (for example, Shank and IP₃R), whereas Homer1a is the short variant of the gene transcript and is an immediate early gene product expressed under neuronal activation. Homer1a lacks the carboxy-terminal region, which prevents dimer formation and counteracts the action of Homer1b/c. Previous studies with parkinsonism animal models showed an overexpression of Homer1a after the administration of dopaminergic agonists^{11–13} and a decreased expression after high-frequency deep brain stimulation of the subthalamic nucleus, a similar kind of stimulation used in clinical practice to improve symptoms in PD patients.¹⁴ This evidence suggested a relationship between Homer1 and symptomatic therapies for PD.

The possibility of predicting complications of the chronic use of levodopa in PD is an important goal toward a more personalized prescription. The aim of this study was to determine the contribution of rs4704559, rs10942891 and rs4704560 polymorphisms in the *HOMER1* promoter region in the occurrence of chronic complications of levodopa therapy, namely motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations.

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 205 Brazilian PD patients were evaluated at the Movement Disorder Clinics at 'Hospital de Clínicas de Porto Alegre', Brazil, from 2006

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil and ³Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Correspondence: Dr MH Hutz, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa postal 15053, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Received 17 May 2013; revised 22 August 2013; accepted 23 August 2013

to 2012. This sample has been fully described elsewhere.^{15,16} Briefly, diagnosis of idiopathic PD was made in accordance with UK Parkinson Disease Society Brain Bank criteria¹⁷ and revised by one of us (CRMR), an experienced neurologist in movement disorders. The inclusion criteria were the use of at least 200 mg of levodopa for 1 year or more with an initial good response to the drug. Patients with atypical manifestations or secondary parkinsonisms were excluded. The hospital Ethics Committee approved the study, and all participants gave written informed consent.

Clinical evaluation

Patients and their caregivers underwent a structured interview for collecting clinical and demographic data. Information was also obtained from an electronic database of medical records. A trained physician applied the four parts of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS),¹⁸ the Hoehn and Yahr (HY) Scale¹⁹ and the Mini Mental State Examination.²⁰

The principal outcomes investigated were motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations, and they were defined by the presence of at least one of two criteria. For motor fluctuation, the criteria were as follows: (1) a score of one or more in question 39 of the UPDRS and/or (2) intake of levodopa five or more times a day. For dyskinesia, the criteria were as follows: (1) Dyskinesia is a chronic adverse effect, and therefore it is not possible to determine the number of episodes; question 32 of the UPDRS evaluates how long during the day dyskinesia is present. A score of one (1–25% of the day) or more in question 32 of the UPDRS and/or (2) any change in medical treatment due to dyskinesia (for example, adjustment in dopaminergic therapy or use of amantadine due to dyskinesia). For visual hallucinations, the criteria were as follows: (1) a score of two or more in the second question of the UPDRS and/or (2) any change in medical treatment due to hallucinations (for example, adjustment in dopaminergic therapy or use of atypical antipsychotic due to hallucinations). Historical information regarding these outcomes was assessed directly with the patient and/or caregiver and also with a review of an electronic database of medical records at the Movement Disorder Clinics.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures.²¹ Three single-nucleotide polymorphisms (rs4704559, rs10942891 and rs4704560) in the *HOMER1* 5' flanking region were selected, on the basis of their minor allele frequency and a previous study.²² The polymorphisms were genotyped by allelic discrimination

using TaqMan assays according to the manufacturer's recommended protocols (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. Agreement of genotype frequencies to Hardy–Weinberg expectations was tested using a goodness-of-fit χ^2 test. The Haploview program V3.32²³ was used to estimate linkage disequilibrium (LD; D') as a measure of pairwise LD and to create a graphical representation of LD structure.²⁴ Haplotype frequencies and odds ratios were estimated using the default full model implemented in UNPHASED software (version 3.1.7), controlling for covariates. It tests the null hypothesis that there is no difference in OR between haplotypes by using a likelihood-ratio test. *P*-values were estimated and adjusted for 1000 permutations. Individual *P*-values regarding the comparison between each haplotype and the reference one was performed using the UNPHASED 'compare with' option. Bonferroni correction was used for multiple comparisons when it was the case. All other analyses were performed using the SPSS version 18 software. Confounders were previously defined by statistical or conceptual criteria, on the basis of literature review.^{4,5,7} Statistical confounders were those associated with genetic markers and with the outcome at $P \leq 0.1$ in our sample. For categorical variables, association was verified with χ^2 test, and for continuous data, with or without normal distribution, Student's *t* test or Wilcoxon–Mann–Whitney was performed, respectively. Conceptual confounders for motor fluctuations were disease duration and severity of disease (assessed indirectly through HY Scale). For dyskinesia and visual hallucinations, age at onset, disease duration, HY Scale, use of dopamine agonist and levodopa dose corrected by the concomitant use of catechol-O-methyl transferase inhibitor were considered.²⁵ Gender was also selected as a conceptual confounder for dyskinesia.²⁶ European ancestry was included in all analyses in order to control for a possible effect of population stratification.

Multiple Poisson regression with robust variance estimators was used to assess the effect of polymorphisms on the occurrence of motor fluctuations, dyskinesia and visual hallucinations, controlling for putative confounders. This method provides correct estimates, and it is a better alternative for cross-sectional studies with binary outcomes with high frequencies (> 10%) than logistic regression, as the prevalence ratio is more interpretable.^{27,28} Statistical significance was defined as a two-tailed *P*-value < 0.05.

RESULTS

Minor allele frequencies for each polymorphism are as follows: 0.18 for rs4704559, 0.47 for rs4704560 and 0.18 for rs10942891.

Table 1. Demographic and clinical data, overall and according to outcomes

	All	Motor fluctuation			Dyskinesia			Visual hallucination		
		Absent	Present	P	Absent	Present	P	Absent	Present	P
Patients (N)	205	86	119		119	86		151	54	
European ancestry (%)	176 (85.9)	72 (83.7)	104 (87.4)	0.456	101 (84.9)	75 (87.2)	0.636	132 (87.4)	44 (81.5)	0.283
Men (%)	105 (51.2)	41 (47.7)	64 (53.8)	0.388	64 (53.8)	41 (47.7)	0.388	71 (47.0)	34 (63.0)	0.044
Age at onset, mean \pm s.d.	58.77 \pm 11.07	61.15 \pm 11.89	57.04 \pm 10.15	0.010	61.84 \pm 10.51	54.59 \pm 10.59	<0.001	59.67 \pm 11.62	56.58 \pm 9.27	0.050
Disease duration, mean \pm s.d.	8.61 \pm 4.91	6.59 \pm 3.98	10.08 \pm 5.01	<0.001	7.40 \pm 4.69	10.14 \pm 4.60	<0.001	8.13 \pm 4.77	9.62 \pm 4.92	0.037
Levodopa therapy duration, mean \pm s.d.	6.70 \pm 4.81	4.81 \pm 3.77	8.05 \pm 5.06	<0.001	5.50 \pm 4.31	8.35 \pm 5.00	<0.001	6.35 \pm 7.63	7.65 \pm 5.21	0.094
Levodopa dose, mg, mean \pm s.d.	701.10 \pm 289.65	533.14 \pm 210.44	822.48 \pm 278.79	<0.001	636.34 \pm 262.64	796.08 \pm 301.85	<0.001	677.35 \pm 285.39	771.23 \pm 292.88	0.013
Dopamine agonist use (%)	38 (18.5)	15 (17.4)	23 (19.3)	0.732	15 (12.6)	23 (26.7)	0.01	28 (18.5)	10 (18.5)	0.997
COMT inhibitor use (%)	23 (11.2)	0	23 (19.3)	<0.001	5 (4.2)	18 (20.9)	<0.001	14 (9.3)	9 (16.7)	0.139
Hoehn & Yahr stage scale, mean \pm s.d.	2.75 \pm 0.88	2.63 \pm 0.91	2.83 \pm 0.85	0.061	2.66 \pm 0.91	2.87 \pm 0.81	0.089	2.67 \pm 0.85	2.97 \pm 0.92	0.057
UPDRS I, mean \pm s.d.	3.74 \pm 2.68	3.19 \pm 2.34	4.14 \pm 2.85	0.017	3.52 \pm 2.62	4.07 \pm 2.76	0.147	2.84 \pm 1.91	6.30 \pm 2.92	<0.001
UPDRS II, mean \pm s.d.	16.35 \pm 8.96	14.48 \pm 8.51	17.74 \pm 9.06	<0.001	15.44 \pm 8.87	17.71 \pm 9.01	0.071	14.26 \pm 7.78	22.34 \pm 9.49	<0.001
UPDRS III, mean \pm s.d.	34.83 \pm 17.79	33.57 \pm 18.74	35.75 \pm 17.08	0.218	36.43 \pm 16.57	33.02 \pm 19.22	0.031	32.81 \pm 16.55	41.26 \pm 19.59	<0.001
UPDRS IV, mean \pm s.d.	4.30 \pm 3.33	3.04 \pm 2.67	5.22 \pm 3.47	<0.001	2.93 \pm 2.31	6.27 \pm 3.60	<0.001	3.79 \pm 3.02	5.74 \pm 3.76	<0.001
MMSE, mean \pm s.d.	24.87 \pm 3.87	24.32 \pm 4.17	25.29 \pm 3.60	0.138	24.63 \pm 3.90	25.19 \pm 3.84	0.322	25.25 \pm 3.36	23.74 \pm 4.99	0.125

Abbreviations: COMT, catechol-O-methyl transferase; MMSE, mini mental state examination; s.d., standard deviation; UPDRS, unified Parkinson's disease rating scale. *P*-values calculated by *t* test or by Wilcoxon–Mann–Whitney *U*-test (quantitative variables with or without normal distribution, respectively), and χ^2 test (categorical variables).

Genotype distributions are in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). The examination of pairwise LD indicated that the three polymorphisms were in strong LD (D' higher than 0.96; $P < 0.001$ in all comparisons; Supplementary Table 1).

Clinical and demographic data are presented in Table 1. A total of 176 individuals (83.7%) were of exclusively European ancestry (Table 1), and 16.3% were of African ancestry. The distribution of ancestry according to the outcomes studied (motor fluctuation, dyskinesia and visual hallucination) was similar among groups. Patients were aged between 43 and 94 years (67.38 ± 10.34 years), with a mean age at onset of 58.77 ± 11.07 years, and 51.2% were men. Motor fluctuations were present in 58% of patients, and this group had an earlier age at onset of motor symptoms, longer disease duration and used higher levodopa doses. The use of dopamine agonists and HY was not associated with motor

fluctuations. Dyskinesia was present in 42% of the patients and was not associated with gender. This group exhibited an earlier age at onset and longer disease duration. Dyskinesia was also associated with higher levodopa doses and higher frequency of dopamine agonist and catechol-O-methyl transferase inhibitor use. Fifty-four subjects (26.3%) presented with visual hallucinations, and men were more affected. Age at onset was earlier in this group, and disease duration and levodopa doses were higher. There were no associations between visual hallucinations and disease severity, concomitant use of dopamine agonists or catechol-O-methyl transferase inhibitors.

Univariate analyses for individual polymorphisms in a dominant model are shown in Table 2. The *HOMER1* rs4704559 G allele was associated with a lower prevalence of dyskinesia ($P = 0.043$) and visual hallucinations ($P = 0.068$). Motor fluctuations were not associated with this polymorphism. No significant associations

Table 2. Univariate analyses for the effect of individual polymorphisms on the occurrence of motor fluctuation, dyskinesia and visual hallucination

	All	Motor fluctuation			Dyskinesia			Visual hallucination		
		Absent	Present	P	Absent	Present	P	Absent	Present	P
<i>rs4704559</i>	205									
GG/GA (%)	66 (32.2)	28 (42.4)	38 (57.6)	0.925	45 (68.2)	21 (31.8)	0.043	54 (81.8)	12 (18.2)	0.068
AA (%)	139 (67.8)	58 (41.7)	81 (58.3)		74 (53.2)	65 (46.8)		97 (69.8)	42 (30.2)	
<i>rs4704560</i>	203									
CC/CT (%)	142 (70)	61 (43.0)	81 (57.0)	0.632	84 (59.2)	58 (40.8)	0.651	104 (73.2)	38 (26.8)	0.569
TT (%)	61 (30)	24 (39.3)	37 (60.7)		34 (55.7)	27 (44.3)		47 (77.0)	14 (23.0)	
<i>rs10942981</i>	204									
GG/GC (%)	64 (31.4)	28 (43.8)	36 (56.2)	0.683	36 (56.2)	28 (43.8)	0.755	47 (73.4)	17 (26.6)	0.898
CC (%)	140 (68.6)	57 (40.7)	83 (59.3)		82 (58.6)	58 (41.4)		104 (74.3)	36 (25.7)	

Table 3. Multiple Poisson regression analyses of *HOMER1* polymorphism rs4704559 predicting dyskinesia among Parkinson's disease patients who use levodopa

	PR	95% Confidence interval	P
<i>rs4704559</i> (GG/GA)	0.615	0.426–0.887	0.009
Male, sex	0.778	0.576–1.050	0.101
European ancestry	1.046	0.711–1.537	0.821
Age at onset (effect for an increase in 10 years)	0.706	0.618–0.807	< 0.001
Levodopa dose corrected for COMT inhibitor use (effect for an increase in 200 mg)	1.170	1.085–1.261	< 0.001
Dopamine agonist use	1.157	0.856–1.563	0.344
Hoehn & Yahr scale (≥ 3)	1.643	1.208–2.234	0.002

Abbreviations: COMT, catechol-O-methyl transferase; PR, prevalence ratio. $\chi^2 = 28.81$, d.f. = 7, $P < 0.001$.

Table 4. Multiple Poisson regression analyses of *HOMER1* polymorphism rs4704559 predicting visual hallucination among Parkinson's disease patients who use levodopa

	PR	95% Confidence interval	P
<i>rs4704559</i> (GG/GA)	0.515	0.295–0.899	0.020
European ancestry	0.710	0.433–1.165	0.175
Age at onset (> 59 years)	0.502	0.286–0.880	0.016
Levodopa dose corrected for COMT inhibitors use (effect for an increase in 200 mg)	1.131	0.980–1.307	0.093
Dopamine agonist use	0.710	0.377–1.337	0.289
Hoehn & Yahr scale (≥ 3)	1.619	0.986–2.659	0.057

Abbreviations: COMT, catechol-O-methyl transferase; PR, prevalence ratio. $\chi^2 = 14.41$, d.f. = 6, $P = 0.025$.

Table 5. Multivariate analysis using UNPHASED for the presence of the haplotype GCT and the presence of dyskinesia and visual hallucination

	Haplotype rs4704559 rs4704560 rs10942891	Affected frequency	Unaffected frequency	Affected vs unaffected OR (CI 95%)	Global P-value	Global P-value (adjusted)
Visual hallucination ^a	GCT	0.1296	0.1967	0.4637 (0.2374–0.9057)	0.018	0.01988
	ACC/ACT/AGT	0.8704	0.8034	1		
Dyskinesia ^b	GCT	0.1395	0.2076	0.4735 (0.2575–0.8706)	0.014	0.02098
	ACC/ACT/AGT	0.8605	0.7924	1		

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratios. ^aCovariates: European ancestry, age at onset (> 59 years), levodopa dose corrected for COMT inhibitor use, dopamine agonist use and Hoehn & Yahr scale (≥ 3). ^bCovariates: European ancestry, gender, age at onset, levodopa dose corrected for COMT inhibitor use, dopamine agonist use and Hoehn & Yahr scale (≥ 3).

were observed between the other single nucleotide polymorphisms and levodopa adverse effects.

Multiple Poisson regression analyses were performed for the association between the rs4704559 A/G polymorphism with the presence of dyskinesia and visual hallucinations, controlling for the conceptual confounders previously described. On the basis of our previous definition, there was no statistical confounder. Age at onset and disease duration were correlated ($r = -0.37$, $P < 0.001$), and therefore only the first variable was included in final models to avoid multicollinearity. Age was dichotomized in 59 years because of a nonlinear effect of age at onset on visual hallucinations. The rs4704559 G allele was associated with lower frequencies of dyskinesia and visual hallucinations (dyskinesia: prevalence ratio = 0.615, 95% confidence interval 0.426–0.887, $P = 0.009$; visual hallucinations: prevalence ratio = 0.515, 95% confidence interval 0.295–0.899, $P = 0.020$; Tables 3 and 4).

Dyskinesia was also associated with increased disease severity (HY scale), higher levodopa dose corrected for catechol-O-methyl transferase inhibitor and lower age at onset of motor symptoms (Table 4), whereas visual hallucinations were associated with earlier age at onset of motor symptoms (Table 5). Potential interaction effects between the polymorphism and covariates were considered in both models without significant results (all $P > 0.4$). The overall adequacy of the final models was estimated by the likelihood-ratio χ^2 test (dyskinesia: $P < 0.001$; visual hallucinations: $P = 0.025$).

Haplotype analysis was performed for dyskinesia and visual hallucination, controlling for previously described covariates (Table 5). The GCT haplotype was compared with the other haplotypes, as this was the only one that had the rs4704559 G allele that was associated with the outcomes. The presence of the GCT haplotype was associated with dyskinesia (odds ratios = 0.47, 95% confidence interval 0.26–0.87, adjusted $P = 0.021$) and with visual hallucination (odds ratios = 0.46, 95% confidence interval 0.24–0.91, adjusted $P = 0.019$), as expected from the analysis of the single polymorphism (Tables 3 and 4).

DISCUSSION

This study evaluated candidate polymorphisms in the promoter region of *HOMER1*, a gene involved in glutamate transmission and neuroplasticity in relation to the adverse effects induced by chronic use of levodopa in Parkinson's disease patients. The major findings reported herein were the association of the rs4704559 G allele with a lower prevalence of levodopa-induced dyskinesia and visual hallucinations, suggesting that this allele has a protective role for the development of levodopa adverse effects.

Visual hallucinations were associated with a higher levodopa dose in our sample. This finding was previously reported in one study, but not all.^{7,29} Age at onset of motor symptoms was lower in patients with visual hallucinations, but this fact could represent higher disease duration and more time on medication.

