

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**FARMACOGENÉTICA DOS EFEITOS ADVERSOS INDUZIDOS PELO
TRATAMENTO COM LEVODOPA NA DOENÇA DE PARKINSON**

MARIANA RIECK

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

Orientadora: Dr.^a Mara H. Hutz

Porto Alegre, dezembro de 2016

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

À minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Mara H. Hutz, pela oportunidade que me deste de ser uma das tuas “filhas”, por acreditar no meu trabalho e pela orientação dedicada.

Ao Carlos Rieder e Artur Schuh, por todo apoio indispensável para a realização deste projeto.

Aos meus pais, por dividirem a vida comigo, nas horas boas e nas ruins. Pelo amor que nos une e por me aceitarem como eu sou.

Ao Gustavo Kellermann Reolon, pelas inúmeras correções, dedicação e amparo. Pelo companheirismo e por ter aceitado dividir essa caminhada comigo.

Ao meu irmão e meus avós, por todo apoio e incentivo à minha formação.

Ao Tiago Salomon e ao Rafael Rauber, pela bela caminhada da amizade.

Ao meu eterno dindo Pedro Beschoren da Costa, por sempre me trazer as notícias mais maravilhosas e me apresentar as pessoas mais maravilhosas.

As meninas do laboratório: Angélica, Deise, Estela, Glaucia, Ju, Lu Tovo, Mari Botton e Vivi, por deixarem meus dias muito mais risonhos e leves e sempre estarem à disposição para me ajudar.

À Elisa Kich, por estar sempre ao meu lado e ter aceitado ser minha irmã.

Ao Elmo, por toda dedicação ao Programa e por sempre estar à disposição para ajudar com um sorriso no rosto.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UFRGS, em especial a Professora Sidia M. Callegari-Jacques.

Aos órgãos que financiaram este projeto, e a todos aqueles que ajudaram a torná-lo possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	10
I.1. Doença de Parkinson	11
I.2. Disfunções motoras na doença de Parkinson	12
I.3. Farmacoterapia e seus efeitos adversos	14
I.4. Farmacogenética da doença de Parkinson	17
CAPÍTULO II	
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
CAPÍTULO III	
Association of DRD2 and DRD3 gene polymorphisms and gastrointestinal symptoms induced by levodopa therapy in Parkinson's disease.....	24
CAPÍTULO IV	
Is there a role for ADORA2A polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients?	30
CAPÍTULO V	
No association between nine candidate genes with dyskinesia, motor fluctuations and visual hallucinations induced by levodopa in Parkinson's disease patients.....	41
CAPÍTULO VI	
DISCUSSÃO	62
CAPÍTULO VII	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AADC: Dopa-decarboxilase
ADORA2A: Gene do receptores A_{2A} de adenosina
ANKK1: *Ankyrin repeat and kinase domain containing 1*
A_{2A}R: Receptor A_{2A} de adenosina
cAMP: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CNV: Variações no número de cópias
COMT: Catecol-O-metiltransferase
DAT: Transportador de dopamina
DDC: Gene da dopa-decarboxilase
DP: Doença de Parkinson
DRD2: Receptor de dopamina do tipo D2
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GRM7: Gene do receptor metabotrópico glutamatérgico 7
GWAS: *Genome-wide association study*
HOMER1: *Homer scaffolding protein 1*
LPHN3: Latrofilina-3
MAO: Monoamina oxidase
mGluR: Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mGluR7: Receptor glutamatérgico metabotrópicos 7
NO: Óxido nítrico
eNOS: Óxido nítrico sintetase endotelial, transcrito por NOS3
iNOS: Óxido nítrico sintetase induzível, transcrito por NOS2
nNOS: Óxido nítrico sintetase neurona, transcrito por NOS1
SERT: Transportador de serotonina
SHANK3: *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*
SLC18A2: Gene do transportador vesicular de monoaminas 2
SLC6A4: Gene do transportador de serotonina
VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas 2

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na espécie humana. A doença é caracterizada por bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e perda de tônus postural. Ela é identificada por uma degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos localizados na *substantia nigra*. Essa região é responsável pela modulação e manutenção do movimento via aferências dopaminérgicas do circuito da alça motora. A farmacoterapia da DP tem como objetivo restabelecer os níveis de dopamina no sistema através do precursor da dopamina levodopa. Porém, efeitos adversos da terapia são frequentes. O início do tratamento pode ser marcado por problemas gastrointestinais agudos, tais como náusea e vômito. Essas complicações podem interferir na absorção de levodopa gerando flutuações da resposta motora. Com a progressão da degeneração nigroestriatal, o estresse resultante da exposição desregulada de dopamina na fenda sináptica resulta no aparecimento de discinesia. Os pacientes também podem sofrer alucinações visuais, que surgem devido, entre outras causas, à estimulação dopaminérgica anormal.

O objetivo do presente trabalho foi investigar se polimorfismos em genes candidatos estão associados ao aparecimento de efeitos adversos em uma amostra de pacientes com diagnóstico de DP idiopática do ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brasil).

No presente estudo, os SNPs rs1799732 do gene *DRD2* e rs6280 do gene *DRD3* foram associados com sintomas gastrointestinais [rs1799732 genótipo Ins/Ins: PR(95% IC)= 2.374(1.105–5.100), $P=0.027$; rs6280 genótipo Ser/Ser: PR(95% IC)= 1.677(1.077–2.611), $P=0.022$]. O risco se apresenta aumentado em indivíduos portadores dos dois genótipos, sugerindo um efeito aditivo dos dois polimorfismos investigados [PR(95% IC)= 4.622(1.516–14.088), $P=0.007$].

As variantes rs2298383 e rs3761422 do gene *ADORA2A* apresentaram uma possível associação com discinesia [Diplótipo TC/CT: PR (95% IC)= 2.572

(1.008-6.561), $P=0.047$; Diplótipo TC/TC: PR(95% IC)= 2.598 (1.010-6.681), $P=0.045$]. Já os genes *DDC*, *SLC18A2*, *SLC6A4*, *GRM7*, *LPHN3*, *SHANK3*, *NOS1* e *NOS3* não apresentaram associação com os desfechos investigados de discinesia, flutuações motoras e alucinações visuais.