In the same line of earlier studies,^{30,31} our patients with hallucinations have worse scores in UPDRS II, which represents activities of daily living, and UPDRS III, which represents motor impairment.

A previous study reported an association between the *HOMER1* rs4704559 A allele and higher risk of hallucinations in 131 PD patients.²² The present study is the second independent demonstration that *HOMER1* rs4704559 influences the occurrence of hallucinations and may be one of the genetic risk factors for the occurrence of this levodopa side effect. Considering that the rare G allele of this polymorphism was associated with a lower prevalence of visual hallucinations in the present sample, our result could be regarded as a replication of that report in a larger sample with a different ethnic background.

Implication of glutamate in the origin of levodopa-induced dyskinesia is not a new concept and, in fact, the only drug approved to treat this condition is a glutamate antagonist—amantadine.³² The pulsatile stimulation provided by levodopa therapy leads to hyperactivity of the glutamate transmission, observed both in animal models and in humans with dyskinesia.³³ Homer1 is a family of proteins involved in glutamatergic transmission, and the expression of its short variant (Homer1a) is induced by dopamine agonists.^{11–13} Despite these data, the relationship between levodopa-induced dyskinesia and *HOMER1* polymorphisms has not been investigated so far. Previous reports mostly investigated the association with polymorphisms in genes involved in dopamine transmission.^{15,16,34,35} We showed an association between the *HOMER1* rs4704559 G allele and lower prevalence of levodopa-induced dyskinesia in this study, suggesting a protective effect of this allele for the development of this adverse effect.

There are no reports about the potential function of the rs4704559 polymorphism and the mechanisms through which it influences dyskinesia and/or visual hallucinations in levodopa-treated PD patients. Considering this lack of information, it could be hypothesized that this polymorphism, in the 5' UTR, close to the gene promoter, has a role in transcription regulation. Homer1 has two variants: Homer1b/c, constitutively expressed, and Homer1a, expressed under special circumstances as an immediate early gene product.¹⁰ It has been demonstrated that dopamine agonists induced the expression of Homer1a; as the rs4704559 polymorphism is close to the promoter region, it could potentially affect the expression of this induced variant.^{11–13} Therefore, it is possible that it interferes with the formation of Homer1 dimers, disrupts the link between the glutamate receptor and its second messengers and affects glutamatergic transmission. Clearly, more studies are needed to disclose the functional effect of this variant on gene function.

The overall results presented in this study should be viewed in the context of some limitations. The sample is of moderate size, and thus these data require additional confirmation in a larger sample. Because this study is cross-sectional, it was not possible to trace the exact time that each patient takes to develop dyskinesia.

A longitudinal design would be preferable to better delineate the time at onset of adverse effects and to better appreciate the importance of each covariate as risk factors. Although a study with 48 ancestry informative markers did not show significant population structure in Southern Brazilians,³⁶ no genomic control was performed in the present work. Therefore, our findings could have been biased by hidden genetic heterogeneity, but we used ethnicity as a covariate in all analyses. The study design is observational-naturalistic, which is valuable to better appreciate the role of genetic factors in routine clinical practice beyond the realm of controlled clinical trials. Despite this, in a naturalistic design, the controlling of confounders is a challenge. However, it is unlikely that the results could be attributed to other factors, because an extensive assessment of potential confounders between groups was performed. Moreover, the previously described association between the rs4704559 polymorphism and hallucinations was also observed in a naturalistic study.²²

PD, between all the neurodegenerative disorders, is the only one that has an important symptomatic therapy. However, these treatments can lead to adverse events that have an impact on the quality of life and are a challenge to the clinician. Understanding the mechanisms underlying this variability in pharmacological response would be an important tool to choose better treatment strategies, to better select patients for clinical trials and to give new insights for drug discovery. Although there is growing evidence linking glutamate transmission and neuroplasticity with PD, few attempts were made to investigate the relationship of genes associated with these processes and the response to dopaminergic drugs. The results presented herein provide evidence for a relationship between *HOMER1* and adverse effects induced by levodopa therapy. Future neuroimaging and pathological studies including genes will help develop new diagnostic tools and more personalized therapies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

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). Source of grants: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil) and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE - HCPA).

REFERENCES

- 1 De Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2006; **5**: 525–535.
- 2 Fénelon G, Alves G. Epidemiology of psychosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2010; **289**: 12–17.
- 3 Ahlskog JE, Muentner MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 2001; **16**: 448–458.
- 4 Nutt JG. Motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2001; **8**: 101–108.
- 5 Hauser RA, McDermott MP, Messing S. Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006; **63**: 1756–1760.
- 6 Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Tambasco N, Picconi B. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *Lancet Neurol* 2010; **9**: 1106–1117.
- 7 Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Goetz CG, Stebbins GT, Aarsland D *et al*. A 12-year population-based study of psychosis in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2010; **67**: 996–1001.

- 8 Linazasoro G. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 2005; **26**: 391–397.
- 9 Thomas U. Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem* 2002; **81**: 407–413.
- 10 Luo P, Li X, Fei Z, Poon W. Scaffold protein Homer 1: implications for neurological diseases. *Neurochem Int* 2012; **61**: 731–738.
- 11 Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR. A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 1998; **18**: 5301–5310.
- 12 Sgambato-Faure V, Buggia V, Gilbert F, Lévesque D, Benabid A-L, Berger F. Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 936–947.
- 13 Yamada H, Kuroki T, Nakahara T, Hashimoto K, Tsutsumi T, Hirano M *et al*. The dopamine D1 receptor agonist, but not the D2 receptor agonist, induces gene expression of Homer 1a in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 2007; **1131**: 88–96.
- 14 Henning J, Koczan D, Glass A, Karopka T, Pahnke J, Rolfs A *et al*. Deep brain stimulation in a rat model modulates TH, CaMKIIa and *Homer1* gene expression. *Eur J Neurosci* 2007; **25**: 239–250.
- 15 Rieck M, Schumacher-Schuh AF, Altmann V, Francisconi CL, Fagundes PT, Monte TL *et al*. DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics* 2012; **13**: 1701–1710.
- 16 Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Rieder CR *et al*. Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; **16**: 1251–1258.
- 17 Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992; **42**: 1142–1146.
- 18 Martínez-Martín P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gómez JB, Martínez-Sarriés J, Bermejo F. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord* 1994; **9**: 76–83.
- 19 Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; **17**: 427–442.
- 20 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; **12**: 189–198.
- 21 Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Hodes ME, Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods* 1992; **25**: 193–205.
- 22 De Luca V, Annesi G, De Marco EV, De Bartolomeis A, Nicoletti G, Pugliese P *et al*. *HOMER1* promoter analysis in Parkinson's disease: association study with psychotic symptoms. *Neuropsychobiology* 2009; **59**: 239–245.
- 23 Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 2008; **66**: 89–98.
- 24 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263–265.
- 25 Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010; **25**: 2649–2653.
- 26 Zappia M, Annesi G, Nicoletti G, Arabia G, Annesi F, Messina D *et al*. Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study. *Arch Neurol* 2005; **62**: 601–605.
- 27 Katz KA. The (relative) risks of using odds ratios. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 761–764.
- 28 Barros AJD, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol* 2003; **3**: 21.
- 29 Goetz CG, Leurgans S, Pappert EJ, Raman R, Steiner AB. Prospective longitudinal assessment of hallucinations in Parkinson's disease. *Neurology* 2001; **57**: 2078–2082.
- 30 Holroyd S, Currie L, Wooten GF. Prospective study of hallucinations and delusions in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2001; **70**: 734–738.
- 31 Aarsland D, Larsen JP, Cummins JL, Laake K. Prevalence and clinical correlates of psychotic symptoms in Parkinson disease: a community-based study. *Arch Neurol* 1999; **56**: 595–601.
- 32 Elahi B, Phielipp N, Chen R. N-Methyl-D-Aspartate antagonists in levodopa induced dyskinesia: a meta-analysis. *Can J Neurol Sci* 2012; **39**: 465–472.
- 33 Ahmed I, Bose SK, Pavese N, Ramlackhansingh A, Turkheimer F, Hotton G *et al*. Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain* 2011; **134**: 979–986.

- 34 Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan E-K, Drozdziak M. The association of functional catechol-O-methyl transferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 815–821.
- 35 Paus S, Gadow F, Knapp M, Klein C, Klockgether T, Wüllner U. Motor complications in patients from the German Competence Network on Parkinson's disease and the DRD3 Ser9Gly polymorphism. *Mov Disord* 2009; **24**: 1080–1084.
- 36 Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A *et al*. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; **31**: 184–190.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tpj>)

Capítulo 6: COMT Val158Met polymorphism is associated with visual hallucinations in Parkinson's disease patients on levodopa therapy.

Manuscrito em fase de preparação a ser submetido ao periódico Pharmacogenomics.

COMT Val158Met polymorphism is associated with visual hallucinations in Parkinson's disease patients on levodopa therapy

Artur F Schumacher-Schuh^{1,2}; Vivian Altmann¹; Márcio S Medeiros²; Mariana Rieck¹; Thais L Monte²; Sidia M Callegari-Jacques³; Carlos RM Rieder²; Mara H Hutz¹.

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Mara H. Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.

Caixa postal 15053

Porto Alegre, RS,. 91501-970

Brazil.

Phone: +55 51 3308 6720

Fax: +55 51 3308 7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Abstract

Aims: Visual hallucinations (VH) are a common complication of chronic dopaminergic therapy in Parkinson's disease (PD) patients. COMT is an enzyme that degrades catecholamines and has an important role in dopaminergic neurotransmission. The aim of this work was to investigate the effect of COMT polymorphism on VH occurrence in PD.

Patients & Methods: PD patients in use of chronic dopaminergic therapy were evaluated to determine the presence of VH and were genotyped for COMT Val158Met polymorphisms.

Results: Carriers of the COMT Val158Met Met allele showed an increased prevalence of VH after controlling for covariates (PR = 2.51, 95% CI 1.31 – 4.79, P = 0.005).

Conclusions: our results support an influence of COMT Val158Met polymorphism in the occurrence of VH in PD patients in use of chronic dopaminergic therapy

Keywords: pharmacogenetics, Parkinson's disease, levodopa, visual hallucination, COMT polymorphisms

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder that affects 1-3% of people over 65 years. The core symptoms are bradykinesia, resting tremor and rigidity [1]. Non-motor symptoms are also an integral part of the disease, which include psychotic symptoms. The mainstay pharmacological approach is the use of levodopa, a dopamine precursor, which provides motor symptoms relief. However, the long-term use of this drug could be associated with unwanted side effects, like visual hallucinations (VH)[2].

VH is a symptom difficult to manage and usually determines an increased burden to caregiver. This complication occurs in a third of patients and is a risk factor for dementia, nursing home placement and mortality [3, 4, 5, 6]. The origin of visual hallucinations seems to result from an interaction of disease related phenomena as well as a pharmacological effect [2]. The hyperdopaminergic state generated by the use of levodopa and other agents, especially in the forebrain, could contribute to VH. The human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene, located on chromosome 22q11, encodes an enzyme that catalyzes one of the main degradation pathways of catecholamine neurotransmitters, which include dopamine [7]. The Val158Met (rs4680) polymorphism is a functional genetic variant resulting in a valine (Val) to methionine (Met) substitution. The Met amino acid results in a protein with a fourfold reduction in enzymatic activity [8, 9]. Other polymorphisms were also investigated and could potentially influence COMT activity, but the best predictor of enzyme activity seems to be Val158Met polymorphism [10].

The ability to predict patients more prone to develop unwanted symptoms, like VH, is an important goal to achieve a personalized prescription to PD patients. Considering the role of COMT on dopamine metabolism, our aim was to investigate the effect of *COMT* Val158Met polymorphism on VH occurrence.

Patients & Methods

The present cross-sectional study includes 193 PD patients on levodopa therapy. Sample characteristics and procedures have been fully described elsewhere [11, 12]. Briefly, patients from the Movement Disorder Clinics at “Hospital de Clínicas de Porto Alegre” with a diagnosis of idiopathic PD were recruited from 2006 to 2012. Atypical presentations of PD or secondary parkinsonism were excluded. All patients were in use of at least 200mg of levodopa for a minimum period of one year and with an initial good response to the drug. The hospital Ethics Committee approved the study protocol and all patients gave a written informed consent.

Clinical evaluation

Patients and their caregivers underwent a structured interview for collecting clinical and demographic data. Information was also obtained from an electronic database of medical records. A trained physician applied the four parts of the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS) [13], the Hoehn & Yahr (HY) Scale [14] and the Mini Mental State Examination [15].

The outcome investigated was visual hallucinations. This was defined by the presence of at least one of two criteria: (1) a score of two or more in the second question of the UPDRS and/or (2) any change in medical treatment due to hallucinations (e.g. adjustment in dopaminergic therapy or use of atypical antipsychotic due to hallucinations). Historical information regarding this outcome was assessed directly with patient and/or caregiver and also with a review of the medical records.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures [16]. COMT Val158Met polymorphism was genotyped by allelic discrimination using TaqMan assays according to the manufacturer’s recommended protocols (Applied Biosystems, CA, USA).

Statistical Analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. Agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using a

goodness of fit χ^2 test. All analyses were performed using SPSS version 18 software.

Confounders were previously defined by statistical or conceptual criteria, based on literature review [17]. Statistical confounders were those associated with genetic markers and with the outcome at $P \leq 0.1$ in our sample. For categorical variables, the association was tested with χ^2 test. Continuous data, with or without normal distribution, were tested with Student t or Wilcoxon-Mann-Whitney, respectively. Conceptual confounders were age at onset of motor symptoms, disease duration, Hoehn & Yahr Scale (representing disease severity), concomitant use of dopamine agonist and levodopa dose corrected by the use of COMT inhibitor [18]. Since COMT inhibitors act by prolonging levodopa half-life and do not seem to have an intrinsic effect, they were not considered as independent conceptual covariables in the regression model. When the patient was taking this drug, a correction factor was applied to total levodopa dose. European ancestry was included in order to control for a possible effect of population stratification. *DAT* -839C allele (rs2836170) was included as a confounder since it was previously described to be associated to VH in this sample [12]. A possible interaction effect between *COMT* and *DAT* allele was tested in an additive model.

Multiple Poisson regression with robust variance estimators was used to assess the effect of polymorphisms on the occurrence of VH, controlling for putative confounders. Poisson regression was employed because the outcomes were not rare events in our sample [19]. Statistical significance was defined as a two-tailed P-value < 0.05 .

Results

Demographic and clinical characteristics of the patients included in this sample are shown in table 1. Visual hallucinations occurred in 48 (24.9%) patients. The age at onset of motor symptoms was earlier in those with VH, with an increased duration of disease. Duration of levodopa therapy was not associated with this outcome, although patients with VH were taking higher doses of levodopa and are more prone to be in use of COMT inhibitors. Also, the group with VH had a more advanced and severe PD, considering the higher scores in Hoehn & Yahr scale and in the UPDRS. The same demographic and clinical characteristics, according to COMT genotype, are presented in table 2, and none of them were associated with genotypes. The minor allele frequency for Val158Met was 0.48 and genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium.

Multiple Poisson regression analysis was performed for the association between the Val158Met polymorphism and VH, in a dominant model, controlling for confounders. Age at onset and disease duration was correlated ($r = -0.34$, $P < 0.001$), thus only the first variable was included in final models to avoid multicollinearity. Age was dichotomized in 59 years due to a non-linear effect of age at onset on VH. Interaction terms between COMT polymorphism and the other covariates were included in the regression model and none of them were significant ($P > 0.05$).

The first model was derived without considering *DAT* -839C allele; the presence of *COMT* 158Met allele was associated with visual hallucinations (PR = 2.24, 95% CI 1.15 – 4.37, $P = 0.018$; table 3). The second model included *DAT* -839C allele as a confounder and the significance for the effect of *COMT* was higher (PR = 2.51, 95% CI 1.31 – 4.79, $P = 0.005$; table 4). The joint effect of *COMT* and *DAT* polymorphisms was tested in a third model, with a variable that included both risk alleles in an additive model, and the result were similar to those of *COMT* and *DAT* single effects (PR = 2.45, 95% CI 1.50 – 4.00, $P < 0.001$).

Discussion

This study reports an association between *COMT* Val158Met (rs4680) Met allele and visual hallucinations in a sample of PD patients on dopaminergic therapy. This effect remains after controlling for the presence of *DAT* -839C allele (rs28363170), a polymorphism previously associated with VH in the same cohort [12].

Visual hallucinations were present in 24.9% of our sample and is in the same range as previously described (22-38%) [2]. Although VH in PD is an endpoint that few patients report spontaneously, it is easily evoked by direct specific questions and causes concerns to patients and caregivers. Once present, it has a tendency to persist and even worsen [20]. The Hoehn & Yahr scale and the UPDRS were higher in the group with VH, indicating that those patients had a more severe disease with more impact on motor function and daily activities. Cognitive dysfunction and older age were previously associated with VH [17, 21], but this finding was not detected in our sample.

The levodopa dose was higher in the group with VH, as well as the use of *COMT* inhibitors, suggesting an effect of dopaminergic therapy on occurrence of this outcome. This relation was previously observed [17], but was not widely accepted [20]. Although *COMT* inhibitor use was more prevalent in those with VH, this drug was not associated with *COMT* genotypes in the present study. However, differential pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to entacapone (a *COMT* inhibitor) according to *COMT* Val158Met genotype have been reported [22]. The clinical effect of the interaction between *COMT* inhibitor use and *COMT* polymorphism has not been investigated due to the few number of patients using this drug in the present sample (N = 21).