O conhecimento sobre a farmacogenética da DP está lentamente crescendo. O presente trabalho contribuiu na geração de novas hipóteses de associações. Assim, colaboramos para o entendimento de como a genética pode influenciar na resposta individual ao tratamento farmacológico na DP.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in humans. The disease is characterized by bradykinesia, resting tremor, muscular rigidity and loss of postural tone control. PD is mainly defined by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, region responsible for movement generation and maintenance via the motor loop. PD's pharmacological therapy aims to restore the levels of dopamine in the system through levodopa, a dopamine precursor. However, problems with the therapy are frequent. Gastrointestinal (GI) symptoms, such as nausea and vomiting, can occur at the onset of the treatment and may interfere with levodopa absorption, leading to the appearance of motor fluctuations. As the degeneration in the nigrostriatal system increases, the wide range of dopamine exposition leads to the appearance of dyskinesia. Patients can also suffer with visual hallucinations, due to the abnormal dopaminergic stimulation, among other causes.

The aim of the present study was to investigate possible associations between candidate genes variants and levodopa-induced adverse effects in idiopathic PD patients from the Movement Disorder Clinics at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

In the present study, DRD2 rs1799732 and DRD3 rs6280 polymorphisms were associated with GI symptoms occurrence [rs1799732 Ins/Ins genotype: PR(95% CI)= 2.374(1.105–5.100), $P=0.027$; rs6280 Ser/Ser genotype: PR(95% CI)= 1.677(1.077–2.611), $P=0.022$]. The risk was higher when subjects presented both risk genotypes, suggesting an additive effect between the polymorphisms investigated [PR(95% CI)= 4.622(1.516–14.088), $P=0.007$].

ADORA2A rs2298383 and rs3761422 variants may be a risk factor for dyskinesia appearance [Diplotype TC/CT: PR (95% CI)= 2.572 (1.008-6.561), $P=0.047$; Diplotype TC/TC: PR(95% CI)= 2.598 (1.010-6.681), $P=0.045$]. No association was found among DDC, SLC18A2, DRD3, SLC6A4, Grm7, LPHN3,

SHANK3, NOS1 and NOS3 gene variants and the outcomes investigated of dyskinesia, motor fluctuations or visual hallucinations.

PD pharmacogenetic knowledge is slowly growing. This work contributed with the generation of new association hypotheses. Thus, we added clues to the understanding of how pharmacogenetics may influence the individual response to PD treatment.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na espécie humana, afetando aproximadamente de 1 a 3% da população acima de 65 anos, o que corresponde atualmente em torno de 5 milhões de pessoas. A maioria dos casos é esporádica, sendo apenas menos de 10% deles de origem monogênica (Alves *et al.* 2008).

Do ponto de vista patológico, a DP é uma doença crônica e progressiva do sistema nervoso, cujas manifestações clínicas se revelam após a enfermidade ter atingido estágio avançado (Schnabel 2010). Ela é caracterizada pelos sintomas motores de bradicinesia (dificuldade de iniciar os movimentos e lentidão para executá-los), tremor de repouso, rigidez muscular e perda de tônus postural. Sintomas não motores associados à evolução do quadro também estão presentes, tais como dores, cansaço excessivo, perda de olfato, ansiedade, insônia, disfunção autonômica, depressão e déficits cognitivos e comportamentais (Gelb *et al.* 1999; Obeso *et al.* 2010).

Em níveis histológicos, a DP é identificada por uma degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos localizados no subnúcleo *pars compacta* da *substantia nigra*, situado no mesencéfalo. Os pacientes apresentam concomitantemente agregações protéicas insolúveis, conhecidos como corpúsculo de Lewis, nas áreas neuronais afetadas pela degeneração (Spillantini & Goedert 2000). O dano à *substantia nigra* é acompanhado por danos em outros núcleos do tronco cerebral, como os núcleos motores dorsais dos nervos glossofaríngeo e vago, núcleo anterior olfatório, chegando ao córtex cerebral e até mesmo neurônios periféricos, como do plexo mioentérico (Braak *et al.* 2003).

Com o avanço dos sintomas, a DP resulta em uma contínua diminuição na qualidade de vida do paciente, afetando também toda estrutura familiar (Whetten-Goldstein *et al.* 1997). Não apenas o impacto social, mas o financeiro é elevado. A estimativa de custos anuais se encontra na casa dos 23 bilhões de dólares nos Estados Unidos e no mínimo de 450 milhões de libras no Reino Unido (Huse *et al.* 2005; Findley 2007). Essas estimativas são baseadas não apenas nos custos com serviços ambulatoriais, internações e medicamentos

prescritos, mas também nas despesas de cuidados de longo prazo, perda de produtividade do paciente e seus cuidadores.

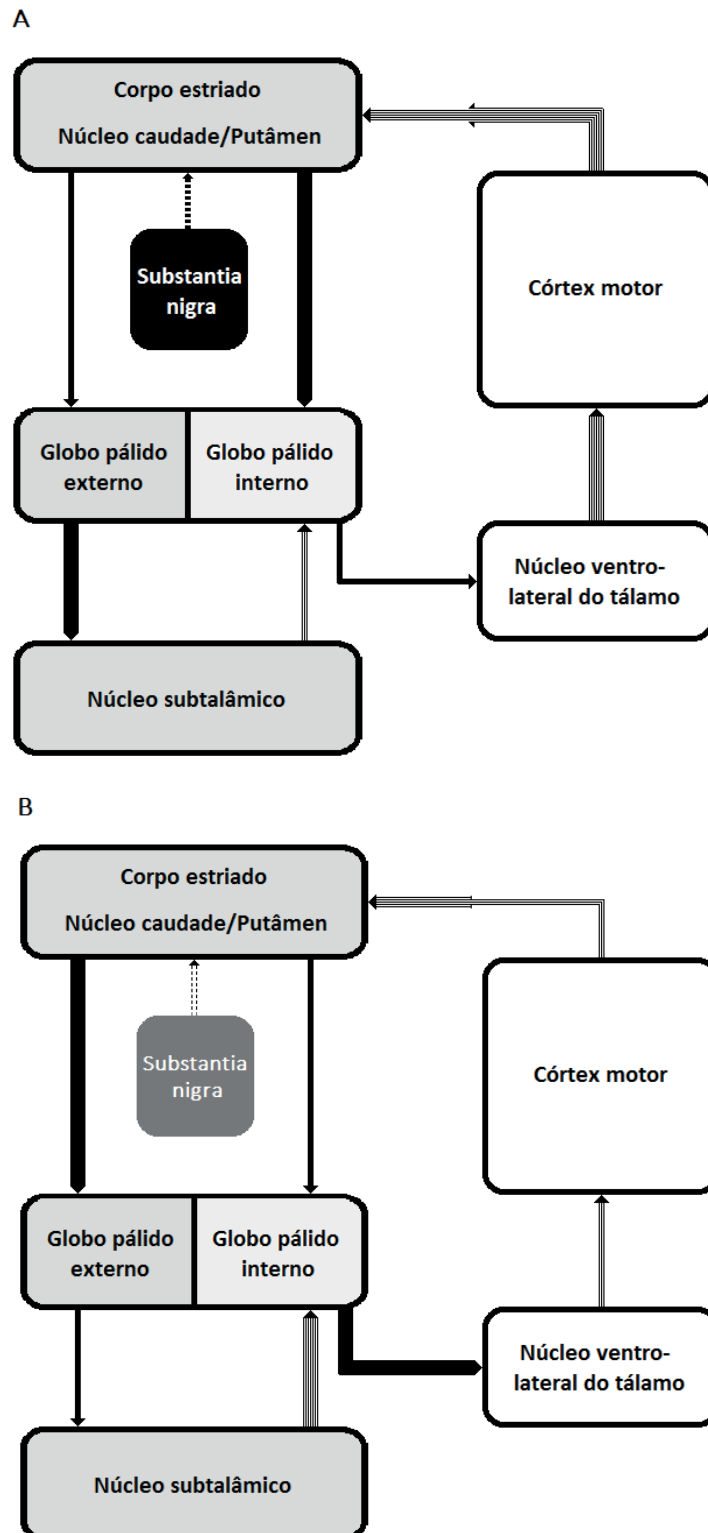
Quase 200 anos transcorreram desde que a doença foi descrita. Muitos fatores independentes foram reconhecidos por contribuírem para seu início. Apesar disso, a DP não tem cura e sua etiologia não é totalmente conhecida.

I.2. Disfunções motoras na doença de Parkinson

Os sintomas motores são o sinal primordial para o diagnóstico clínico da doença, sendo a *substantia nigra* peça chave para o entendimento desse problema. A *substantia nigra*, juntamente com corpo estriado (núcleo caudado, putâmen), globo pálido e o núcleo subtalâmico, são conhecidos como núcleos da base e integram o circuito da alça motora. Este circuito é responsável pelo refinamento da escolha dos músculos participantes de um movimento e pela amplificação do sinal gerado pelo córtex motor (Lewis *et al.* 2003).

O circuito funciona da seguinte maneira: o sinal proveniente do córtex motor, ao alcançar o corpo estriado, é redirecionado para o globo pálido interno, seguindo a via direta, ou para o globo pálido externo, seguindo a via indireta. Após o sinal da via indireta percorrer o núcleo subtalâmico, ocorre sua reunificação no globo pálido interno. As duas vias gerarão conjuntamente um estímulo para o núcleo ventro-lateral do tálamo. Quando um indivíduo saudável se encontra em repouso, a união dessas vias inibe os neurônios excitatórios do tálamo pela ativação do globo pálido interno. O resultado é uma redução da atividade muscular. Quando há a estimulação do circuito pelo córtex motor, o globo pálido interno passa a ser inibido, liberando um *feedback* positivo ao córtex via núcleo ventro-lateral e, conseqüentemente, aumentando a atividade muscular (Lewis *et al.* 2003) (Figura 1).

Figura 1. Esquema do circuito da alça motora em pessoas não portadoras (A) e portadoras (B) da doença de Parkinson quando da geração de um movimento.



Legenda: Setas preenchidas: aferências inibitórias (gabaérgicas); Setas com linhas contínuas: aferências excitatórias (glutamatérgicas); Setas com linhas descontinuas: aferências dopaminérgicas. Setas grossas representam a ativação e setas finas a inibição do sinal.

A *substantia nigra* é responsável pela modulação deste circuito e sua degeneração ao longo do curso da doença leva a perda do controle fino sobre a geração do movimento. A doença passa a ser sintomática, apresentando os sintomas motores que caracterizam a DP, quando ocorre a morte de 50 a 70% dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Schnabel 2010). O nome "substância negra" faz referência a coloração escura desta região, decorrente da metabolização de dopamina em neuromelanina (Zucca *et al.* 2014).

I.3. Farmacoterapia e seus efeitos adversos

A farmacoterapia da DP tem como objetivo restabelecer os níveis de dopamina no sistema, visto que a morte dos neurônios nigro-estriatais desregula a liberação deste neurotransmissor no corpo estriado. A dopamina em si não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, por isso administra-se levodopa aos pacientes. Levodopa foi introduzida comercialmente na década de 1960 e tem passagem livre pela barreira. Ela é convertida em dopamina pela enzima dopa-decarboxilase (AADC), restaurando a estimulação do corpo estriado e o controle positivo sobre a geração e a coordenação dos movimentos (DeMaagd & Philip 2015).

Os primeiros anos de terapia são conhecidos como fase de "lua-de-mel". A medicação é tão efetiva em devolver os movimentos e a liberdade para os pacientes a muitos anos imobilizados que eles têm a sensação de estarem curados. Porém, efeitos adversos logo aparecem. Levodopa é uma molécula com meia-vida curta e sua farmacodinâmica não é plenamente conhecida. Isso torna o seu controle uma tarefa complexa (Abbott 2010).