COMT has an important role in dopaminergic neurotransmission, mainly in the pre-frontal cortex, a region related to psychotic symptoms. The hyperdopaminergic state is associated with VH and most previous genetic association studies evaluated polymorphisms in genes involved with dopamine transmission [23, 24, 25, 26, 27, 28]. In the present study the presence of the Met allele was associated with an increased prevalence of visual hallucinations in PD patients on dopaminergic drugs. Patients with Met allele had a lower *COMT*

enzymatic activity, what could lead to a more sustained presence of dopamine in the synaptic cleft and to a relative hyperdopaminergic state that could explain the association observed. This polymorphism was previously associated with cognitive deficits in PD [29]; however, in Lewy body dementia, an entity that shares many similarities with PD, *COMT* Val158Met polymorphism was not associated with psychotic symptoms [30].

Previous *COMT* Val158Met pharmacogenetic investigations in PD were reported with different outcomes. Two studies showed association of higher levodopa dose with *COMT* Val allele [31, 32], but pharmacokinetic and pharmacodynamics aspects of levodopa were not associated with this polymorphism [33, 34]. Levodopa induced dyskinesia was recently described in one study [35], but not all [33, 36]. No association was observed for impulse control disorders, as well as daytime sleepiness [37, 38]. Homozygosis for the Val allele was associated with an increased pharmacodynamic and pharmacokinetic response to entacapone, a *COMT* inhibitor [22]. No clinical difference in drug response according to *COMT* genotypes was observed for tolcapone [39].

The present results should be interpreted in the context of some limitations. Due to the absence of a standard definition and assessment method for VH in PD, our results could have a limited external validity. When these clinical tools would be available, improved comparability will be available for future studies. Although we have controlled for disease duration and age at onset, the present investigation has a cross-sectional design and the exact time to develop VH could not be determined; studies with longitudinal designs would be preferred. Our sample size was adequate to detect the effects reported, but studies with larger sample sizes are warranted to replicate the present findings. Population stratification is always a concern in genetic association studies and genomic control would be the preferable method to control this effect, but it was not performed in our sample. However, ancestry information was included as confounder in all analyses. Additionally, a study with 48 ancestry informative markers did not show stratification between southern Brazilians [40].

Conclusions

The results of this investigation suggest that *COMT* Val158Met polymorphism is associated with visual hallucinations development in Parkinson's disease patients in use of dopaminergic agents. The risk allele (Met) codes a lower activity isoform that could lead to a delayed depuration of the dopamine released in the synaptic cleft, inducing a hyperdopaminergic state in carriers of this allele. This relative excess of dopamine could make these patients more prone to develop visual hallucinations.

Future perspective

Studies of genetic polymorphisms influencing pharmacological response in PD are scarce, although this is the only neurodegenerative disorder with an important symptomatic treatment. However, the long-term use of dopaminergic agents is associated with adverse events, like visual hallucinations. Delineating genetic risk profiles to develop these complications are important to individualize treatments, select patients for clinical trials and give insights to new pharmacological targets.

Executive summary

Introduction

Visual hallucination is a common and disabling complication in patients with Parkinson's disease in use of chronic dopaminergic treatment.

COMT has an important role in dopamine degradation released in the synaptic cleft.

Patients & Methods

A total of 193 patients were evaluated for the presence of visual hallucinations. Multiple Poisson regression analysis was performed to verify the association between *COMT* Val158Met polymorphism and visual hallucination, controlling for potential confounders, including *DAT* polymorphism.

Results

The *COMT* Met allele was associated with VH. There was no interaction between *DAT* and *COMT*.

Conclusion

The data presented here support a role for *COMT* Val158Met polymorphism on the occurrence of VH in PD patients in use of chronic dopaminergic therapy.

References

1. De Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5(6), 525–535 (2006).
2. Fénelon G, Alves G. Epidemiology of psychosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 289(1-2), 12–17 (2010).
3. Galvin JE, Pollack J, Morris JC. Clinical phenotype of Parkinson disease dementia. *Neurology.* 67(9), 1605–1611 (2006).
4. Hobson P, Meara J. Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 19(9), 1043–1049 (2004).
5. Aarsland D, Larsen JP, Tandberg E, Laake K. Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: a population-based, prospective study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 48(8), 938–942 (2000).
6. Goetz CG, Stebbins GT. Mortality and hallucinations in nursing home patients with advanced Parkinson's disease. *Neurology.* 45(4), 669–671 (1995).
7. Weinshilboum RM, Raymond FA. Inheritance of low erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in man. *Am. J. Hum. Genet.* 29(2), 125–135 (1977).
8. Bertocci B, Miggiano 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.* 88(4), 1416–1420 (1991).
9. 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. (1997).
10. Chen J, Lipska BK, Halim N, *et al.* Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. (2004).
11. Rieck M, Schumacher-Schuh AF, Altmann V, *et al.* DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics.* 13(15), 1701–1710 (2012).
12. Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, *et al.* Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP.* , 1–8 (2013).
13. Martínez-Martín P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gómez JB, Martínez-Sarriés J, Bermejo F. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 9(1), 76–83 (1994).
14. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 17(5), 427–442 (1967).
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12(3), 189–198 (1975).

16. Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI, Hodes ME, Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods*. 25(4), 193–205 (1992).
17. Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, *et al*. A 12-year population-based study of psychosis in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 67(8), 996–1001 (2010).
18. Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25(15), 2649–2653 (2010).
19. Barros AJD, Hiraakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med. Res. Methodol.* 3, 21 (2003).
20. Goetz CG, Leurgans S, Pappert EJ, Raman R, Stemer AB. Prospective longitudinal assessment of hallucinations in Parkinson's disease. *Neurology*. 57(11), 2078–2082 (2001).
21. Biglan KM, Holloway RG Jr, McDermott MP, Richard IH. Risk factors for somnolence, edema, and hallucinations in early Parkinson disease. *Neurology*. 69(2), 187–195 (2007).
22. Corvol J-C, Bonnet C, Charbonnier-Beaupel F, *et al*. The COMT Val158Met polymorphism affects the response to entacapone in Parkinson's disease: A randomized crossover clinical trial. *Ann. Neurol.* 69(1), 111–118 (2011).
23. Fujii C, Harada S, Ohkoshi N, *et al*. Association between polymorphism of the cholecystokinin gene and idiopathic Parkinson's disease. *Clin. Genet.* 56(5), 394–399 (1999).
24. Wang J, Si Y-M, Liu Z-L, Yu L. Cholecystokinin, cholecystokinin-A receptor and cholecystokinin-B receptor gene polymorphisms in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*. 13(6), 365–369 (2003).
25. Goldman JG, Goetz CG, Berry-Kravis E, Leurgans S, Zhou L. Genetic polymorphisms in Parkinson disease subjects with and without hallucinations: an analysis of the cholecystokinin system. *Arch. Neurol.* 61(8), 1280–1284 (2004).
26. Goldman JG, Marr D, Zhou L, *et al*. Racial differences may influence the role of cholecystokinin polymorphisms in Parkinson's disease hallucinations. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26(9), 1781–1782 (2011).
27. Contin M, Martinelli P, Mochi M, *et al*. Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease. *Clin. Neuropharmacol.* 27(3), 111–115 (2004).
28. Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, *et al*. L -dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology*. 60(11), 1750–1755 (2003).
29. Wu K, O'Keeffe D, Politis M, *et al*. The catechol-O-methyltransferase Val(158)Met polymorphism modulates fronto-cortical dopamine turnover in early Parkinson's disease: a PET study. *Brain J. Neurol.* 135(Pt 8), 2449–2457 (2012).

30. Creese B, Ballard C, Aarsland D, Londos E, Sharp S, Jones E. No association of COMT val158met polymorphism and psychotic symptoms in Lewy body dementias. *Neurosci. Lett.* 531(1), 1–4 (2012).
31. Białecka M, Drożdżik M, Kłodowska-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. (2004).
32. Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan E-K, Drozdik M. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. (2008).
33. Contin M, Martinelli P, Mochi M, Riva R, Albani F, Baruzzi A. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. (2005).
34. 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. (2001).
35. De Lau LML, Verbaan D, Marinus J, Heutink P, van Hilten JJ. Catechol-O-methyltransferase Val158Met and the risk of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27(1), 132–135 (2012).
36. Watanabe M, Harada S, Nakamura T, *et al.* Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease. (2003).
37. Vallelunga A, Flaibani R, Formento-Dojot P, Biundo R, Facchini S, Antonini A. Role of genetic polymorphisms of the dopaminergic system in Parkinson's disease patients with impulse control disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18(4), 397–399 (2012).
38. Rissling I, Frauscher B, Kronenberg F, *et al.* Daytime sleepiness and the COMT val158met polymorphism in patients with Parkinson disease. (2006).
39. D J Chong, Suchowersky O, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Brant R, Campbell NR. The relationship between COMT genotype and the clinical effectiveness of tolcapone, a COMT inhibitor, in patients with Parkinson's disease. .
40. Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum. Mutat.* 31(2), 184–190 (2010).

Table 1: Demographic and clinical characteristics, overall and according to the presence of visual hallucinations

	All	Visual hallucinations		P
		Absent	Present	
Patients (N)	193	145 (75.1)	48 (24.9)	
European ancestry, count (%)	169 (87.6)	129 (89.0)	40 (83.3)	0.305
Males, count (%)	98 (50.8)	67 (46.2)	31 (64.6)	0.027
Age at onset, years, mean \pm SD	59.31 \pm 11.00	60.19 \pm 11.38	56.65 \pm 9.37	0.052
Disease duration, years, mean \pm SD	8.76 \pm 4.82	8.35 \pm 4.65	10.00 \pm 5.16	0.054
Levodopa therapy duration, years, mean \pm SD	6.58 \pm 4.78	6.25 \pm 4.57	7.56 \pm 5.31	0.117
Levodopa dose, mg, mean \pm SD	705.44 \pm 293.94	666.55 \pm 284.14	822.92 \pm 294.67	< 0.001
Dopamine agonist use, count (%)	32 (16.6)	21 (14.5)	11 (22.9)	0.173
COMT inhibitor use, count (%)	21 (10.9)	12 (8.3)	9 (18.8)	0.043
Hoehn&Yahr stage scale, mean \pm SD	2.72 \pm 0.88	2.62 \pm 0.84	3.00 \pm 0.93	0.020
UPDRS part I, mean \pm SD	3.74 \pm 2.65	2.88 \pm 1.87	6.35 \pm 2.93	< 0.001
UPDRS II, mean \pm SD	16.37 \pm 8.91	14.38 \pm 7.71	22.40 \pm 9.66	< 0.001
UPDRS III, mean \pm SD	34.89 \pm 17.28	32.72 \pm 16.25	41.42 \pm 18.79	0.002
UPDRS IV, mean \pm SD	4.05 \pm 3.28	3.53 \pm 2.96	5.62 \pm 3.69	< 0.001
MMSE, mean \pm SD	24.89 \pm 4.14	25.26 \pm 3.38	23.67 \pm 5.90	0.236

SD: standard deviation

Table 2: Demographic and clinical data according to COMT genotypes.

Characteristics	COMT			P
	ValVal (49)	ValMet (102)	MetMet (42)	
European ancestry, count (%)	40 (81.6)	91 (89.2)	38 (90.5)	0.187
Males, count (%)	24 (49.0)	56 (54.9)	18 (42.9)	0.625
Age at onset, years, mean \pm SD	57.82 \pm 10.87	59.89 \pm 10.75	59.64 \pm 11.81	0.505
Disease duration, years, mean \pm SD	8.27 \pm 4.49	9.22 \pm 5.12	8.24 \pm 4.42	0.972
Levodopa therapy duration, years, mean \pm SD	6.41 \pm 4.65	6.74 \pm 5.20	6.38 \pm 3.91	0.791
Levodopa dose, mg, mean \pm SD	724.49 \pm 303.68	712.75 \pm 266.94	665.48 \pm 344.82	0.216
Dopamine agonist use, count (%)	8 (16.3)	17 (16.7)	7 (16.7)	0.964
COMT inhibitor use, count (%)	5 (10.2)	11 (10.8)	5 (11.9)	0.799
Hoehn&Yahr stage scale, mean \pm SD	2.52 \pm 0.89	2.83 \pm 0.85	2.68 \pm 0.90	0.320
UPDRS part I, mean \pm SD	3.47 \pm 2.20	4.10 \pm 2.80	3.19 \pm 2.66	0.511
UPDRS II, mean \pm SD	14.14 \pm 8.49	17.62 \pm 9.10	15.95 \pm 8.70	0.252
UPDRS III, mean \pm SD	31.71 \pm 17.20	37.33 \pm 17.06	32.64 \pm 17.40	0.616
UPDRS IV, mean \pm SD	4.02 \pm 3.39	4.08 \pm 2.95	4.02 \pm 3.90	0.747
MMSE, mean \pm SD	25.75 \pm 3.41	24.56 \pm 3.82	24.62 \pm 5.42	0.325

SD: standard deviation

Table 3: Poisson regression analysis of risk factors for the development of visual hallucinations as a side effect of levodopa therapy

	Prevalence ratio	95% CI	P
Age at onset (> 59 years)	0.63	0.35 – 1.15	0.130
Modified levodopa equivalent dose* / 200	1.21	1.05 – 1.39	0.008
Agonist use	1.25	0.63 – 2.49	0.526
European ancestry	1.76	0.98 – 3.16	0.060
HY	1.74	1.03 – 2.95	0.040
COMT 158Met	2.24	1.15 – 4.37	0.018

Goodness of fit $\chi^2 = 18.11$; df = 6; P = 0.006.

*Total levodopa dose corrected for the use of COMT inhibitors

Table 4: Poisson regression analysis of risk factors for the development of visual hallucinations as a side effect of levodopa therapy

Texto	Prevalence ratio	95% CI	p
Age at onset (> 59 years)	0.60	0.34 – 1.05	0.074
Modified levodopa equivalent dose* / 200	1.26	1.12 – 1.43	< 0.001
Agonist use	1.33	0.71 – 2.49	0.372
European ancestry	1.72	0.96 – 3.06	0.069
HY	1.77	1.07 – 2.93	0.026
Presence of DAT -839 C allele	2.92	1.28 – 6.66	0.011
COMT 158Met	2.51	1.31 – 4.79	0.005

Goodness of fit $\chi^2 = 25.26$; df = 7; P = 0.001.

*Total levodopa dose corrected for the use of COMT inhibitors

Capítulo 7: Discussão

Considerando que aspectos específicos sobre cada um dos resultados já foram discutidos nos capítulos anteriores, nesta Discussão será desenvolvida uma apreciação crítica sobre a aplicabilidade da farmacogenética, com ênfase na doença de Parkinson. Além disso, os principais resultados obtidos serão retomados, no sentido de situá-los dentro do campo da farmacogenética e estabelecer pontos para a continuidade dessa linha de pesquisa.

Desde o início da medicina, o empirismo trouxe ao médico a noção de que cada paciente pode apresentar uma reação diferente ao uso de determinado medicamento: alguns podem obter grande benefício com uma medicação, outros podem não apresentar qualquer efeito e há ainda aqueles que desenvolvem reações adversas, que podem ser graves e levar à morte. O conhecimento acumulado ao longo da medicina pré-contemporânea foi determinado pela percepção subjetiva de que alguma droga melhorava a maioria dos pacientes tratados. Já a farmacoterapia atual sustenta-se através dos resultados de grandes ensaios clínicos que demonstram um benefício da medicação, novamente, para a maioria das pessoas, só que agora esse estrato é determinado pelo método científico. Considerando essas duas formas de conhecimento, o empírico e o científico, pode-se observar certa similaridade entre elas, pois ambas identificam a maioria das pessoas, com a diferença de que o segundo é metodologicamente mais sofisticado enquanto que o primeiro é baseado na experiência individual.

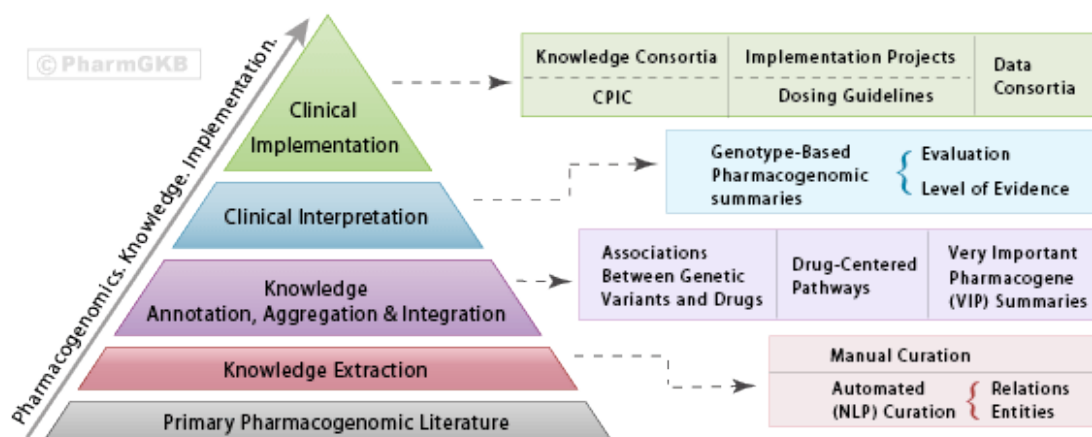
Os efeitos adversos dos fármacos são uma consequência negativa da farmacoterapia, especialmente quando existem poucos critérios para sua individualização. Uma meta-análise demonstrou que 16,9% de pacientes internados apresentaram eventos adversos a fármacos (EAF) (Miguel *et al.*, 2012). Nos EUA, cerca de 106.000 mortes e 2,2 milhões de EAF graves ocorrem a cada ano (Lazarou *et al.*, 1998). Na União Europeia e nos EUA, estima-se que os EAF são responsáveis por 5-7% das admissões hospitalares (Ingelman-Sundberg & Rodriguez-Antona, 2005). No Brasil, um estudo em três hospitais universitários do Rio de Janeiro apontou a incidência de 7,6% de EAF entre os pacientes internados e contribuição desses eventos em cerca de 34% dos óbitos registrados (Mendes *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011). Muitos desses EAF são previsíveis e causados por erros humanos, mas, ainda assim, mais da metade

permanece sem causa conhecida (Classen *et al.*, 1997), o que abre um campo para a investigação da variabilidade genética associada a eles. Ao levarmos em conta esses dados, percebemos a magnitude do problema e quão danoso pode ser utilizar tratamentos para a maioria dos pacientes, desconsiderando as individualidades.