O início do tratamento pode ser marcado por problemas gastrointestinais agudos, tais como náusea e vômito. O trato gastrointestinal possui uma rede neuronal própria, o sistema nervoso entérico, com abundante concentração de neurônios dopaminérgicos. Diversos estudos sugerem que alterações nesses neurônios podem estar relacionadas com o aparecimento dos problemas gastrointestinais decorrentes da administração de levodopa (Pfeiffer 2003; Tse *et al.* 2013; Woitalla *et al.* 2014). Devido à combinação de levodopa com

inibidores periféricos de AADC, antieméticos, e ajustes na dose, o aparecimento de náusea e vômito foi drasticamente reduzido, mas não eliminado (Schapira 2008). Essa complicação pode interferir na absorção de levodopa e a diminuição de efetividade da mesma em seu alvo de ação. Estudos sugerem que distúrbios nessa absorção possam ser uma das causas de outro efeito adverso, conhecido como flutuações da resposta motora (Pfeiffer 2003; Mukherjee *et al.* 2016). As flutuações são divididas em três fenômenos: “wearing-off”, “on-off”, e “no-on”).

Com o uso prolongado da medicação, o período de eficácia terapêutica se reduz e os sintomas motores da DP começam a ressurgir. A essa deterioração de final de dose se dá o nome de fenômeno de “wearing-off” (desaparecimento gradual). À medida que a doença vai progredindo, essas flutuações podem deixar de ser somente no final de dose e ocorrer de forma imprevisível. Os pacientes passam do estado móvel (“on” - sem sintomas motores) para o imóvel (“off” - com sintomas motores) de forma súbita e sem ligação com o tratamento farmacológico. A este fenômeno se dá o nome de “on-off” ou flutuações complexas. Nos estágios mais avançados da doença a medicação pode não apresentar mais ação, deixando os pacientes apenas em estado "off", fenômeno conhecido como "no-on" (Jankovic 2005; Bhidayasiri & Truong 2008).

Aumento de dose e diminuição do intervalo entre as administrações são sugeridos a fim de contornar as flutuações. Porém, com a progressão da degeneração nigroestriatal, o nível de dopamina na fenda sináptica não consegue permanecer estável. O estresse resultante da exposição desregada de dopamina aos seus receptores resulta no aparecimento de discinesia. A discinesia é uma complicação do estado "on" caracterizada por movimentos involuntários anormais e excessivos (Krack *et al.* 1999; Del Sorbo & Albanese 2008). A incidência de flutuações motoras e discinesia é extremamente alta. Aproximadamente 40% dos pacientes em terapia com levodopa desenvolverão essas complicações após uma média de 5 anos de tratamento, havendo relatos desse valor chegar a 90% (Ahlskog & Muentner 2001; Van Gerpen *et al.* 2006).

Os pacientes também podem sofrer com alucinações visuais. Alucinações consistem de percepções espontâneas e aberrantes na ausência de estímulo externo quando o indivíduo se encontra acordado, em estado consciente. As alucinações visuais em pacientes com DP é de curta duração e normalmente envolve visões de seres humanos, animais, prédios e cenários (Barnes & David 2001). Essas alucinações eram raramente descritas em pacientes com DP na era pré-dopaminérgica (Fénelon & Alves 2010). Atualmente 30% dos pacientes relatam esse problema, podendo chegar até 75% em pacientes com mais de 20 anos de doença. Vários estudos sugerem que a estimulação dopaminérgica, o desajuste entre os neurotransmissores, a demência, a depressão severa e o estado de confusão estão envolvidos em sua patogênese. As alucinações visuais na DP é resultado de interações complexas entre fatores farmacológicos e relacionados com a doença e ainda não se conhece os mecanismos neuroquímicos responsáveis pela sua origem (Diederich *et al.* 2009).

Alguns fatores clínicos parecem propiciar o aparecimento dos efeitos adversos da terapia com levodopa, tais como sexo feminino, início precoce da doença, tempo de tratamento com levodopa, tempo de doença, gravidade da doença quando da instituição da terapêutica, e dose usada de levodopa (Rodríguez-Violante *et al.* 2015; Cedarbaum *et al.* 1991; Grandas *et al.* 1999; Schrag & Quinn 2000; Zappia *et al.* 2005; Colombo *et al.* 2015; Bjornestad *et al.* 2016). Uma complexa posologia é utilizada para tentar reduzir os impactos dos efeitos adversos ao paciente. Muitos fármacos foram desenvolvidos e tantos mais estão surgindo. Alguns dos mais utilizados são os inibidores da AADC (tais como a carbidopa e a benzerazida); os inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT) e da monoamina oxidase (MAO), enzimas que metabolizam a dopamina (tais como selegilina e rasagilina); agonistas da dopamina (como a apomorfina) e antiglutamatérgicos (como a amantadina) (Obeso *et al.* 2010; Oertel & Schulz 2016).

I.4. Farmacogenética da doença de Parkinson

Pacientes respondem a tratamentos farmacológicos de maneiras diversas, podendo a mesma posologia ser benéfica, tóxica ou não ter efeito dependendo do indivíduo. Através de uma abordagem gene candidato, a farmacogenética estuda como alterações no genoma modificam a resposta individual aos fármacos. Mudanças na expressão, tradução e função de proteínas que alteram os mecanismo de ação (i. e. farmacodinâmica), bem como na metabolização e no transporte (i. e. farmacocinética) dos fármacos são considerados como sendo uma das principais causas da variabilidade interindividual. Os dois extremos da faixa de variação, os efeitos adversos (e.g. por lenta inativação ou excreção do medicamento) e a refratariedade (e.g. por inativação ou excreção excessivamente rápida do fármaco), são reconhecidos como fenótipos farmacogenéticos. Através da identificação dos fatores genéticos envolvidos, espera-se particularizar a terapia medicamentosa, reduzindo a toxicidade e aumentando os benefícios do tratamento (Davies 2006; Ma & Lu 2011).

A levodopa é convertida em dopamina dentro das fibras dopaminérgicas da *substantia nigra* pela enzima AADC, transcrita pelo gene *DDC*, sendo a dopamina empacotada em vesículas pela proteína transportadora vesicular de monoaminas (VMAT). Inibidores da AADC são comumente utilizados no tratamento dos pacientes com DP e o *DDC* é alvo constante de estudos de terapia gênica (Allen & Feigin 2014). O correto transporte da dopamina é de vital importância não apenas para a sua estocagem e liberação na fenda sináptica, mas também para evitar sua oxidação e minimizar a toxicidade por espécies reativas de oxigênio no citoplasma resultantes de sua metabolização (Lohr & Miller 2014). Duas isoformas de VMAT foram descritas até agora, o VMAT1 e o VMAT2. No sistema nervoso central, VMAT2 (transcrita pelo gene *SLC18A2*) é a responsável pelo transporte de dopamina citoplasmática para dentro de vesículas (Yelin & Schuldiner 2002).

Quando liberada na fenda sináptica, a dopamina faz contato com os seus receptores no estriado, que são divididos em dois grupos. O primeiro é denominado de D1 e é composto pelos receptores D1 e D5. Eles estão

acoplados a proteína $G\alpha$, que ativa a adenilato ciclase e aumenta os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) intracelular. Já o subtipo D2 é composto pelos receptores de dopamina D2, D3 e D4. Eles estão acoplados a proteína $G\alpha_i$, que inibe a adenilato ciclase e diminui os níveis de cAMP intracelular. Os neurônios espinhais médios que expressam seletivamente receptores D1 enviarão sinal pela via direta, já os que expressam seletivamente o D2 enviarão sinal pela via indireta. Apenas de 5 a 15% destes neurônios expressam simultaneamente os dois receptores (Valjent 2009). O receptor D2 é reconhecido como o maior alvo da dopamina no circuito nigroestriatal, sendo o efeito do D1 e D3 moderado e do D4 e D5 mínimo (Missale *et al.* 1998; Rangel-Barajas *et al.* 2015).

Os axônios serotoninérgicos enervam amplamente o estriado, assim como os dopaminérgicos. Sua colocalização permite complexas interações entre os dois sistemas (Wallman *et al.* 2011), tais como interferências na ação da levodopa. Neurônios serotoninérgicos expressam AADC e VMAT2, conseguindo converter a levodopa em dopamina e liberar essa dopamina como um “falso neurotransmissor” (Migueliz *et al.* 2014). Com a morte das fibras dopaminérgicas, a liberação da dopamina por essa via alternativa aumenta de importância, ocorrendo uma liberação descontrolada na fenda sináptica logo após o uso do medicamento. O gene *SLC6A4* codifica o transportador de serotonina (SERT) que recicla a serotonina da fenda sináptica de volta à membrana pré-sináptica. Alguns estudos apontam uma redução dos níveis de SERT no estriado de pacientes com DP (Guttman *et al.* 2007; Politis & Niccolini 2015).

Os receptores A_{2A} de adenosina ($A_{2A}R$), codificados pelo gene *ADORA2A*, se localizam seletivamente nos neurônios do estriado e do globo pálido, com aumento de concentração no putamen de pacientes com DP discinéticos (Schiffmann *et al.* 1991; Svenningsson *et al.* 1997; Calon *et al.* 2004; Mishina *et al.* 2011; Ramlackhansingh *et al.* 2011). Além dessa colocalização, $A_{2A}R$ é capaz de formar heterodímeros com o receptor do tipo D2 de dopamina (DRD2), sendo essa interação já identificada no estriado (Fuxe *et al.* 2015). $A_{2A}R$ estaria modulando a atividade da via indireta e regulando a liberação de glutamato no estriado. Assim, alterações de sua função e

concentração afetariam a execução e planejamento de movimentos. Estudos indicam que o uso de antagonistas do A_{2A}R pode reduzir efeitos adversos induzidos por levodopa (Morelli *et al.* 2012).

O neurotransmissor glutamato é o responsável pelos sinais excitatórios da alça motora e seu papel central na DP vem ganhando importância. Uma das co-medicações mais comumente utilizadas para o controle da discinesia induzida por levodopa é o antagonista glutamatérgico amantadina (Vijayakumar & Jankovic 2016). Dentro da classe dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) existem três famílias. Estudos com agonistas sugerem que a ativação da família III pode aliviar os sintomas motores através da redução da atividade geral da via indireta (Duty 2010). O receptor metabotrópico glutamatérgico 7 (mGluR7) se localiza na membrana pré-sináptica dos gânglios basais. Ele modula negativamente a liberação tanto de glutamato quanto de ácido gama-aminobutírico (GABA) e é reconhecido como um alvo farmacêutico para doenças neurológicas e psiquiátricas (Callaerts-Vegh *et al.* 2006; Pałucha-Poniewiera *et al.* 2008; Li *et al.* 2009; Szczurowska & Mares 2009; Greco *et al.* 2010).

Latrofilina-3 (LPHN3) é uma proteína G acoplada a receptores responsáveis por adesão molecular em sinapses. Ela está envolvida com plasticidade sináptica, orientação axonal e formação de novas sinapses (Lesch *et al.* 2013; O'Sullivan *et al.* 2014). Vários estudos apontam para uma associação da LPHN3 com o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e seu tratamento com metilfenidato (Labbe *et al.* 2012; Bruxel *et al.* 2015). Metilfenidato é um inibidor do transportador de dopamina (DAT) com potencial uso na terapia de pacientes com DP (Auriel *et al.* 2009). Receptores glutamatérgicos e LPHN3 se conectam via SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*), uma proteína estrutural que assegura o correto envio do sinal neuronal. SHANK3 também está envolvida na formação e maturação de espinhos dendríticos (Boeckers *et al.* 2002).