Embora o estudo da Farmacogenética não seja recente, ele se desenvolveu ao longo dos últimos 20 anos, impulsionado por avanços da Biologia Molecular. A Farmacogenética tem por objetivo encontrar base genética para a variabilidade clínica observada na resposta aos fármacos e se propõe a moldar uma farmacologia personalizada, levando em conta as diferenças individuais e quebrando o velho paradigma de usar a medicação que tem o melhor efeito para a maioria das pessoas. A aplicação de testes farmacogenéticos tem o potencial de diminuir custos, aumentando a eficácia dos tratamentos, e diminuir morbimortalidade, aumentando a segurança das intervenções.

O esforço para a translação do conhecimento farmacogenético levou à criação, no início dos anos 2000, de uma base de dados com informações farmacogenéticas. Esse projeto, desenvolvido pela Universidade de Stanford com apoio do "National Institute of Health" (NIH) dos EUA, compila e processa dados da literatura e propõe recomendações sobre novos estudos ou mesmo sobre o uso de testes genéticos na assistência (The Pharmacogenomics Knowledgebase, <https://www.pharmgkb.org> [January 14, 2014]). O processo de avaliação da literatura por esse banco de dados é esquematizado por uma pirâmide (figura 1), em que a base é composta por estudos farmacogenômicos ditos primários, onde se situam os artigos apresentados nesta tese. Nesse portal, estão disponíveis informações para quase 500 fármacos em mais de 25 mil genes distintos.

Figura 1: Figura que exemplifica os passos para a translação da farmacogenética. PharmGKB Knowledge Pyramid



Apesar das expectativas, o uso clínico da farmacogenética ainda é restrito ou inexistente, mesmo que cerca de 10% dos fármacos aprovados pela "Food and Drug Administration" (FDA) dos EUA apresentem em suas bulas orientações farmacogenéticas. As causas para isso são inúmeras e precisam ser identificadas e adequadamente abordadas. Em primeiro lugar, a maioria dos estudos conduzidos apresenta tamanhos amostrais pequenos e pouco poder para detectar diferenças. Alguns se utilizam de dados de ensaios clínicos previamente desenhados para outros objetivos, o que diminui a força da evidência. Também a heterogeneidade na definição e avaliação dos desfechos e na escolha dos marcadores genéticos dificulta a síntese e replicação dos dados. Além disso, deve-se atentar para a diversidade de fatores que influenciam a resposta farmacológica, como idade, sexo, dieta, exposição ambiental, comorbidades, comedicações e aderência do paciente.

Considerando que a resposta farmacológica é um traço quantitativo, espera-se que a influência genética seja poligênica. Nesse sentido, estudos com poucos polimorfismos e em genes específicos podem produzir resultados que não expliquem a complexidade da relação. Ainda assim, detectar isoladamente variantes raras que tenham efeitos grandes ou variantes comuns com efeitos mínimos pode não justificar o emprego de testes farmacogenéticos. Como as medicações possuem múltiplos alvos, avaliar polimorfismos em genes diferentes

é uma abordagem promissora que cada vez mais estará disponível com o avanço tecnológico e a diminuição dos custos dos métodos de análise do DNA.

Nos ensaios clínicos conduzidos pela indústria farmacêutica, é comum que informações farmacogenéticas sejam coletadas. Esses dados, em sua maioria, não são publicados. Esse viés ocorre uma vez em que a farmacogenética se propõe a estratificar a prescrição de medicamentos, o que limita os mercados e diminui o lucro das empresas. Como a indústria não tem interesse nesse processo, é fundamental que o setor público assuma a condução desses estudos. Correlato a esse viés de interesse econômico, há o viés de não publicação de dados negativos, prática comum no atual sistema de divulgação da informação científica.

No caso do Brasil, a condução de estudos clínico-farmacológicos pelas universidades é restrita e observa-se pouca prática na elaboração e condução de ensaios clínicos e estudos longitudinais. Assim, deve haver esforço governamental específico com o objetivo de mudar essa situação, especialmente através de financiamentos que prevejam as particularidades desses estudos e a fixação de pesquisadores. Ademais, a implantação de agências especializadas em ensaios clínicos e coortes poderiam prestar auxílio metodológico especializado aos grupos de pesquisa, proporcionando inclusive mecanismos de auditoria externa e monitoria, garantindo, assim, a qualidade da evidência produzida.

Outra barreira para o avanço da farmacogenômica é a questão ética relacionada ao uso de testes genéticos. A posse dessa informação, de natureza individual e definitiva, deve ser regulada por mecanismos eficientes para evitar a discriminação de indivíduos, especialmente em seguros de saúde. É necessário construir marcos legais em nossa sociedade para regulamentar o uso da informação genética e coibir qualquer forma de discriminação. Nos EUA, em 2008, foi aprovado o Ato de Não-Discriminação de Informação Genética, que proporciona maior segurança jurídica na realização de testes genéticos.

Entretanto, um dos principais limitadores do uso de testes farmacogenéticos é a falta de avaliações de custo-efetividade. Essa informação é fundamental, especialmente se considerarmos um país com recursos limitados

como o Brasil. Na busca desses resultados, deve-se, primeiramente, aperfeiçoar os estudos de eficácia e efetividade, conforme já discutido nos parágrafos anteriores. Ainda, a escolha de variantes genéticas com alta prevalência deve ser priorizada, bem como o estudo de doenças que causem significativa morbimortalidade. Nesse sentido, a doença de Parkinson, por causar limitação funcional e aumento da mortalidade, é uma condição em que testes farmacogenéticos podem se mostrar custo-efetivos. Em relação aos polimorfismos estudados nesta tese, foram privilegiados aqueles com frequência do alelo menos comum maior que 10%.

Nas doenças neurodegenerativas, que apresentam significativa morbimortalidade, grande heterogeneidade clínica e mecanismos fisiopatológicos complexos, a determinação de um perfil genético específico poderá auxiliar no tratamento dessas condições e levar à descoberta de novas drogas e ao delineamento de ensaios clínicos baseados na informação genética (Weinshilboum, 2003). Apesar da atenção crescente que vem sendo dada às doenças neurodegenerativas devido ao envelhecimento da população, poucos esforços foram conduzidos no sentido de personalizar o tratamento da doença de Parkinson. A literatura sobre o tema utiliza como método de pesquisa o estudo de genes candidatos. Abordagens genéticas como varredura genômica ainda não foram aplicadas para a resposta farmacológica desses pacientes.

A variabilidade da resposta farmacológica, especificamente a resposta aos antiparkinsonianos, tema desta tese, pode ser entendida como um fenótipo com herança multifatorial, assim como a própria doença de Parkinson. Nesse sentido, o estudo de fatores não-genéticos que influenciam essa resposta tem papel importante na busca pela personalização da farmacoterapia. O artigo apresentado no capítulo 3 nesta tese estuda fatores não-genéticos. Os resultados obtidos mostram que a simples pergunta ao paciente sobre qual fora o seu primeiro sintoma motor pode prever eventos adversos do uso crônico de levodopa e o fenótipo atual. Pacientes que referiram ter iniciado sua doença com tremor apresentaram menor chance de desenvolver flutuação motora e discinesia. Esses mesmos pacientes também apresentaram maiores escores de tremor na

avaliação atual, sugerindo que essa simples informação histórica pode ser útil na predição de um fenótipo clínico futuro.

Nossos dados replicam os achados de Kipfer *et al.* (2011), porém em uma amostra consideravelmente maior. Zhang *et al.* (2013) conduziram estudo similar, mas, ao invés de usar a informação histórica, classificaram os pacientes em subtipos tremor, rígido-acinético e misto, de acordo com as pontuações na escala UPDRS. Similarmente, pacientes com subtipo tremor apresentaram menor chance de desenvolver discinesia. Além da esfera de resposta farmacológica, esses dados ajudam na compreensão de subtipos fenotípicos da doença de Parkinson. Previamente, uma forma de "benign tremulous parkinsonism" (parkinsonismo tremulante benigno) fora proposta, em que pacientes com predomínio de tremor sobre os outros sintomas teriam uma evolução da doença com menor incapacidade funcional (Josephs *et al.*, 2006). Os dados dessa Tese, em associação com os apresentados por Kipfer *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2013), adicionam a essa forma de parkinsonismo tremulante benigno o fato de que apresenta menor chance de apresentar complicações motoras do uso crônico de levodopa.

Estudos anatomopatológicos com essa forma de parkinsonismo tremulante ainda não foram conduzidos, mas estudos de neuroimagem do sistema dopaminérgico demonstraram as mesmas alterações encontradas na doença de Parkinson (Brooks *et al.*, 1992; Marshall & Grosset, 2003). Embora o tremor esteja associado ao déficit dopaminérgico, sua gravidade não está associada ao grau de degeneração da substância negra, o que pode explicar a relativa refratariedade desse sintoma aos tratamentos dopaminérgicos. Possivelmente, modificações em outros sistemas estejam envolvidas na gênese do tremor. Esses fatos podem explicar o menor risco de complicações motoras para a forma tremulante, tendo em vista que essas complicações são inerentes ao déficit dopaminérgico e a sua reposição farmacológica. A forma com predomínio rígido-acinético apresentaria maior dano ao sistema dopaminérgico e, por sua vez, maior chance de apresentar as complicações motoras.

O artigo apresentado no capítulo 4 desta Tese apresenta estudo de polimorfismos do gene *DAT*, que codifica o transportador de dopamina. Essa

molécula tem papel fundamental no término da ação da dopamina, uma vez que seja liberada na fenda sináptica. Nossos resultados mostraram que pacientes homocigotos para o alelo C do polimorfismo -839C/T da região promotora 5' do gene apresentaram maior prevalência de alucinação visual. Trata-se da primeira associação farmacogenética descrita na literatura sobre polimorfismos da região 5' do *DAT* na DP, o que aponta essa área como alvo interessante para estudos futuros.

Alucinação visual é um desfecho bastante estudado em artigos de farmacogenética da doença de Parkinson, embora alguns autores considerem difícil separar o efeito das medicações do efeito da própria degeneração em si como causa desse sintoma. Tanto na DP quanto em outras condições médicas, alucinação visual é tradicionalmente associada a estados de hiperativação dopaminérgica. Dessa forma, é possível que os pacientes portadores do alelo C apresentem maior expressão do transportador. As evidências sobre a funcionalidade deste polimorfismo, entretanto, são controversas. Rubie *et al.* (2001) sugeriram que o alelo C seria responsável por desfazer um sítio de ligação a um fator repressor da expressão gênica. Drgon *et al.* (2006), utilizando PET e amostras *post-mortem*, associaram maior expressão para o alelo C. No entanto, van de Giessen *et al.* (2009), em estudo de SPECT, associaram menor expressão de *DAT* para o alelo C. Resultados na mesma direção foram obtidos por Kelada *et al.* (2005) em um estudo de expressão *in vitro*. Claramente, mais estudos são necessários para elucidar o efeito biológico desse polimorfismo.

Ainda nesse artigo, o uso de dose equivalente de levodopa foi menor entre os pacientes portadores do alelo de 9 repetições do VNTR de 40pb da região 3' não-traduzida do *DAT*, com a informação genética sendo responsável por 21% dessa variabilidade. O uso de dose equivalente fora proposto por Paus *et al.* (2008) como um marcador do que seria "demanda dopaminérgica". Esse procedimento unifica todas as drogas dopaminérgicas sob um único número e representa o estímulo dopaminérgico ótimo que o paciente recebe através do julgamento de seu médico. É um conceito útil para estudos de farmacogenética. Em relação à funcionalidade desse polimorfismo específico, as evidências são novamente inconsistentes. Estudos mostram maior expressão gênica para o alelo

de 9 repetições (van de Giessen *et al.*, 2009), mas esses pacientes apresentam queda da expressão do DAT com o envelhecimento (Shumay *et al.*, 2011). Uma explicação factível para nosso resultado seria que, como nossa população é predominantemente de idosos, os portadores do alelo de 9 repetições apresentariam menor expressão do DAT, com menor recaptação de dopamina, necessitando de menor aporte de estímulo farmacológico.

O artigo apresentado no capítulo 6 descreve associação entre alucinação visual e o alelo Met do polimorfismo Val158Met da *COMT*. Essa variante é um dos polimorfismos com funcionalidade mais conhecida, com o alelo Met determinando diminuição de até quatro vezes na atividade enzimática da *COMT*. Dessa forma, a explicação biológica para nosso achado é direta, se considerarmos que alucinação visual está associada a um estado de hiperatividade dopaminérgica, especialmente em estruturas mesolímbicas, local de maior ação da *COMT*.

O capítulo 5 apresenta artigo que foge da abordagem de genes candidatos associados à farmacocinética e farmacodinâmica das medicações e abre caminho para explorar aspectos relacionados à plasticidade sináptica, neuronal e sinalização glutamatérgica na gênese dos efeitos adversos crônicos da levodopa, especialmente em relação à discinesia (Linazasoro, 2005). Estudamos o gene *HOMER1*, que codifica uma molécula da densidade pós-sináptica fundamental na ancoragem de segundos-mensageiros aos receptores glutamatérgicos e no processo de plasticidade neuronal. O alelo G do polimorfismo rs4704559 do *HOMER1* associou-se a menor prevalência de discinesia e de alucinação visual. Na literatura não há estudos sobre a funcionalidade desse polimorfismo e seu efeito só poderá ser melhor compreendido quando os mecanismos de plasticidade envolvidos na discinesia também estiverem elucidados. Como reforço dos nossos achados, um grupo italiano associou esse mesmo polimorfismo, porém seu outro alelo, o A, com maior prevalência de alucinação visual (De Luca *et al.*, 2009).

A literatura produzida até o momento sobre farmacogenética na doença de Parkinson pode ser considerada pequena quando comparada às desordens psiquiátricas, como Transtornos de Humor e Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade, por exemplo (Kieling *et al.*, 2010; Narasimhan & Lohoff, 2012). Além disso, observa-se grande heterogeneidade nos estudos, tanto considerando

fenótipos quanto genótipos. Na primeira situação, a definição dos fenótipos e os instrumentos para avaliá-los variam entre os estudos, em grande parte pela falta de definições precisas na literatura. Essa limitação prejudica, principalmente, o momento de generalizar e sintetizar os resultados e compará-los entre dois grupos. Em alguns estudos, por exemplo, psicose confunde-se com alucinação e não se sabe ao certo que tipo de alucinação, se visual ou de outra modalidade sensorial, está sendo avaliada. Na segunda situação de heterogeneidade dos estudos, a genotípica, avaliações de marcadores genéticos diferentes no mesmo gene e frequências alélicas variadas devido à ancestralidade também dificultam a replicação dos resultados.

Outro ponto de crítica é em relação ao desenho epidemiológico. Como a doença de Parkinson é uma condição progressiva, o melhor desenho epidemiológico seria longitudinal, a fim de determinar com precisão o início de cada evento adverso e sua relação com outras variáveis clínicas. Uma vez que a condução desses estudos exige grande esforço e custo, a maioria dos trabalhos tem desenho transversal, assim como os nossos. Se um desenho transversal for bem elaborado, entretanto, especialmente com controle de variáveis confundidoras, seus resultados podem ser úteis. Vale ressaltar que grande parte dos estudos transversais negligenciam esse quesito ou o fazem de maneira não sistemática.

Nosso estudo fez controle de possíveis variáveis confundidoras e duas categorias distintas foram definidas *a priori*: confundidores conceituais e confundidores estatísticos. Os confundidores conceituais foram escolhidos a partir de revisão da literatura sobre as principais variáveis previamente associadas aos desfechos, assegurando assim o controle adequado. Os confundidores estatísticos foram definidos pela associação concomitante de alguma variável com o marcador genético e com o desfecho com $P < 0.1$. Com esse procedimento, estamos assegurando o controle de variáveis não conhecidas que possam estar confundindo nosso resultado na amostra em questão, por associação prévia não relatada ou mesmo por viés de seleção.

A validade externa dos resultados é fundamental para a generalização dos mesmos. A maioria dos estudos em DP seleciona pacientes em clínicas

especializadas em Distúrbios do Movimento, podendo privilegiar amostras com doença mais grave, o que comprometeria a validade externa. Ademais, ao utilizar amostras de ancestralidade homogênea, tenta-se minimizar possíveis efeitos de estrutura populacional sobre as frequências dos alelos estudados. Isso pode limitar, contudo, a generalização dos resultados, especialmente em um país multiétnico como o Brasil. Na tentativa de minimizar o efeito de estrutura populacional, utilizamos a variável ancestralidade europeia como confundidora em todas as nossas análises. Apesar de estudos prévios não demonstrarem estratificação populacional no Rio Grande do Sul (Santos *et al.*, 2010), o uso de marcadores de ancestralidade em cada amostra seria a melhor maneira de controlar esse efeito sem perder validade externa, entretanto, adicionaria maior custo ao trabalho.

Considerando as limitações metodológicas acima mencionadas, atualmente não é possível reunir a literatura em uma síntese maior, como em uma meta-análise, e propor qualquer diretriz para a aplicação assistencial dessas informações. Os resultados desta Tese são de caráter exploratório, sem aplicabilidade direta e imediata, e compõem o que se chama literatura farmacogenética primária (figura 1). A replicação de nossos resultados em outras amostras, preferencialmente de tamanho maior, é importante para a confirmação dos resultados. Estudos funcionais para as variantes genéticas avaliadas também são necessários para elucidar os mecanismos biológicos responsáveis pelos efeitos clínicos observados. Em um momento posterior, a condução de estudos longitudinais e ensaios clínicos orientados pela genética, bem como de análises de custo-efetividade, são fundamentais para completar a translação desse conhecimento e produzir evidência de qualidade.

Como perspectivas, espera-se aumentar significativamente nossa amostra e iniciar o seguimento longitudinal desses pacientes no sentido de formar uma coorte de farmacogenética em doença de Parkinson. Ainda, colaborações com outros grupos para replicar os achados em outras populações é um objetivo a ser atingido, o que daria maior valor aos nossos resultados. Outra frente fundamental de trabalho seria a exploração de novos métodos para avaliação dos fenótipos, como a utilização do desafio oral de levodopa, estudo de parâmetros

farmacocinéticos e novas escalas para definição dos desfechos. Em relação aos genes, pretendemos prosseguir o estudo de genes candidatos associados à neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade neuronal, bem como considerar o uso de novas técnicas para análise do DNA.

A terapia dopaminérgica modificou a história natural da doença de Parkinson e proporcionou diminuição da mortalidade, melhora funcional e da qualidade de vida dos pacientes. Nenhuma outra doença neurodegenerativa apresenta tratamento sintomático com tamanho de efeito comparável ao da levodopa. Entretanto, o uso crônico dessa medicação leva a complicações motoras que limitam a qualidade de vida dos pacientes e requerem atendimento especializado e uso de fármacos de alto custo. Nosso trabalho adicionou elementos importantes no entendimento da variabilidade da resposta farmacológica da doença de Parkinson, abordando tanto aspectos genéticos quanto não-genéticos. Esses dados serão importantes para a continuidade da busca de uma terapia individualizada desses pacientes, com a definição de equações e algoritmos que possam orientar a conduta terapêutica.

Bibliografia

- Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R, (2004) Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 351: 1972–1977.
- Ahlskog JE and Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16: 448–458.
- Arbouw MEL, Movig KLL, Egberts TCG, Poels PJE, van Vugt JPP, Wessels JAM, van der Straaten RJHM, Neef C and Guchelaar HJ (2009) Clinical and pharmacogenetic determinants for the discontinuation of non-ergoline dopamine agonists in Parkinson's disease. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 1245–1251.
- Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J and Sacchetti P (2001) The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 449–455.
- Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF and Cardoso F (2006) Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). *Mov Disord* 21: 800–808.
- Becker ML, Visser LE, van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG and Stricker BHC (2011) OCT1 polymorphism is associated with response and survival time in anti-Parkinsonian drug users. *Neurogenetics* 12: 79–82.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE and Gerfen CR (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 18: 5301–5310.
- Bezard E, Gross CE and Brotchie JM (2003) Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci* 26: 215–221.
- Białecka M, Drożdżik M, Honczarenko K, Gawrońska-Szklarz B, Stankiewicz J, Dabrowska E, Kubisiak M, Kłodowska-Duda G and Opala G (2005) Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in a Polish population. *Eur Neurol* 53: 68 – 73.
- Białecka M, Drożdżik M, Kłodowska-Duda G, Honczarenko K, Gawrońska-Szklarz B, Opala G and Stankiewicz J (2004) The effect of monoamine oxidase B (MAOB) and catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms on levodopa therapy in patients with sporadic Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 110: 260 – 266.
- Bialecka M, Kurzawski M, Kłodowska-Duda G, Opala G, Tan EK and Drożdżik M (2008) The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenomics* 18: 815 -821.
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF *et al.* (2005) Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 65: 87–95.

- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH and Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197–211.
- Brooks DJ, Playford ED, Ibanez V, Sawle GV, Thompson PD, Findley LJ and Marsden CD (1992) Isolated tremor and disruption of the nigrostriatal dopaminergic system: an 18F-dopa PET study. *Neurology* 42: 1554–1560.
- Camicioli R, Rajput A, Rajput M, Reece C, Payami H, Hao C and Rajput A (2005) Apolipoprotein E epsilon4 and catechol-O-methyltransferase alleles in autopsy-proven Parkinson's disease: relationship to dementia and hallucinations. *Mov Disord* 20: 989–994.
- Carvalho JAM and Rodríguez-Wong LL (2008) A transição da estrutura etária da população brasileira na primeira metade do século XXI. *Cad Saúde Pública* 24: 597 – 605.
- Celesia GG and Barr AN (1970) Psychosis and other psychiatric manifestations of levodopa therapy. *Arch Neurol* 23: 193–200.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song MS *et al.* (2011) Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89: 398–406.
- Chong DJ, Suchowersky O, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Brant R and Campbell NR (2000). The relationship between COMT genotype and the clinical effectiveness of tolcapone, a COMT inhibitor, in patients with Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 23: 143–148.
- Classen DC, Pestotnik SL, Evans RS, Lloyd JF and Burke JP (1997) Adverse drug events in hospitalized patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *Jama* 277: 301–306.
- Contin M, Martinelli P, Mochi M, Albani F, Riva R, Scaglione C, Dondi M, Fanti S, Pettinato C and Baruzzi A (2004) Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 27: 111–115.
- Contin M, Martinelli P, Mochi M, Riva R, Albani F and Baruzzi A (2005) Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 20: 734 – 739.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921–923.
- Corvol JC, Bonnet C, Charbonnier-Beaupel F, Bonnet AM, Fiévet MH, Bellanger A, Roze E, Meliksetyan G, Ben Djebara M, Hartmann A *et al.* (2011) The COMT Val158Met polymorphism affects the response to entacapone in Parkinson's disease: A randomized crossover clinical trial. *Ann Neurol* 69: 111–118.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS and Gellene R (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med* 281: 272.
- Dächsel JC and Farrer MJ (2010) LRRK2 and Parkinson disease. *Arch Neurol* 67: 542–547.

- Dahl JP, Kampman KM, Oslin DW, Weller AE, Lohoff FW, Ferraro TN, O'Brien CP and Berrettini WH (2005) Association of a polymorphism in the Homer1 gene with cocaine dependence in an African American population. *Psychiatr Genet* 15: 277–283.
- De Jong GJ, Meerwaldt JD and Schmitz PI (1987) Factors that influence the occurrence of response variations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 22: 4–7.
- De la Fuente-Fernández R, Núñez MA and López E (1999) The apolipoprotein E epsilon 4 allele increases the risk of drug-induced hallucinations in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 22: 226–230.
- De Lau LML and Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 525–535.
- De Lau LML, Verbaan D, Marinus J, Heutink P and van Hilten JJ (2012) Catechol-O-methyltransferase Val158Met and the risk of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 132–135.
- De Luca V, Annesi G, De Marco EV, de Bartolomeis A, Nicoletti G, Pugliese P, Muscettola G, Barone P and Quattrone A (2009) HOMER1 promoter analysis in Parkinson's disease: association study with psychotic symptoms. *Neuropsychobiology* 59: 239–245.
- Denny AP and Behari M (1999) Motor fluctuations in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 165: 18–23.
- Devos D, Lejeune S, Cormier-Dequaire F, Tahiri K, Charbonnier-Beaupel F, Rouaix N, Duhamel A, Sablonnière B, Bonnet AM and Bonnet C *et al.* (2014) Dopa-decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to l-dopa in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20: 170–175.
- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Schäfer N, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Riess O, Romac S and Klein C *et al.* (2004) Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 23: 525.
- Drgon T, Lin Z, Wang GJ, Fowler J, Pablo J, Mash DC, Volkow N and Uhl GR (2006) Common human 5' dopamine transporter (SLC6A3) haplotypes yield varying expression levels in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 26: 875–889.
- Fahn S (2008) The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3: S497–508.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C and Marek K (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351: 2498–2508.
- Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7: 306–318.
- Feldman B, Chapman J and Korczyn AD (2006) Apolipoprotein epsilon4 advances appearance of psychosis in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 113: 14–17.
- Foltynie T, Cheeran B, Williams-Gray CH, Edwards MJ, Schneider SA, Weinberger D, Rothwell JC, Barker RA and Bhatia KP (2009) BDNF val66met influences time to onset of levodopa induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 141–144.
- Fox SH and Lang AE (2008) Levodopa-related motor complications--phenomenology. *Mov Disord* 23 Suppl 3: S509–514.

- Frauscher B, Högl B, Maret S, Wolf E, Brandauer E, Wenning GK, Kronenberg MF, Kronenberg F, Tafti M and Poewe W (2004) Association of daytime sleepiness with COMT polymorphism in patients with parkinson disease: a pilot study. *Sleep* 27: 733 – 736.
- Fujii C, Harada S, Ohkoshi N, Hayashi A, Yoshizawa K, Ishizuka C and Nakamura T (1999) Association between polymorphism of the cholecystokinin gene and idiopathic Parkinson's disease. *Clin Genet* 56: 394–399.
- Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H Sasagawa N and Ishiura S (2001) The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J* 1: 152–156.
- Gan-Or Z, Ozelius LJ, Bar-Shira A, Saunders-Pullman R, Mirelman A, Kornreich R, Gana-Weisz M, Raymond D, Rozenkrantz L, Deik A *et al.* (2013) The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson disease. *Neurology* 80: 1606–1610.
- Gasser T, Hardy J and Mizuno Y (2011) Milestones in PD genetics. *Mov Disord* 26: 1042–1048.
- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP *et al.* (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365: 415–416.
- Goetz CG, Burke PF, Leurgans S, Berry-Kravis E, Blasucci LM, Raman R and Zhou L (2001) Genetic variation analysis in parkinson disease patients with and without hallucinations: case-control study. *Arch Neurol* 58: 209–213.
- Golbe LI (1991) Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology* 41: 168–173.
- Goldman JG, Goetz CG, Berry-Kravis E, Leurgans S and Zhou L (2004) Genetic polymorphisms in Parkinson disease subjects with and without hallucinations: an analysis of the cholecystokinin system. *Arch Neurol* 61: 1280–1284.
- Goudreau JL, Maraganore DM, Farrer MJ, Lesnick TG, Singleton AB, Bower JH, Hardy JA and Rocca WA (2002) Case-control study of dopamine transporter-1, monoamine oxidase-B, and catechol-O-methyl transferase polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17: 1305 – 1311.
- Graham JM, Grünewald RA and Sagar HJ (1997) Hallucinosis in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 434–440.
- Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Kelsoe JR (2001) Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet* 105: 145–151.
- Greenwood TA and Kelsoe JR (2003) Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 82: 511–520.
- Harbo HF, Finsterer J, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, De Jonghe P, Lossos A, Lynch T, Mariotti C *et al.* (2009) EFNS guidelines on the molecular diagnosis of neurogenetic disorders: general issues, Huntington's disease, Parkinson's disease and dystonias. *Eur J Neurol* 16: 777–785.
- Hawkes CH, Shephard BC and Daniel SE (1997) Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62: 436–446.

- Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnoila M and Weinberger DR (2000) Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacol* 22: 133–139.
- Henning J, Koczan D, Glass A, Karopka T, Pahnke J, Rolfs A, Benecke R and Gimsa U (2007) Deep brain stimulation in a rat model modulates TH, CaMKIIa and Homer1 gene expression. *Eur J Neurosci* 25: 239–250.
- Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ (2002a) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52: 276–284.
- Hernán MA, Checkoway H, O'Brien R, Costa-Mallen P, De Vivo I, Colditz GA, Hunter DJ, Kelsey KT, Ascherio A (2002b) MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD. *Neurology* 58: 1381–1387.
- Hoehn MM (1992) The natural history of Parkinson's disease in the pre-levodopa and post-levodopa eras. *Neurol Clin* 10: 331–339.
- Huang X, Chen P, Kaufer DI, Tröster AI and Poole C (2006) Apolipoprotein E and dementia in Parkinson disease: a meta-analysis. *Arch Neurol* 63: 189–193.
- Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE and Lees AJ (1992) What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 42: 1142–1146.
- Ibáñez P, Lesage S, Janin S, Lohmann E, Durif F, Destée A, Bonnet AM, Brefel-Courbon C, Heath S, Zelenika D *et al.* (2009) Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol* 66: 102–108.
- Ingelman-Sundberg M and Rodriguez-Antona C (2005) Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1563–1570.
- International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) (2011) A Two-Stage Meta-Analysis Identifies Several New Loci for Parkinson's Disease. *PLoS Genet* 7(6): e1002142.
- Inzelberg R, Paleacu D, Chapman J and Korczyn AD (2000) The apolipoprotein E epsilon4 allele increases the risk of drug-induced hallucinations in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 23: 230–231.
- Josephs KA, Matsumoto JY and Ahlskog JE (2006) Benign tremulous parkinsonism. *Arch Neurol* 63: 354–357.
- Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, Gasser T, Kupsch A, Roots I and Brockmüller J (2003) L-dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology* 60: 1750–1755.
- Kang AM, Palmatier MA and Kidd KK (1999) Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry* 46: 151–160.
- Kay, D.M., Bird, T.D., Zabetian, C.P., Factor, S.A., Samii, A., Higgins, D.S., Nutt, J., Roberts, J.W., Griffith, A., Leis, B.C *et al.* (2006) Validity and utility of a LRRK2 G2019S mutation test for the diagnosis of Parkinson's disease. *Genet Test* 10: 221–227.

- Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth WT, Jr Afsharinejad Z and Costa LG (2005) Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 15: 659–668.
- Kelleher III RJ, Geigenmüller U, Hovhannisyan H, Trautman E, Pinard R, Rathmell B, Carpenter R and Margulies D (2012) High-Throughput Sequencing of mGluR Signaling Pathway Genes Reveals Enrichment of Rare Variants in Autism. *Plos One* 7, e35003.
- Kempster PA, Hurwitz B and Lees AJ (2007) A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 69: 482–485.
- Kiebertz K, Wunderle KB, (2013) Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 28: 8–13.
- Kieling C, Genro JP, Hutz MH and Rohde LA (2010) A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11: 407–419.
- Kim JW, Kim DH, Kim SH and Cha JK (2000) Association of the dopamine transporter gene with Parkinson's disease in Korean patients. *J Korean Med Sci* 15: 449–451.
- Kipfer S, Stephan MA, Schüpbach WMM, Ballinari P and Kaelin-Lang A (2011) Resting tremor in Parkinson disease: a negative predictor of levodopa-induced dyskinesia. *Arch Neurol* 68: 1037–1039.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y and Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605–608.
- Klebe S, Golmard JL, Nalls MA, Saad M, Singleton AB, Bras JM, Hard J, Simon-Sanchez J, Heutink P, Kuhlenbäumer G *et al.* (2013) The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 666 – 673.
- Klein C and Djarmati A (2011) Parkinson disease: genetic testing in Parkinson disease-who should be assessed? *Nat Rev Neurol* 7: 7–9.
- Kluenemann HH, Nutt JG, Davis MY and Bird TD (2013) Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1. *J Neurol Sci* 335: 219 -220.
- Koepsell H, Lips K and Volk C (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24: 1227–1251.
- Kouzmenko AP, Pereira AM and Singh BS (1997) Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 807–811.
- Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Otsuka E, Hattori M, Hoda F, Vallada HP, Arranz MJ and Collier DA (1997) High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 221: 202 – 204.
- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Dominguez-Meijide A, Valenzuela R, Villar-Cheda B and Rodríguez-Perez AI (2013) Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 1337–1342.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL and Weinshilboum RM (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics:

- description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6: 243–250.
- Lazarou J, Pomeranz BH and Corey PN (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama* 279: 1200–1205.
- Le Couteur DG, Leighton PW, McCann SJ and Pond SM (1997) Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease. *Mov Disord* 12: 760–763.
- Lee JY, Cho J, Lee EK, Park SS and Jeon BS (2011) Differential genetic susceptibility in diphasic and peak-dose dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 73–79.
- Lee MS, Lyoo CH, Ulmanen I, Syvänen AC and Rinne JO (2001) Genotypes of catechol-O-methyltransferase and response to levodopa treatment in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 298: 131 – 134.
- Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA and Duyckaerts C (2008) The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord* 23: 777–783.
- Leighton PW, Le Couteur DG, Pang CC, McCann SJ, Chan D, Law LK, Kay R, Pond SM and Woo J (1997) The dopamine transporter gene and Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurology* 49: 1577–1579.
- Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, Chang CY, Yeh YH, Lin SZ (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. *J Neurol Sci* 209: 87–92.
- Lin JJ, Yueh KC, Lin SZ, Harn HJ and Liu JT (2007) Genetic polymorphism of the angiotensin converting enzyme and L-dopa-induced adverse effects in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 252: 130–134.
- Linazasoro G (2005) New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 26: 391–397.
- Liu YZ, Tang BS, Yan XX, Liu J, Ouyang DS, Nie LN, Fan L, Li Z, Ji W, Hu DL, Wang D and Zhou HH (2009) Association of the DRD2 and DRD3 polymorphisms with response to pramipexole in Parkinson's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 679–683.
- Luo P, Li X, Fei Z and Poon W (2012) Scaffold protein Homer 1: implications for neurological diseases. *Neurochem Int* 61: 731–738.
- Lynch DR, Mozley PD, Sokol S, Maas NMC, Balcer LJ and Siderowf AD (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. *Mov Disord* 18: 804–812.
- Makoff AJ, Graham JM, Arranz MJ, Forsyth J, Li T, Aitchison KJ, Shaikh S, Grünewald RA (2000) Association study of dopamine receptor gene polymorphisms with drug-induced hallucinations in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 10: 43–48.
- Männistö PT, Ulmanen I, Lundström K, Taskinen J, Tenhunen J, Tilgmann C and Kaakkola S (1992) Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Prog Drug Res* 39: 291–350.
- Marshall V and Grosset DG (2003) Role of dopamine transporter imaging in the diagnosis of atypical tremor disorders. *Mov Disord* 18 Suppl 7: S22–27.