O óxido nítrico (NO) vem ganhando destaque na DP. Ele é formado a partir de uma L-arginina e uma molécula de oxigênio pela ação de três diferentes enzimas altamente homólogas, a óxido nítrico sintetase (NOS)

neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). O NO atua como neuromodulador de neurônios glutamatérgicos, inibidor de sinais gabaérgicos, vaso dilatador e possível mediador entre atividade neuronal e fluxo sanguíneo no cérebro (Džoljić *et al.* 2015). Dependendo da circunstância, o NO pode tanto contribuir para a morte neuronal, quanto ser protetor. Evidências sugerem influência do NO na etiologia da DP e que a inibição de NOS pode ser um fator protetor para a DP e o aparecimento de discinesia (Bortolanza *et al.* 2015).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum com início majoritário na terceira idade. Com a longevidade da população crescendo, a prevalência dessa doença irá aumentar significativamente nas próximas décadas, desafiando a medicina, a saúde pública e a economia. Apesar da DP possuir a terapia mais efetiva dentre as doenças neurodegenerativas, o uso de levodopa pode determinar o aparecimento de efeitos adversos graves, tanto agudos quanto crônicos, na maioria dos pacientes. Essas complicações diminuem a qualidade de vida do paciente e de seus cuidadores, podendo determinar a descontinuidade ou até completa interrupção do tratamento.

O estudo da farmacogenética da DP poderá, além de contribuir para a geração de novas hipóteses sobre a fisiopatologia dos efeitos adversos, levar ao desenvolvimento de testes genéticos que auxiliarão a tomada de decisão na prática clínica. A identificação de associação de variantes genéticas com a resposta à levodopa poderá ser utilizada para definir *a priori* o melhor tratamento farmacológico para cada paciente, evitando-se assim o uso desnecessário de fármacos potencialmente tóxicos e com diferentes efeitos colaterais em pacientes que não se beneficiarão do mesmo.

As agências reguladoras de medicamentos dos Estados Unidos “US Food and Drug Administration (FDA), da Europa “The European Medicines Agency (EMA)” e do Japão “Japan’s Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)” tem incentivado, na última década, a aplicação da farmacogenômica no desenvolvimento de novos medicamentos bem como a sua utilização como critério para a prescrição de fármacos (Maliepaard *et al.* 2013). Os Institutos Nacionais de Saúde dos USA e o Centro para o Avanço da Ciência Translacional consideraram que a implementação da farmacogenômica é um passo essencial para o desenvolvimento de uma medicina personalizada (Collins 2011). Portanto, são objetivos desse projeto identificar se variantes de genes candidatos estão associadas ao aparecimento de efeitos adversos decorrentes do uso de levodopa em pacientes com DP.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Identificar se variantes de genes candidatos estão associados ao aparecimento do efeito adverso agudos de náusea e vômito;

- Identificar se variantes de genes candidatos estão associados ao aparecimento de efeitos crônicos de flutuação motora, discinesia e alucinações visuais.

CAPÍTULO III

Association of DRD2 and DRD3 gene polymorphisms and gastrointestinal symptoms induced by levodopa therapy in Parkinson's disease.

The Pharmacogenomics Journal, 2016. doi: 10.1038/tpj.2016.79. [Epub ahead of print]

CAPÍTULO IV

***Is there a role for ADORA2A polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia
in Parkinson's disease patients?***

Pharmacogenomics, 2015;16(6):573-582. doi: 10.2217/pgs.15.23.

CAPÍTULO V

No association between nine candidate genes with dyskinesia, motor fluctuations and visual hallucinations induced by levodopa in Parkinson's disease patients.

Manuscrito em preparação.

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

Os capítulos III, IV e V abrangem de forma específica a discussão referente aos resultados obtidos no presente trabalho. Assim, essa discussão visa abordar aspectos gerais da relação das variantes genéticas com a ocorrência de efeitos adversos decorrentes do tratamento com levodopa, bem como possíveis formas de continuidade dessa linha de pesquisa.

Levodopa é considerado o fármaco mais efetivo em aliviar os sintomas motores da DP ao restabelecer o aporte dopaminérgico perdido com a morte dos neurônios nigrostriatais (Abbott 2010). A efetividade e tolerância à terapia aumentaram significativamente após a combinação da levodopa com inibidores da AADC, porém efeitos adversos ainda persistem em alta frequência nos pacientes.

Efeitos adversos da terapia medicamentosa são definidos como reações nocivas e involuntárias que ocorrem devido ao uso de fármacos em doses normalmente toleradas pela maioria dos pacientes (World Health Organization 1972). Esses efeitos podem decorrer de múltiplos fatores, tais como o correto conhecimento da atividade farmacológica do composto, interações medicamentosas, toxicidade do fármaco e hipersensibilidade ao mesmo. Os efeitos adversos são causas comuns de morbidade e mortalidade entre pacientes.

Lazarou *et al.* (1998) estimaram uma incidência de efeitos adversos graves de 6.7% e fatais de 0.32% em pacientes estadunidenses hospitalizados. Essa porcentagem de efeitos fatais corresponde a aproximadamente 106.000 mortes anuais, fazendo dessas reações entre a quarta e sexta causa de morte em pacientes hospitalizados neste país, na frente de problemas pulmonares, diabetes mellitus, síndromes de imunodeficiência, pneumonia, acidentes em geral e fatalidades associadas ao trânsito. Mais recentemente, Khan *et al.* (2013) revisaram a literatura considerando pacientes hospitalizados em diferentes países e encontraram valores para o aparecimento de efeitos adversos entre 4 e 30%.

A genética é considerada um fator importante para a ocorrência desses problemas. Variações em genes de metabolização ou em alvos do fármaco podem alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica dos mesmos. A influência

da genética e sua forma de interferência ainda não estão totalmente esclarecidas e variam muito entre as classes de medicamentos. A farmacogenética tenta desvendar o papel de variantes gênicas, tais como polimorfismos, mutações, variações no número de cópias (CNV), na resposta a terapia medicamentosa (Ma & Lu 2011). Variantes gênicas podem estar relacionadas às modificações na metabolização, concentração e eliminação do fármaco em seu sítio de ação, bem como à sensibilidade dos receptores ao princípio ativo. Na DP, estima-se que a grande maioria dos pacientes desenvolverá algum tipo de reação adversa à terapia dopaminérgica (Schumacher-Schuh *et al.* 2014a). No presente estudo, 25% dos pacientes apresentaram problemas gastrointestinais agudos, tais como náusea e vômito, 25% apresentaram alucinações visuais, 44% apresentaram discinesia e 74% apresentaram flutuações motoras.