- Martinez D, Gelernter J, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Kegeles L, Innis RB and Laruelle M (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. *Neuropsychopharmacol* 24: 553–560.
- Martins M, Travassos C, Mendes W, Pavão ALB (2011) Hospital deaths and adverse events in Brazil. *BMC Health Serv Res* 11: 223.
- Mendes W, Martins M, Rozenfeld S, Travassos C (2009) The assessment of adverse events in hospitals in Brazil. *Int J Qual Heal Care* 21: 279–284.
- Mercier G, Turpin JC and Lucotte G (1999) Variable number tandem repeat dopamine transporter gene polymorphism and Parkinson's disease: no association found. *J Neurol* 246: 45–47.
- Michelhaugh SK, Fiskerstrand C, Lovejoy E, Bannon MJ and Quinn JP (2001) The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. *J Neurochem* 79: 1033–1038.
- Miguel A, Azevedo LF, Araújo M, Pereira AC (2012) Frequency of adverse drug reactions in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 21: 1139–1154.
- Molchadski I, Korczyn AD, Cohen OS, Katzav A, Nitzan Z, Chapman J, Hassin-Baer S (2011) The role of apolipoprotein E polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia. *Acta Neurol Scand* 123: 117–121.
- Morgante L, Colosimo C, Antonini A, Marconi R, Meco G, Pederzoli M, Pontieri FE, Cicarelli G, Abbruzzese G, Zappulla S (2012) Psychosis associated to Parkinson's disease in the early stages: relevance of cognitive decline and depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 76–82.
- Narasimhan S and Lohoff FW (2012) Pharmacogenetics of antidepressant drugs: current clinical practice and future directions. *Pharmacogenomics* 13: 441–464.
- Nicholl DJ, Bennett P, Hiller L, Bonifati V, Vanacore N, Fabbrini G, Marconi R, Colosimo C, Lamberti P, Stocchi F, Bonuccelli U, Vieregge P, Ramsden DB, Meco G and Williams AC (1999) A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. European Study Group on Atypical Parkinsonism. *Neurology* 53: 1415–1421.
- Nutt JG (2001) Motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 8: 101–108.
- Nutt JG (2007) Continuous dopaminergic stimulation: Is it the answer to the motor complications of Levodopa? *Mov Disord* 22: 1–9.
- Nutt JG, Carter JH, Lea ES and Sexton GJ (2002) Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy. *Ann Neurol* 51: 686–693.
- Olanow CW, Stern MB and Sethi K (2009a) The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 72: S1–136.
- Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, Langston W, Melamed E, Poewe W, Stocchi, F *et al.* (2009b) A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361: 1268–1278.

- Oliveri RL, Annesi G, Zappia M, Civitelli D, Montesanti R, Branca D, Nicoletti G, Spadafora P, Pasqua AA, Cittadella R *et al.* (1999) Dopamine D2 receptor gene polymorphism and the risk of levodopa-induced dyskinesias in PD. *Neurology* 53: 1425–1430.
- Papapetropoulos S, Argyriou AA and Ellul J (2005) Factors associated with drug-induced visual hallucinations in Parkinson's disease. *J Neurol* 252: 1223–1228.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14: 223–236.
- Pascale E, Purcaro C, Passarelli E, Guglielmi R, Vestri AR, Passarelli F and Meco G (2009) Genetic polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme is not associated with the development of Parkinson's disease and of L-dopa-induced adverse effects. *J Neurol Sci* 276: 18–21.
- Paus S, Gadow F, Knapp M, Klein C, Klockgether T and Wüllner U (2009) Motor complications in patients from the German Competence Network on Parkinson's disease and the DRD3 Ser9Gly polymorphism. *Mov Disord* 24: 1080–1084.
- Paus S, Grünewald A, Klein C, Knapp M, Zimprich A, Janetzky B, Möller JC, Klockgether T and Wüllner U (2008) The DRD2 Taq1A polymorphism and demand of dopaminergic medication in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23: 599–602.
- Paus S, Seeger G, Brecht HM, Köster J, El-Faddagh M, Nöthen MM, Klockgether T and Wüllner U (2004) Association study of dopamine D2, D3, D4 receptor and serotonin transporter gene polymorphisms with sleep attacks in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19: 705–707.
- Pezzoli G and Cereda E (2013) Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* 80: 2035–2041.
- The Pharmacogenomics Knowledgebase, <https://www.pharmgkb.org> (January 14, 2014).
- Planté-Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, Said G, Wood NW, Marsden CD and Harding AE (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: 1589–1593.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R *et al.* (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045–2047.
- Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W and Ziemssen T (2012) Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 617–626.
- Reilly DK, Rivera-Calimlim L and Van Dyke D (1980) Catechol-O-methyltransferase activity: a determinant of levodopa response. *Clin Pharmacol Ther* 28: 278–286.
- Rieck M, Schumacher-Schuh AF, Altmann V, Francisconi CL, Fagundes PT, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Rieder CR and Hutz MH (2012) DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics* 13: 1701–1710.

- Rietschel M, Mattheisen M, Frank J, Treutlein J, Degenhardt F, Breuer R, Steffens M, Mier D, Esslinger C and Walter H (2010) Genome-Wide Association-, Replication-, and Neuroimaging Study Implicates HOMER1 in the Etiology of Major Depression. *Biol Psychiatry* 68: 578–585.
- Rissling I, Frauscher B, Kronenberg F, Tafti M, Stiasny-Kolster K, Robyr AC, Körner Y, Oertel WH, Poewe W, Högl B and Möller JC (2006) Daytime sleepiness and the COMT val158met polymorphism in patients with Parkinson disease. *Sleep* 29: 108 – 111.
- Rissling I, Geller F, Bandmann O, Stiasny-Kolster K, Körner Y, Meindorfner C, Krüger HP, Oertel WH and Möller JC (2004) Dopamine receptor gene polymorphisms in Parkinson's disease patients reporting "sleep attacks". *Mov Disord* 19: 1279–1284.
- Rissling I, Körner Y, Geller F, Stiasny-Kolster K, Oertel WH and Möller JC (2005) Preprohypocretin polymorphisms in Parkinson disease patients reporting "sleep attacks". *Sleep* 28: 871–875.
- Ritz BR, Manthripragada AD, Costello S, Lincoln SJ, Farrer MJ, Cockburn M and Bronstein J (2009) Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 117: 964–969.
- Rivera-Calimlim L, Tandon D, Anderson F and Joynt R (1977) The clinical picture and plasma levodopa metabolite profile of parkinsonian nonresponders. Treatment with levodopa and decarboxylase inhibitor. *Arch Neurol* 34: 228–232.
- Rodnitzky RL and Narayanan NS (2014) Amantadine's role in the treatment of levodopa-induced dyskinesia. *Neurology* 82: 288 – 289.
- Roriz-Cruz M, Rosset-Cruz R, Prado A, Schuh AFS, Bianchin M, Chaves M and Rieder C (2010) Parkinsonian syndromes among the community-dwelling elderly: High prevalence of vascular parkinsonism in southern Brazil. In: *Movement Disorders: Abstracts of the XIV International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2010*, 25. Buenos Aires, p. S261.
- Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR (2008) Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 63: 167–173.
- Rotzinger S, Bush DEA and Vaccarino FJ (2002) Cholecystokinin modulation of mesolimbic dopamine function: regulation of motivated behaviour. *Pharmacol Toxicol* 91: 404–413.
- Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P and Stöber G (2001) The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett* 297: 125–128.
- Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG and Bannon MJ (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res* 74: 167–174.
- Sanchez-Ramos JR, Ortoll R and Paulson GW (1996) Visual hallucinations associated with Parkinson disease. *Arch Neurol* 53: 1265–1268.
- Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH *et al.* (2010) Assessing individual interethnic admixture and population

- substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 31: 184–190.
- Schapira AHV and Obeso J (2006) Timing of treatment initiation in Parkinson's disease: a need for reappraisal? *Ann Neurol* 59: 559–562.
- Schenck CH, Boeve BF and Mahowald MW (2013) Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a 16-year update on a previously reported series. *Sleep Med* 14: 744–748.
- Schrag A and Quinn N (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain J Neurol* 123: 2297–2305.
- Sgambato-Faure V, Buggia V, Gilbert F, Lévesque D, Benabid AL, Berger F (2005) Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 936–947.
- Shin S, Lee JE, Hong JY, Sunwoo MK, Sohn YH and Lee PH (2012) Neuroanatomical substrates of visual hallucinations in patients with non-demented Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 1155–1161.
- Shumay E, Chen J, Fowler JS and Volkow ND (2011) Genotype and ancestry modulate brain's DAT availability in healthy humans. *Plos One* 6, e22754.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G *et al.* (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361: 1651–1661.
- Singleton AB, Farrer MJ and Bonifati V (2013) The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 28: 14–23.
- Stocchi F, Rascol O, Kieburtz K, Poewe W, Jankovic J, Tolosa E, Barone P, Lang AE, Olanow CW (2010) Initiating levodopa/carbidopa therapy with and without entacapone in early Parkinson disease: the STRIDE-PD study. *Ann Neurol* 68: 18–27.
- Strauss J, McGregor S, Freeman N, Tiwari A, George CJ, Kovacs M, Kennedy JL (2012) Association study of early-immediate genes in childhood-onset mood disorders and suicide attempt. *Psychiatry Res* 197: 49–54.
- Strong JA, Dalvi A, Revilla FJ, Sahay A, Samaha FJ, Welge JA, Gong J, Gartner M, Yue X, Yu L (2006) Genotype and smoking history affect risk of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 21: 654–659.
- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30: 244–250.
- Syvänen AC, Tilgmann C, Rinne J and Ulfmanen I (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: 65 – 71.
- Tan EK, Khajavi M, Thornby JI, Nagamitsu S, Jankovic J and Ashizawa T (2000) Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 55: 533 – 538.
- Thomas U (2002) Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem* 81: 407–413.

- Uhl, G.R., 1998. Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 43, 555–560.
- Uhl GR (2003) Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. *Mov Disord* 18 Suppl 7: S71–80.
- Van de Giessen EM, de Win MML, Tanck MWT, van den Brink W, Baas F, Booij J (2009) Striatal dopamine transporter availability associated with polymorphisms in the dopamine transporter gene SLC6A3. *J Nucl Med* 50: 45–52.
- Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW and Uhl GR (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14: 1104–1106.
- VanNess SH, Owens MJ, Kilts CD (2005) The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *Bmc Genet* 6: 55.
- Wang J, Liu ZL, Chen B (2001a). Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology* 56: 1757–1759.
- Wang J, Liu ZL, Chen B (2001b) Dopamine D5 receptor gene polymorphism and the risk of levodopa-induced motor fluctuations in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 308: 21–24.
- Wang J, Si YM, Liu ZL and Yu L (2003) Cholecystokinin, cholecystokinin-A receptor and cholecystokinin-B receptor gene polymorphisms in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13: 365–369.
- Wang Y and Yang X (2012) Association of catechol-o-methyltransferase polymorphism (Val108/158Met) with Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Mot Behav* 44: 365–372.
- Watanabe H, Senda J, Kato S, Ito M, Atsuta N, Hara K, Tsuboi T, Katsuno M, Nakamura T, Hirayama M, Adachi H, Naganawa S, Sobue G (2013) Cortical and subcortical brain atrophy in Parkinson's disease with visual hallucination. *Mov Disord* 28: 1732–1736.
- Watanabe M, Harada S, Nakamura T, Ohkoshi N, Yoshizawa K, Hayashi A and Shoji S (2003) Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease. *Neuropsychobiology* 48: 190 – 193.
- Weinshilboum R (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348: 529–537.
- Woitalla D, Karwasz R, Müller T, Przuntek H, Kuhn W (2000) The activity of catechol-O-methyltransferase in parkinsonian patients with “on-off fluctuations”. *J Neural Transm* 107: 105–111.
- Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Lu SL, Shan DE, Ho YF, Chern HD (2001) The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese. *Neurology* 56: 375 – 382.
- Yamada H, Kuroki T, Nakahara T, Hashimoto K, Tsutsumi T, Hirano M and Maeda H (2007) The dopamine D1 receptor agonist, but not the D2 receptor agonist, induces gene expression of Homer 1a in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 1131: 88–96.

- Yoritaka A, Hattori N, Yoshino H and Mizuno Y (1997) Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. *J Neural Transm* 104: 1313 – 1317.
- Yuan RY, Sheu JJ, Yu JM, Hu CJ, Tseng IJ, Ho CS, Yeh CY, Hung YL, Chiang TR (2009) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and plasma homocysteine in levodopa-treated and non-treated Parkinson's disease patients. *J Neurol Sci* 287: 64–68.
- Zappia M, Annesi G, Nicoletti G, Arabia G, Annesi F, Messina D, Pugliese P, Spadafora P, Tarantino P, Carrideo S *et al.* 2005. Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study. *Arch Neurol* 62: 601–605.
- Zhang YH, Tang BS, Song CY, Xu Q, Lou MX, Liu ZH, Yu RH, Yan XX, Guo JF (2013) The relationship between the phenotype of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Neurosci Lett* 556:109 – 112.
- Zhu BT (2002) 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* 3: 321 – 349.
- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN, Haubenberger D, Spielberger S, Schulte EC, Lichtner P *et al.* (2011) A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89: 168–175.

Anexos

Outras produções científicas relacionadas no período



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients

Aim: Dyskinesia and motor fluctuation are frequent and serious complications of chronic levodopa therapy in patients with Parkinson's disease. Since genetic factors could play a role in determining the occurrence of these problems, the aim of the present study was to investigate whether possible functional polymorphisms among *DRD2* and *ANKK1* genes are associated with the risk of developing dyskinesia and motor fluctuations in Parkinson's disease patients. **Patients & methods:** One hundred and ninety nine patients in treatment with levodopa were genotyped for the -141CIns/Del, rs2283265, rs1076560, C957T, TaqIA and rs2734849 polymorphisms at the *DRD2/ANKK1* gene region. **Results:** Carriers of the TTCTA haplotype showed an increased risk for the presence of dyskinesia ($p = 0.007$; 1.538 [95% CI: 1.126–2.101]). **Conclusion:** Our data suggest an influence of the *DRD2/ANKK1* gene region on levodopa-induced dyskinesia.

Original submitted 8 May 2012; Revision submitted 29 August 2012

KEYWORDS: ANKK1 ■ dopamine ■ DRD2 ■ dyskinesia ■ haplotype ■ levodopa ■ motor fluctuation ■ Parkinson's disease ■ pharmacogenetics ■ polymorphisms

Idiopathic Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, and is characterized by bradykinesia, rigidity, rest tremor and loss of postural reflexes. Despite almost 200 years since the disease was first described by James Parkinson [1] the exact mechanism underlying this condition remains unknown. It affects approximately 1–3% of the population over the age of 65 years, which represents approximately 5 million people [2]. The motor symptoms result from an ongoing degeneration process in the nigrostriatal dopaminergic system, which leads to depletion of dopamine and loss of control over motor functions [3].

Since depletion of dopamine is a core pathophysiological process of motor symptoms, dopamine replacement, using the dopamine precursor levodopa, has been the major treatment strategy. This drug allows a better striatum stimulation, which exerts positive control over movement generation and coordination [4]. Although it is the most effective therapy for PD, a long-term levodopa treatment can cause adverse effects such as dyskinesia and motor fluctuations [5]. Motor fluctuations are considered as alterations between periods of being 'on,' during which the patient shows a good response to medication, and being 'off' during which the patient experiences PD symptoms. Dyskinesia is a complication of the 'on' periods. It is estimated that

40% of all patients treated with levodopa may develop dyskinesia and/or motor fluctuation by 4–6 years of treatment, increasing the frequencies over the years [5–10]. These complications affect the quality of life of those patients, leading to constant levodopa dose changes and complex posological schemes.

The aim of levodopa therapy is to maintain the neuromodulation that occurs through the dopaminergic receptors on striatal neurons. Among all dopamine receptors, the *DRD2* gene (chromosome 11q22-q23) is of particular interest. The protein derived from *DRD2* is recognized as one of the largest sites of action of dopamine in the nigrostriatal circuit. Few investigations evaluated *DRD2* association with adverse effects of levodopa [11–14].

The *ANKK1* gene is mapped downstream from the *DRD2* gene. Until 2004, polymorphisms in this gene were considered to be *DRD2* polymorphisms [15]. Hoenicka *et al.* demonstrated that the *ANKK1* mRNAs and proteins are expressed in astrocytes of human adults and rodents [16]. *ANKK1* alters expression level of NF- κ B-regulated genes [17], as *DRD2* expression is regulated by NF- κ B factors [18], *ANKK1* is linked to *DRD2* through an indirect pathway.

In this study, the relationship between *DRD2/ANKK1* genes and levodopa adverse effects was investigated using the -141C Insertion/Deletion (Ins/Del – rs1799732),

Mariana Rieck¹,
Artur F Schumacher-
Schuh^{1,2},
Vivian Altmann¹,
Carolina LM Francisconi²,
Paulo TB Fagundes²,
Thaís L Monte², Sidia M
Callegari-Jacques³,
Carlos RM Rieder²
& Mara H Hutz*¹

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

²Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Author for correspondence:

Tel.: +55 51 3308 6720

Fax: +55 51 3343 5850

maria.hutz@ufrgs.br

Future
Medicine part of



rs2283265, rs1076560, C957T (rs6277), *TaqIA* (rs1800497) and rs2734849 polymorphisms, that may affect *DRD2/ANKK1* genes transcription and mRNA splicing.

Patients & methods

■ Sample characteristics

A total of 199 Brazilian PD patients were recruited and evaluated at the Movement Disorder Clinics at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from 2006 to 2011. Inclusion criteria were:

- PD diagnosis according to UK Brain Bank criteria [19] and revised by one of us (CRM Rieder), an experienced neurologist in movement disorders;
- To be in use of levodopa for at least 1 year;
- To have had a favorable initial response to the drug.

Patients with atypical and secondary Parkinsonisms were excluded. The ethical committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil) approved the study protocol. All patients included provided a written informed consent to participate.

Information on gender, ethnic group, age, age at onset, disease duration, levodopa daily dosage, duration of levodopa therapy and presence of dyskinesia and motor fluctuations were assessed by clinical evaluation and interviews with patients and relatives. A trained neurologist applied the four parts of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS-IV) [20]. The presence of dyskinesia was determined based on question 32 of UPDRS-IV or if patients were in use of amantadine as an antidyskinetic drug. Motor fluctuations were determined based on item B of UPDRS-IV.

■ Laboratory procedures

A total of 4 ml of peripheral blood was collected for DNA extraction. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a standard salting out method. The polymorphism – 41CIns/Del (rs1799732) was amplified by the PCR and the product cleaved by restriction endonuclease (*Bst*NI), as described by Arinami *et al.* [21]. The fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide. The remaining polymorphisms (rs2283265, rs1076560, C957T [rs6277], *TaqIA* [rs1800497] and rs2734849) were genotyped with Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA), according to the manufacturer's recommended

protocol for the TaqMan allelic discrimination system (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems).

■ Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies with Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by χ^2 tests. Linkage disequilibrium (LD) was estimated using the Multiple Locus Haplotype Analysis (Mlocus 3.0) [22]. Haplotypes were derived using PHASE version 2.1 [23,24].

Univariate analyses of the individual effect of each polymorphism on the adverse effects were conducted by χ^2 tests. Poisson regressions were performed to assess the association between polymorphisms or haplotypes and adverse effects due to long-term levodopa treatment in PD patients. Haplotypes with frequencies less than 3% were pooled. Potential confounders were evaluated using χ^2 test for categorical variables and t-test or Wilcoxon–Mann–Whitney U-test for continuous variables with and without normal distribution, respectively. Potential confounders to be entered in models were defined based on conceptual analyses of the literature and/or by means of a statistical definition (association with the study factor and with the outcome at $p \leq 0.10$). Confounders for dyskinesia and motor fluctuations were age, duration of levodopa therapy and levodopa daily dosage.

Results

Frequencies for the six polymorphisms investigated are shown in TABLES 1 & 2. The genotype distribution did not deviate significantly from Hardy–Weinberg equilibrium. Genotype frequencies and allele frequencies observed were similar to those found in previous studies [17,25–29].

Pairwise LD was assessed for all combinations of the six polymorphisms spanning the *DRD2/ANKK1* gene region. The -141CIns/Del polymorphism was in LD with C957T and rs2734849. The remaining five SNPs were in LD among them (SUPPLEMENTARY TABLE 1; www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.12.149). Based on these results, 11 haplotypes were derived for these five SNPs (rs2283265, rs1076560, C957T-rs6277, *TaqIA*-rs1800497 and rs2734849), but only three haplotypes accounted for 91.5% of the investigated chromosomes (TABLES 1 & 2).

TABLE 3 shows general demographic and clinical characteristics of patients according to the presence of haplotypes and dyskinesia.

Patients were aged between 43 and 94 years (67.96 ± 10.26 years), with a mean age at onset of 59.13 ± 10.98 years, and 51.25% were men. The total levodopa daily dosage mean was 702.76 ± 292.90 mg/day. Dyskinesia was present in 41.71% of the investigated patients. These patients had on average 8.88 ± 4.90 years of disease duration and 6.67 ± 4.79 years of levodopa therapy.

Univariate analyses for each polymorphism showed that, using a dominant model, the rs2283265, rs1076560 and *TaqIA* polymorphisms were associated with dyskinesia (χ^2 test: p-value of 0.054, 0.076 and 0.021, respectively). Based on these results, the TTCTA haplotype was considered the risk haplotype.

Age and levodopa dosage were associated with both haplotype and dyskinesia. Duration of levodopa therapy was related to dyskinesia ($p = 0.001$) but not to haplotypes (GGCCA $p = 0.724$; GGTTCG $p = 0.238$; TTCTA $p = 0.592$), and was selected for its importance in the literature. As disease duration was highly correlated with levodopa therapy duration ($p < 0.001$) it was not included in the regression because when two predictor variables that are highly correlated are included in the regression model, their estimated contributions and those of all other variables may be imprecise, therefore we used only levodopa therapy duration in the regression model. Although ethnicity was not associated with the risk haplotype (TTCTA; $p = 0.886$), it was associated with dyskinesia ($p = 0.033$). In order to avoid population stratification, ethnicity was considered a confounder in the regression model.

Multiple Poisson regression analyses showed that the TTCTA haplotype was an independent predictor of dyskinesia ($p = 0.007$; 1.538 [95% CI: 1.126–2.101]). It was also shown that duration of levodopa therapy and levodopa daily dosage were independent risk factors for the development of dyskinesia (TABLE 4). Patients with dyskinesia are on levodopa therapy for more years (8.44 ± 4.92 years) and are taking higher doses of levodopa (780.12 ± 308.08 mg/day) than individuals without this adverse reaction (5.43 ± 4.29 years and 647.41 ± 269.49 mg/day, respectively). Interaction effects between haplotype and duration of levodopa therapy and levodopa daily dosage were tested but no association was observed ($p = 0.6$ and 0.2 , respectively). No association with motor fluctuations was observed in the univariate analyses (TABLE 5) or in the multiple Poisson regression analyses (TABLE 6).

Table 1. Distribution of *DRD2/ANKK1* polymorphisms between Parkinson's disease patients.

	Allele	Polymorphism location	Minor allele frequency
<i>DRD2</i>			
-141C Ins/Del (rs1799732)	C/-	Promoter	0.13
rs2283265	G/T	Intron 5	0.22
rs1076560	G/T	Intron 6	0.22
C957T (rs6277)	C/T	Exon 7	0.45
<i>ANKK1</i>			
<i>TaqIA</i> (rs1800497)	C/T	Exon 8	0.27
rs2734849	A/G	Exon 8	0.43

Ins/Del: Insertion/Deletion.

Discussion

The main finding of the present study was that *DRD2/ANKK1* TTCTA haplotype is an independent predictor of levodopa-induced dyskinesia in PD patients ($p = 0.007$). Dyskinesia, which consists of abnormal and excessive involuntary movements, is present in 41.71% of the patients investigated, after 6.67 ± 4.79 years of levodopa therapy. This value is in agreement with previous investigations that estimated a 30% rate by 5 treatment years and 59% by 10 years [8–10].

Recently, a potential function for rs2283265 and rs1076560 SNPs has been described. The minor alleles of these polymorphisms are putatively involved with alternative splicing, therefore they might decrease the expression of *DRD2* short splice variant (expressed mainly presynaptically) when compared with *DRD2* long variant (postsynaptic) [27]. Presynaptic *DRD2* acts as an autoreceptor [30], to which an attributed autoinhibition function is suggested. This function prevents excessive extracellular dopamine levels [31]. When this negative feedback is decreased, a dopamine overflow in the synaptic cleft could occur.

Table 2. Distribution of *DRD2/ANKK1* haplotypes between Parkinson's disease patients.

Haplotype [†]	Patients (n)	Haplotype frequency
GGTCG	128	0.42
GGCCA	95	0.29
TTCTA	72	0.21
Others	29	0.08

[†]*DRD2/ANKK1* haplotype: rs2283265/rs1076560/C957T (rs6277)/*TaqIA* (rs1800497)/rs2734849.
Ins/Del: Insertion/Deletion.

Table 3. Demographic and clinical characteristics of the Parkinson's disease patients, overall and according to haplotypes and dyskinesia.

Characteristics	Haplotype**											
	Overall			GGCCA			GGTCG			TTCTA		
	All	Present	Absent	All	Present	Absent	All	Present	Absent	All	Present	Absent
Patients (n)	199	83	116	95	40	55	128	52	76	72	37	35
Sex, males (n)	102	39	63	56	22	34	59 [§]	23	36	31	14	17
Ethnic group, European descent (n)	173	77 [§]	96	80 [§]	36	44	117 [§]	50	67	62	35	27
Age (years, mean ± SD)	67.96 ± 10.26	65.52 ± 9.99 [§]	69.72 ± 10.14	68.75 ± 10.77	65.00 ± 10.05	71.47 ± 10.53	67.87 ± 10.21	65.62 ± 10.39	69.41 ± 9.86	66.47 ± 11.07 [§]	62.95 ± 10.27	70.20 ± 10.79
Age at onset (years, mean ± SD)	59.13 ± 10.98	55.27 ± 10.18 [§]	61.90 ± 10.73	59.78 ± 11.44	55.25 ± 10.05	63.07 ± 11.33	59.37 ± 10.94	55.42 ± 10.40	62.08 ± 10.53	58.04 ± 12.47	53.14 ± 11.31	63.23 ± 11.63
Disease duration (years, mean ± SD)	8.88 ± 4.90	10.27 ± 4.72 [§]	7.90 ± 4.81	9.13 ± 4.95	9.80 ± 4.95	8.64 ± 4.94	8.55 ± 4.78	10.19 ± 4.58	7.42 ± 4.60	8.46 ± 4.43	9.86 ± 4.06	6.97 ± 4.38
Levodopa daily dosage (mg/day, mean ± SD) ^{††}	702.76 ± 292.90	780.12 ± 308.08 [§]	647.41 ± 269.49	688.82 ± 246.08	724.69 ± 230.08	662.73 ± 255.99	702.05 ± 309.75	798.80 ± 353.14	635.86 ± 258.34	663.19 ± 256.50	711.49 ± 222.41	612.14 ± 282.48
Duration of levodopa therapy (years, mean ± SD)	6.67 ± 4.79	8.44 ± 4.92 [§]	5.43 ± 4.29	6.50 ± 4.77	7.84 ± 5.12	5.58 ± 4.33	6.38 ± 4.50	8.06 ± 4.69	5.26 ± 4.02	6.50 ± 4.16	8.39 ± 4.13	4.55 ± 3.21
Dopamine agonists (n)	32	21	11	17	11	6	21	16	5	13	9	4
COMT inhibitors (n)	23	17	6	8	7	1	13	8	5	13	12	1

[†]DRD2/ANKK1 haplotype: rs2283265/rs1076560/C957T (rs6277)/TaqIA (rs1800497)/rs2734849.

[‡]Data from haplotypes with low frequencies are not shown in the table.

[§]Significant association ($p \leq 0.10$) calculated by t-test, Wilcoxon–Mann–Whitney U-test (quantitative variables with and without normal distribution, respectively), and χ^2 test (categorical variables).

^{††}Does not take into account other medications.

SD: Standard deviation.

Table 4. Multiple Poisson regression analyses of *DRD2/ANKK1* haplotype predicting dyskinesia between Parkinson's disease patients.

Variables	β	SE	Wald	DF	p-value	PR (95% CI)
TTCTA [†]	0.430	0.160	7.318	1	0.007	1.538 (1.126–2.101)
Age of 69 years or more	-0.155	0.234	0.438	1	0.508	0.857 (0.542–1.354)
Duration of levodopa therapy	0.059	0.014	19.206	1	<0.001	1.061 (1.033–1.090)
Levodopa daily dosage [‡] (mg/day)	0.001	<0.001	5.520	1	0.019	1.000 (1.000–1.001)
Ethnicity	0.674	0.352	3.665	1	0.056	1.962 (0.984–3.910)

Interaction effect between haplotype and duration of levodopa therapy and levodopa daily dosage were tested but no association was observed (p = 0.6 and 0.2, respectively).
[†]DRD2/ANKK1 haplotype: rs2283265/rs1076560/C957T (rs6277)/TaqIA (rs1800497)/rs2734849.
[‡]Does not take into account other medications.
 β : Estimated coefficient; DF: Degrees of freedom; PR: Prevalence ratio; SE: Standard error; Wald: Test the statistical significance of each coefficient (β) in the model (Z statistic).

Although still controversial, the C957T polymorphism is associated with altered DRD2 density/availability. Duan *et al.* [32] reported that, *in vitro*, the T allele led to a decrease in mRNA stability and translation, and changed dopamine-induced upregulation of DRD2 expression, whereas Hirvonen *et al.* found that, *in vivo*, DRD2 availability are different in the striatum (C/C<C/T<T/T) [33,34] compared with the extrastriatal regions (C/C>C/T>T/T) [35]. With those unexpected finding, they did a third study to elucidate DRD2 availability between C957T genotypes. The results indicate that the striatal DRD2 decreased availability, associated with the C allele, is predominantly driven by a change in affinity and not by density [36]. The C allele presented an increased dissociation constant that reflects a reduced affinity of DRD2 sites for the radiotracer, possibly owing to increased dopamine levels.

TaqIA and rs2734849 SNPs produces amino acid changes (Glu713Lys and His490Arg, respectively) in the C terminal ankyrin repeat domain of ANKK1. Five studies found decreased DRD2 density in TaqIA A1(T) allele carriers [25,37–40] and one study did not find an association between genotypes and DRD2 expression [41]. Laakso *et al.* demonstrated that the A1 allele is associated with increased striatal activity of L-amino acid decarboxylase, the final enzyme in the biosynthesis of dopamine [42]. These results suggest that dopamine is increased in the synaptic cleft by lower DRD2 expression leading to a decreased autoreceptor function. SNP rs2734849 may be affecting DRD2 density by altering NF- κ B expression levels, a necessary factor for DRD2 transcription [17].

To the best of our knowledge, rs2283265, rs1076560, C957T and rs2734849 SNPs have not been investigated previously for association with PD and/or adverse effects of long-term levodopa

treatment. Although there are many studies with the -141CIns/Del and TaqIA polymorphisms on addictions, compulsive disorders and schizophrenia, few investigations were carried out with PD [29,43–46]. An association was reported between TaqID and the -141C polymorphisms in the DRD2 gene and antipsychotic-induced movement disorders such as tardive dyskinesia, suggesting that the contribution of DRD2 gene variants to movement disorders [47]. Few studies report the effects of those polymorphisms on levodopa induced complications [12,48]. Kaiser *et al.* did not find an association between the -141CIns/Del and TaqIA polymorphism with dyskinesia and on–off phenomena in PD [12]. In the present study, a haplotype (TTCTA) derived from rs2283265, rs1076560, C957T, TaqIA and rs2734849 SNPs among DRD2/ANKK1 gene region was associated with dyskinesia. Based on functional studies, this haplotype seems to be associated with a generalized reduced DRD2 expression. This reduction can represent a lower negative feedback signal and a loss of control over dopamine release. An augmented release rate could influence the appearance of dyskinesia, as this side effect represents an excessive levodopa response [8].

The motor fluctuations consist primarily of 'wearing-off' (end-of-dose deterioration), 'on–off' (fluctuations from mobility to immobility) and 'no-on' (dose failure) phenomena [49,50]. The literature suggests that this adverse effect may occur owing to reduced striatal dopamine availability, by loss of presynaptic dopaminergic terminals and a reduction in the capacity of the striatum to synthesize, store and release dopamine. Other hypothesis suggests that pulsatile stimulation of denervated dopaminergic receptors leads to deregulation of genes and proteins in postsynaptic striatal neurons [49,51,52]. Wang *et al.* reported an association of the TaqIA polymorphism with

Table 5. Demographic and clinical characteristics of the Parkinson's disease patients, overall and according to haplotype and motor fluctuations.

Characteristics	Haplotype**													
	Overall				GGCCA				GGTCG				TTCTA	
	All	Present	Absent	All	Present	Absent	All	Present	Absent	All	Present	Absent	Present	Absent
Patients (n)	199	144	55	95	64	31	128	91	37	72	53	19		
Sex, males (n)	102	78	24	56	40	16	59	43 [§]	16	31	23	8		
Ethnic group, European descent (n)	173	127	46	80	55	25	117	84 [§]	33	62	46	16		
Age (years, mean ± SD)	67.96 ± 10.26 [§]	67.08 ± 9.91	70.29 ± 10.90	68.75 ± 10.77	67.42 ± 10.42	71.48 ± 11.12	67.87 ± 10.21	67.26 ± 9.99	69.35 ± 10.73	66.47 ± 11.07	65.19 ± 10.82 [§]	70.05 ± 11.27		
Age at onset (years, mean ± SD)	59.13 ± 10.98 [§]	57.17 ± 10.19	64.25 ± 11.40	59.78 ± 11.44	57.25 ± 10.76	65.00 ± 11.18	59.37 ± 10.94	57.75 ± 10.28	63.38 ± 11.61	58.04 ± 12.47	55.75 ± 11.67	64.42 ± 12.68		
Disease duration (years, mean ± SD)	8.88 ± 4.90 [§]	9.90 ± 4.77	6.24 ± 4.25	9.13 ± 4.95	10.23 ± 4.74	6.84 ± 4.63	8.55 ± 4.78	9.47 ± 4.52	6.27 ± 4.69	8.46 ± 4.43	9.47 ± 4.25	5.63 ± 3.73		
Levodopa daily dosage (mg/day, mean ± SD) [¶]	702.76 ± 292.90 [§]	759.37 ± 281.85	554.55 ± 241.00	688.82 ± 246.08	746.29 ± 242.01	570.16 ± 212.47	702.05 ± 309.75	760.03 ± 317.35	559.46 ± 239.38	663.19 ± 256.50	724.53 ± 248.82	492.11 ± 196.68		
Duration of levodopa therapy (years, mean ± SD)	6.67 ± 4.79 [§]	7.65 ± 4.90	4.08 ± 3.26	6.50 ± 4.77	7.57 ± 4.96	4.29 ± 3.42	6.38 ± 4.50	7.34 ± 4.50	4.05 ± 3.60	6.50 ± 4.16	7.34 ± 4.12	4.06 ± 3.14		
Dopamine agonists (n)	32	28	4	17	15	2	21	18	3	13	11	2		
COMT inhibitors (n)	23	20	3	8	8	0	13	11	2	13	11	2		

[¶]DRD2/ANKK1 haplotype: rs2283265/rs1076560/C957T (rs6277)/TaqIA (rs1800497)/rs2734849.

[§]Data from haplotypes with low frequencies are not shown in the table.

[¶]Significant association ($p \leq 0.10$) calculated by t-test, Wilcoxon-Mann-Whitney U-test (quantitative variables with and without normal distribution, respectively), and χ^2 test (categorical variables).

[§]Does not take into account other medications.

SD: Standard deviation.

Table 6. Multiple Poisson regression analyses of *DRD2/ANKK1* haplotypes predicting motor fluctuation between Parkinson's disease patients.

Variables	β	SE	Wald	DF	p-value	PR (95% CI)
TTCTA [†]	0.070	0.084	0.688	1	0.407	1.072 (0.909–1.264)
Age of 69 years or more	-0.152	0.129	1.399	1	0.237	0.859 (0.667–1.105)
Duration of levodopa therapy	0.032	0.007	20.656	1	<0.001	1.032 (1.018–1.046)
Levodopa daily dosage	<0.001	<0.001	11.431	1	<0.001	1.000 (1.000–1.001)
Ethnicity	0.123	0.146	0.709	1	0.400	1.131 (0.849–1.506)

[†]DRD2/ANKK1 haplotype: rs2283265/rs1076560/C957T (rs6277)/TaqIA (rs1800497)/rs2734849.
 β : Estimated coefficient; df: Degrees of freedom; PR: Prevalence ratio; SE: Standard error; Wald: Test the statistical significance of each coefficient (β) in the model (Z statistic).

motor fluctuation in PD [48]; however, in the present study no association was observed.