Recentemente disfunções gastrointestinais ganharam maior importância para o entendimento da etiologia da DP. Evidências apontam o trato gastrointestinal como o local de início da agregação de α -sinucleína, proteína predominante nos corpúsculos de Lewis, que posteriormente migraria para o sistema nervoso central (Mukherjee *et al.* 2016). Especula-se que disfunções no trato gastrointestinal poderiam ser utilizadas como um marcador pré-sintomático da doença. Além disso, a própria levodopa pode ser a causa dessas disfunções.

O sistema nervoso central, autonômico e entérico está envolvido no controle das funções gastrointestinais. Parte da levodopa é convertida em dopamina ainda no trato, por mais que inibidores da AADC façam parte da terapia. O aumento repentino de dopamina desregula receptores dopaminérgicos levando à perda da peristalse, o que provoca diminuição da motilidade gástrica, dor abdominal, náusea e vômito (Hardoff *et al.* 2001; Li *et al.* 2006). A dopamina também estimula os receptores dopaminérgicos na área postrema, induzindo náusea e vômito (Sanger & Andrews 2006). No capítulo III relatamos uma associação entre polimorfismos potencialmente funcionais dos genes *DRD2* e *DRD3* com a ocorrência dos sintomas gastrointestinais de náusea e vômito em pacientes com a DP. A náusea e o vômito relatados por esses pacientes são predominantemente agudos. Modificações na posologia juntamente com uma

adaptação do organismo aos novos níveis gastrointestinais de dopamina diminuem, muitas vezes cessando, os sintomas.

A gastroparesia, que consiste de uma lentidão do esvaziamento do estômago, pode estar relacionada ao aparecimento de flutuações motoras devido a uma redução na absorção da levodopa (Pfeiffer 2003; Mukherjee *et al.* 2016). Para contornar o aumento dos períodos em que o paciente não tem benefício da terapia, as doses de levodopa são elevadas, bem como o número de tomadas por dia. Como a terapia dada aos pacientes não cessa a degeneração nigroestriatal, a contínua perda neuronal aumenta o impacto das concentrações de levodopa que chegam ao seu local de ação.

A discinesia é um efeito crônico derivado das oscilações abruptas de dopamina no sistema (Van Gerpen *et al.* 2006). No capítulo IV descrevemos uma associação entre dois polimorfismos na região promotora do gene *ADORA2A* com discinesia, mas não com flutuações motoras, em pacientes com a DP. Receptores $A_{2A}R$ influenciam de forma negativa a atividade dos receptores DRD2, principal receptor dopaminérgico da via indireta da alça motora (Fuxe *et al.* 2015). Com base em estudos funcionais *in silico*, a presença do alelo C do polimorfismo rs2298383 estaria associada com uma redução da expressão do *ADORA2A* (Hohoff *et al.* 2010). Essa redução poderia ter impacto na quantidade de receptores D2 inibidos, dificultando o aparecimento de discinesia. Em estudo anterior do nosso grupo, a associação de um haplótipo entre o gene *DRD2* e *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*) com discinesia na mesma amostra foi identificada (Rieck *et al.* 2012). Os achados com o *ADORA2A* corroboram com a hipótese do receptor D2 ser peça chave na ocorrência de discinesia.

No capítulo V abordou-se o estudo de genes candidatos envolvidos na farmacodinâmica da levodopa, bem como na sinalização glutamatérgica e plasticidade sináptica. Foram testadas a associação dos genes *DDC*, *SLC18A2*, *DRD3*, *SLC6A4*, *GRM7*, *LPHN3*, *SHANK3*, *NOS1* e *NOS3* com os efeitos crônicos de discinesia e alucinações, porém nenhuma associação positiva foi encontrada. A patofisiologia das alucinações visuais ainda não é bem entendida.

Uma das hipóteses sugere que seu aparecimento possa estar relacionado a estados de hiperativação dopaminérgica em estágios avançados da doença (Borgemeester *et al.* 2016). Recentemente, Ferrari *et al.* (2016) sugeriram que, no caso da DP, a associação seria com o DRD1 via alça motora direta.

Os resultados do presente trabalho se somam aos previamente descritos por nosso grupo. Como já mencionada, uma associação do DRD2/ANKK1 com discinesia já foi descrita (Rieck *et al.* 2012). Schumacher-Schuh *et al.* (2013) verificaram a associação de um polimorfismo na região promotora do transportador de dopamina (DAT) com alucinações visuais e de um VNTR na região 3' desse mesmo gene com a dose de levodopa administrada. Também foi observado que o gene HOMER1 (*homer scaffolding protein 1*), envolvido na transdução do sinal glutamatérgico e plasticidade celular, aparenta ter um efeito protetor contra efeitos adversos da levodopa nesses pacientes (Schumacher-Schuh *et al.* 2014b).

Atualmente, os dados disponíveis sobre os fatores farmacogenéticos ainda são incompletos para a DP, não impactando em nenhuma decisão clínica. Em recente revisão, Schumacher-Schuh *et al.* (2014a) identificaram 56 artigos referentes a farmacogenética da DP, dos quais 30% estudaram discinesias, 22% alucinações e 13% flutuações motoras. A maioria dos genes estudados está diretamente relacionada ao tratamento dopaminérgico, e todas as investigações apresentaram resultados conflitantes. Tamanhos amostrais pequenos, diferentes desenhos experimentais, variações étnicas e diferentes definições e modo de coleta do desfecho estudado podem estar contribuindo para essas discrepâncias.

A amostra utilizada no presente estudo foi coletada durante um período de oito anos. Neste período conseguimos recrutar 223 pacientes, um número equivalente ao apresentado por outros grupos no mundo. Estudos multicêntricos e/ou a criação de biobancos poderiam auxiliar no aumento do número amostral.

O desenho experimental escolhido foi o transversal, por questões logísticas. Pela mesma razão, a maioria dos estudos também utiliza esse desenho. Como a DP é progressiva, estudos longitudinais poderiam trazer resultados mais robustos. No entanto, esse tipo de estudo levaria muitos anos

para ser concluído. Porém, estudos transversais podem ser de grande valia por estarem mais próximos da realidade assistencial. Outro ponto que precisa ser melhor discutido é a falta de definições precisas na literatura dos fenótipos estudados e dos instrumentos utilizados para suas avaliações. Este fato limita a comparação direta entre os estudos dificultando a solidez dos achados.