The overall results presented in this study should be viewed in the context of some limitations. The sample is of moderate size, thus these data require additional confirmation in a larger sample. Moreover dyskinesia was assessed only as a categorical variable (presence/absence). Future investigations using Scales such as AIMS, Rush Dyskinesia Rating Scale, PDYS-26 and UDysRS, and levodopa diaries [53] in larger samples will give more reliable results about the role of *DRD2* genotypes on this adverse effect. Another limitation is the absence of levodopa plasma levels information, a possible factor contributing to the final phenotype. Although a recent study with 48 ancestry informative markers did not show significant population structure in southern Brazilians [54] no genomic control was performed, therefore our findings could have been biased by hidden genetic heterogeneity present in our sample of the southern Brazilian population. Nevertheless, our result should be considered as positive preliminary evidence, because the association between this *DRD2* haplotype and levodopa-induced dyskinesia in PD patients has not been described before.

Recent evidence suggests that non-dopaminergic pathways, such as serotonin and adenosine, may be central in dyskinesias. Serotonergic and dopaminergic neurons express common enzymes, such as AADC, and the transporter VMAT2. These enzymes allow serotonergic neurons to convert levodopa into dopamine and release it. As reviewed by Cheshire and Williams, death of dopaminergic neurons enhances the importance of dopamine liberation by serotonergic neurons [55]. Two significant points may be influencing the onset of dyskinesia: the lack of feedback mechanism to regulate synaptic dopamine levels, creating excessive fluctuations in extracellular striatal dopamine,

and a competition to release serotonin, inducing overactivity of serotonin neurons. There is evidence that the adenosine A2A receptor may control dopamine-mediated motor functions by:

- Modulating the activity of the indirect pathway
- Regulating glutamate release into the striatum
- By forming dimers with dopamine D2 receptors [56,57]

Studies with animal models of PD and in initial clinical trials show that A2A receptor antagonists improve motor symptoms [58]. Recent results suggest an association between adenosine receptor and PD risk [59]. An association between the *ADORA2A* tagging SNP, rs2298383, with dyskinesia susceptibility has also been reported. [60]. A number of independent factors may cause these adverse effects and the results presented herein suggest that the *DRD2/ANKK1* is one of these factors.

Conclusion

The results of this study suggest that functional polymorphisms at the *DRD2/ANKK1* gene region probably play a role in the pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia. The extent of the region that influences the interindividual differences in response to levodopa remains to be determined. The TTCTA haplotype seems to predict a lower dopamine receptor D2 density, affinity and/or *DRD2* short splice variant availability, affecting pharmacodynamic mechanisms and dopamine release at the synaptic cleft. Therefore, pharmacogenomics approaches could be used to predict an individual's response and a more effective use of PD therapy.

Future perspective

This study provides empirical evidence that the use of pharmacogenomic approaches represent a unique opportunity for drug response prediction

on PD treatment. Owing to the critical role that the dopaminergic system plays in this disease, *DRD2* variations may influence the therapeutic outcome. One possible explanation for the inter-individual differences may reside in SNP–SNP interactions modulating receptor density and/or affinity, which in turn could affect synaptic dopamine levels. The assessment of genetic variation in dopamine receptor genes are a promissory influence area for PD pharmacogenetics studies. Further studies with larger samples, other SNPs and genes are needed to clarify the genetic role of long-term levodopa treatment adverse effects.

Financial & competing interests disclosure

The research was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

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

Ethical conduct of research

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

Executive summary

Background

- Levodopa is the most effective therapy for Parkinson's disease (PD), but a long-term levodopa treatment can cause adverse effects such as dyskinesia and motor fluctuation.
- Since the dopaminergic system plays a critical role in PD, genetic variation in the *DRD2* gene may be involved in the adverse effects of levodopa treatment.

Patients & methods

- A total of 199 Brazilian patients with PD and treated with levodopa were genotyped for the -141C Insertion/Deletion (Ins/Del -rs1799732), rs2283265, rs1076560, C957T (rs6277), TaqIA (rs1800497) and rs2734849 polymorphisms at the *DRD2/ANKK1* gene region by PCR and restriction mapping or real-time PCR system.
- Multiple Poisson regressions were performed to assess the association between haplotypes and adverse effects of long-term levodopa treatment (dyskinesia and motor fluctuations) in PD patients.

Results

- The *DRD2/ANKK1* TTCTA haplotype was associated with dyskinesia ($p = 0.007$; 1.538 [95% CI: 1.126–2.101]).
- No association between *DRD2/ANKK1* gene polymorphisms and motor fluctuations were observed.

Conclusion

- Our data suggest an influence of the *DRD2/ANKK1* TTCTA haplotype on the occurrence of dyskinesia resulting from levodopa treatment in PD patients.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14(2), 223–236 (2002).
 - Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 255(Suppl. 5), S18–S32 (2008).
 - Lewis SJ, Caldwell MA, Barker RA. Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 5(10), 1–20 (2003).
 - Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest.* 116(7), 1744–1754 (2006).
 - Ahlskog JE, Muentner MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 16(3), 448–458 (2001).
 - Marsden CD, Parkes JD. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Lancet* 1(8007), 345–349 (1977).
 - Denny AP, Behari M. Motor fluctuations in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 165(1), 18–23 (1999).
 - Van Gerpen JA, Kumar N, Bower JH, Weigand S, Ahlskog JE. Levodopa-associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmsted County, Minnesota, 1976–1990. *Arch. Neurol.* 63(2), 205–209 (2006).
 - Ku S, Glass GA. Age of Parkinson's disease onset as a predictor for the development of dyskinesia. *Mov. Disord.* 25(9), 1177–1182 (2010).
 - Sharma JC, Bachmann CG, Linazasoro G. Classifying risk factors for dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 16(8), 490–497 (2010).
 - Oliveri RL, Annesi G, Zappia M *et al.* Dopamine D2 receptor gene polymorphism and the risk of levodopa-induced dyskinesias in PD. *Neurology* 53(7), 1425–1430 (1999).
 - First study to investigate pharmacogenetics of levodopa-induced dyskinesia.**
 - Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A *et al.* L-dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology* 60(11), 1750–1755 (2003).
 - Zappia M, Annesi G, Nicoletti G *et al.* Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose

- dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study. *Arch. Neurol.* 62(4), 601–605 (2005).
- 14 Lee JY, Cho J, Lee EK, Park SS, Jeon BS. Differential genetic susceptibility in diphasic and peak-dose dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26(1), 73–79 (2011).
- 15 Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. Identification and characterization of *ANKKI*: a novel kinase gene closely linked to *DRD2* on chromosome band 11q23.1. *Hum. Mutat.* 23(6), 540–545 (2004).
- **First time that *TaqI*A polymorphism was linked with *ANKKI* gene.**
- 16 Hoenicka J, Quinones-Lombrana A, Espana-Serrano L *et al.* The *ANKKI* gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. *Biol. Psychiatry* 67(1), 3–11 (2010).
- 17 Huang W, Payne TJ, Ma JZ *et al.* Significant association of *ANKKI* and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African–American sample. *Neuropsychopharmacology* 34(2), 319–330 (2009).
- 18 Bontempi S, Fiorentini C, Busi C, Guerra N, Spano P, Missale C. Identification and characterization of two nuclear factor-κB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. *Endocrinology* 148(5), 2563–2570 (2007).
- 19 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55(3), 181–184 (1992).
- 20 Martínez-Martín P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gómez JB, Martínez-Sarriés J, Bermejo F. Unified Parkinson's disease rating scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov. Disord.* 9(1), 76–83 (1994).
- 21 Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M. A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 6(4), 577–582 (1997).
- 22 Long JC, Williams RC, Urbaneck M. An E–M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 56(3), 799–810 (1995).
- 23 Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68(4), 978–989 (2001).
- 24 Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am. J. Hum. Genet.* 76(3), 449–462 (2005).
- 25 Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F *et al.* Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol. Psychiatry* 4(3), 290–296 (1999).
- 26 Paus S, Seeger G, Brecht HM *et al.* Association study of dopamine D2, D3, D4 receptor and serotonin transporter gene polymorphisms with sleep attacks in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 19(6), 705–707 (2004).
- 27 Zhang Y, Bertolino A, Fazio L *et al.* Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 104(51), 20552–20557 (2007).
- 28 Yang BZ, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X, Gelernter J. Association of haplotypic variants in *DRD2*, *ANKKI*, *TTC12* and *NCAMI* to alcohol dependence in independent case control and family samples. *Hum. Mol. Genet.* 16(23), 2844–2853 (2007).
- 29 McGuire V, Van Den Eeden SK, Tanner CM *et al.* Association of *DRD2* and *DRD3* polymorphisms with Parkinson's disease in a multiethnic consortium. *J. Neurol. Sci.* 307(1–2), 22–29 (2011).
- 30 Jomphe C, Tiberi M, Trudeau LE. Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* 50(5), 595–605 (2006).
- 31 Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics *in vivo*. *J. Neurosci.* 21(23), 9134–9141 (2001).
- **Study that clarifies the physiological function of the DRD2 autoreceptor as a dopamine autoinhibitor.**
- 32 Duan J, Wainwright MS, Comeron JM *et al.* Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (*DRD2*) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* 12(3), 205–216 (2003).
- 33 Hirvonen MM, Laakso A, Nagren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (*DRD2*) gene affects striatal DRD2 availability *in vivo*. *Mol. Psychiatry* 9(12), 1060–1061 (2004).
- 34 Hirvonen MM, Laakso A, Nagren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (*DRD2*) gene affects striatal DRD2 availability *in vivo*. *Mol. Psychiatry* 10(9), 889 (corrigendum) (2005).
- 35 Hirvonen MM, Lumme V, Hirvonen J *et al.* C957T polymorphism of the human dopamine D2 receptor gene predicts extrastriatal dopamine receptor availability *in vivo*. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 33(4), 630–636 (2009).
- 36 Hirvonen MM, Laakso A, Nagren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of dopamine D2 receptor gene affects striatal DRD2 *in vivo* availability by changing the receptor affinity. *Synapse* 63(10), 907–912 (2009).
- 37 Noble EP, Blum K, Ritchie T, Montgomery A, Sheridan PJ. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 48(7), 648–654 (1991).
- 38 Thompson J, Thomas N, Singleton A *et al.* D2 dopamine receptor gene (*DRD2*) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7(6), 479–484 (1997).
- 39 Pohjalainen T, Rinne JO, Nagren K *et al.* The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol. Psychiatry* 3(3), 256–260 (1998).
- 40 Ritchie T, Noble EP. Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem. Res.* 28(1), 73–82 (2003).
- 41 Laruelle M, Gelernter J, Innis RB. D2 receptors binding potential is not affected by *TaqI* polymorphism at the D2 receptor gene. *Mol. Psychiatry* 3(3), 261–265 (1998).
- 42 Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J *et al.* The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet. Genomics* 15(6), 387–391 (2005).
- 43 Gilgun-Sherki Y, Djalderti R, Melamed E, Offen D. Polymorphism in candidate genes: implications for the risk and treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J.* 4(5), 291–306 (2004).
- **Review of candidate genes that might confer idiopathic Parkinson's disease susceptibility.**
- 44 Dubertret C, Gouya L, Hanoun N *et al.* The 3' region of the *DRD2* gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr. Res.* 67(1), 75–85 (2004).
- 45 Arbouw ME, Van Vugt JP, Egberts TC, Guchelaar HJ. Pharmacogenetics of antiparkinsonian drug treatment: a systematic review. *Pharmacogenomics* 8(2), 159–176 (2007).
- **Review of pharmacogenetic studies in Parkinson's disease.**

- 46 Ponce G, Perez-Gonzalez R, Aragues M *et al.* The *ANKK1* kinase gene and psychiatric disorders. *Neurotox. Res.* 16(1), 50–59 (2009).
- 47 Koning JP, Vehof J, Burger H *et al.* Association of two *DRD2* gene polymorphisms with acute and tardive antipsychotic-induced movement disorders in young Caucasian patients. *Psychopharmacology (Berl.)*. 219(3), 727–736 (2012).
- 48 Wang J, Liu ZL, Chen B. Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology* 56(12), 1757–1759 (2001).
- 49 Marsden CD, Parkes JD. “On-off” effects in patients with Parkinson’s disease on chronic levodopa therapy. *Lancet* 1(7954), 292–296 (1976).
- 50 Jankovic J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson’s disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.* 20(Suppl. 11), S11–S16 (2005).
- 51 Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW. The evolution and origin of motor complications in Parkinson’s disease. *Neurology* 55(11 Suppl. 4), S13–S20; discussion S21–S13 (2000).
- 52 Fox SH, Lang AE. Levodopa-related motor complications – phenomenology. *Mov. Disord.* 23(Suppl. 3), S509–S514 (2008).
- 53 Colosimo C, Martínez-Martín P, Fabbrini G *et al.* Task force report on scales to assess dyskinesia in Parkinson’s disease: critique and recommendations. *Mov. Disord.* 25(9), 1131–1142 (2010).
- 54 Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum. Mutat.* 31(2), 184–190 (2010).
- 55 Cheshire PA, Williams DR. Serotonergic involvement in levodopa-induced dyskinesias in Parkinson’s disease. *J. Clin. Neurosci.* 19(3), 343–348 (2012).
- 56 Fuxe K, Ferré S, Canals M *et al.* Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci.* 26(2–3), 209–220 (2005).
- 57 Morelli M, Di Paolo T, Wardas J, Calon F, Xiao D, Schwarzschild MA. Role of adenosine A2A receptors in parkinsonian motor impairment and L-DOPA-induced motor complications. *Prog. Neurobiol.* 83(5), 293–309 (2007).
- 58 Hickey P, Stacy M. Adenosine A2A antagonists in Parkinson’s disease: what’s next? *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 12(4), 376–385 (2012).
- 59 Popat RA, Van Den Eeden SK, Tanner CM *et al.* Coffee, *ADORA2A*, and *CYP1A2*: the caffeine connection in Parkinson’s disease. *Eur. J. Neurol.* 18(5), 756–765 (2011).
- 60 Greenbaum L, Cohen OS, Inzelberg R *et al.* Association of the adenosine receptor A2A (*ADORA2A*) gene with L-dopa induced dyskinesia in Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 27(Suppl. 1), S1385 (2012) (Abstract).

Cartas de aprovação no Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 06-154

Versão do Projeto: 02/10/2006

Versão do TCLE: 10/10/2006

Pesquisadores:

CARLOS ROBERTO DE MELLO RIEDER

ARTUR FRANCISCO SCHUMACHER SCHUH

THAIS LAMPERT MONTE

RAQUEL DA SILVA TOWNSEND

DANIELE FRICKE

RAPHAEL MACHADO DE CASTILHOS

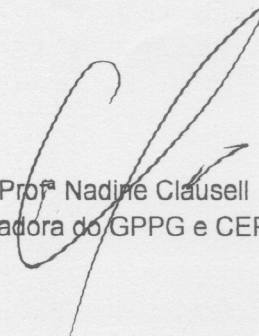
MARA HELENA HUTZ

Título: 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

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular N° 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 11 de outubro de 2006.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Parecer de Projeto de Pesquisa

Título:

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

Pesquisador Responsável CARLOS ROBERTO DE MELLO RIEDER

Data de Entrega: 17/04/2006

Cadastro GPPG: 06-154

Data do Parecer: 11/10/2006

Comentários sobre Aspectos Científicos do Projeto

(Verificar delineamentos; hipóteses, se houver; método; viabilidade e justificativa para o número de participantes)

Objetivo geral: Identificar polimorfismos nos genes DRD1, DRD2, DRD3, DAT1, AADC e da COMT e da MAOB, que possam estar em associação com as diferenças individuais na resposta ao uso de levodopa (dose atual de levodopa para o controle dos sintomas, flutuações motoras, discinesias e psicose).

Serão recrutados para o estudo os pacientes que se encontram em atendimento no ambulatório de distúrbios do movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após a avaliação clínica, será realizada coleta de sangue para a extração do DNA.

O projeto está bem delineado, com todos os itens necessários para o seu entendimento.

Comentários sobre Aspectos Regulatórios e Legais do Projeto

O projeto atende aos aspectos regulatórios e legais. Atente a Resolução do CNS 196/96 e a Resolução CNS 340/04.

Comentários sobre Aspectos Éticos do Projeto

Os aspectos éticos estão adequados, sendo o TCLE elaborado com convite a participação, esclarecimento sobre os procedimentos, riscos e benefícios, escolha de poder autorizar o armazenamento do material biológico pra uso futuro, desde que em projeto aprovado pelo CEP e contato com o indivíduo. Está garantida a confidencialidade dos dados obtidos.

Recomendação:

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto está adequado ética e metodologicamente sendo aprovado em 11/10/2006.

Porto Alegre, 11 de outubro de 2006.

Profª Natália Clausell

Coordenadora GPPG e CEP/HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 06-154

Pesquisador Responsável:

CARLOS ROBERTO DE M RIEDER

Título: FARMACOGENÉTICA DA DOENÇA DE PARKINSON: ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES DRD1, DRD2, DRD3, DAT1, AADC, COMT E MAO-B COM COMPLICAÇÕES DO USO DE LÉVODOPA

EMENDA 1

Data da Versão:

27/09/2011

Este documento referente ao projeto acima foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 13 de outubro de 2011.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Parecer de Emenda a Projeto de Pesquisa

Título do 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

Pesquisador Responsável: Carlos Rieder

Data de Encaminhamento 1

Cadastro GPPG 06154

Emenda número 1

Data da Versão 27/09/2011

Data do Parecer 13/10/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre a Emenda ao Projeto

A emenda visa aumentar o "n" do estudo em razão de solicitação para publicação e avaliações internas dos resultados obtidos até o presente momento. A emenda tem condições de aprovação.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do CEP/HCPA