Considerando que a ocorrência de efeitos adversos são características multifatoriais, confundidores biológicos, demográficos e clínicos foram incluídos nas análises. Essa abordagem permitiu mostrar que nenhum gene isolado explica uma grande proporção da variabilidade observada. Covariáveis precisaram ser incluídas no modelo em todas as análises. Esse fato é esperado em características multifatoriais, o que dificulta ainda mais a identificação de genes de pequeno efeito em amostras não muito grandes e, conseqüentemente, a sua aplicação como biomarcadores.

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo. Os ameríndios ocupavam o território quando os portugueses chegaram em 1500 e colonizaram o país. Posteriormente entre os séculos XVI e XIX, africanos foram trazidos ao Brasil como escravos. Além dos portugueses e africanos, outras ondas migratórias ocorreram nos séculos XIX e XX, principalmente partindo da Itália, Alemanha e Espanha (Callegari-Jacques *et al.* 2003). Todos esses eventos migratórios contribuíram para a formação de uma população multiétnica e altamente miscigenada.

Essa heterogeneidade foi documentada em vários estudos que demonstraram um padrão triétnico (europeus, africanos e ameríndios) usando marcadores uniparentais ou autossômicos, embora não uniforme na população brasileira. No nordeste do Brasil, a contribuição africana é alta, no norte, a contribuição de ameríndios é mais pronunciada e no sul do país os europeus são predominantes (Santos *et al.* 2010; Pena *et al.* 2011). Para minimizar os efeitos da estrutura populacional, visto que a variação étnica tem papel determinante na frequência alélica dos genes candidatos, todas as análises foram controladas por etnia avaliada por autodeclaração dos pacientes mesmo que não tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos.

Um ponto ainda inexplorado é a importância de variantes raras para o aparecimento do fenótipo. Em recente estudo, Wright *et al.* (2016) utilizaram dados do *1000 Genomes Project* para estudar 120 farmacogenes. Das variantes encontradas (total de 12084 variantes em 2504 indivíduos), 90% foram classificadas como raras, sendo que modificações que poderiam interferir nas proteínas foram mais abundantes neste grupo do que no das variantes comuns. Painéis para sequenciamento de nova geração, exomas e GWAS (*Genome-wide association study*) seriam ideais para explorar conjuntamente variantes raras e comuns. Outra fragilidade é a funcionalidade das variantes. Os estudos de funcionalidade são raros ou inexistentes, apesar de serem imprescindíveis para entendermos seus impactos nos processos biológicos e na formação de hipóteses.

No anexo desta tese, apresentamos resultados preliminares obtidos em parceria com a Eberhard Karls University of Tübingen, Alemanha, durante período sanduíche desse doutorado com financiamento do CNPq. Foi desenvolvido um painel para sequenciamento de nova geração para o estudo de 31 genes candidatos. A avaliação preliminar indica uma associação de variantes raras e comuns combinadas dos genes *GRIN1* e *GRIN2B*, bem como apenas de variantes raras dos genes *TH* e *ADORA2A* com o aparecimento de discinesia. Além disso, 34 mutações identificadas não são encontradas nos bancos de dados dos projetos *1000 Genomes* e *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*.

O conhecimento sobre a farmacogenética da DP está lentamente crescendo apesar de todas as limitações descritas acima, com alguns genes se destacando na literatura. A introdução da levodopa no tratamento da DP impactou de forma profunda a qualidade de vida dos pacientes. Todavia, seu uso leva ao aparecimento de efeitos adversos tanto agudos quanto crônicos. O presente trabalho contribuiu na geração de novas hipóteses de associações. Assim, adicionamos peças para o entendimento de como a genética pode influenciar na resposta individual ao tratamento farmacológico na DP.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott A (2010) Levodopa: the story so far. *Nature* 466:S6-7. doi: 10.1038/466S6a
- 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.
- Allen PJ and Feigin A (2014) Gene-based therapies in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 11:60–67. doi: 10.1007/s13311-013-0233-2
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M and Larsen JP (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*. pp 18–32
- Auriel E, Hausdorff JM and Giladi N (2009) Methylphenidate for the treatment of Parkinson disease and other neurological disorders. *Clin Neuropharmacol* 32:75–81. doi: 10.1097/WNF.0B013E318170576C
- Barnes J and David AS (2001) Visual hallucinations in Parkinson's disease: a review and phenomenological survey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:727–733.
- Bhidayasiri R and Truong DD (2008) Motor complications in Parkinson disease: clinical manifestations and management. *J Neurol Sci* 266:204–215. doi: 10.1016/j.jns.2007.08.028
- Bjornestad A, Forsaa EB, Pedersen KF, Tysnes O-B, Larsen JP and Alves G (2016) Risk and course of motor complications in a population-based incident Parkinson's disease cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 22:48–53. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.11.007
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR and Gundelfinger ED (2002) ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem* 81:903–910.
- Borgemeester RWK, Lees AJ and van Laar T (2016) Parkinson's disease, visual hallucinations and apomorphine: A review of the available evidence. *Parkinsonism Relat Disord* 27:35–40. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.04.023

Bortolanza M, Padovan-Neto FE, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, Dos Santos-Pereira M, Mitkovski M, Raisman-Vozari R and Del-Bel E (2015) Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:1–13. doi: 10.1098/rstb.2014.0190

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.

Bruxel EM, Salatino-Oliveira A, Akutagava-Martins GC, Tovo-Rodrigues L, Genro JP, Zeni CP, Polanczyk G V, Chazan R, Schmitz M, Arcos-Burgos M et al. (2015) LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: a susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes Brain Behav* 14:419–427. doi: 10.1111/gbb.12224

Callaerts-Vegh Z, Beckers T, Ball SM, Baeyens F, Callaerts PF, Cryan JF, Molnar E and D'Hooge R (2006) Concomitant deficits in working memory and fear extinction are functionally dissociated from reduced anxiety in metabotropic glutamate receptor 7-deficient mice. *J Neurosci* 26:6573–6582. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1497-06.2006

Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME and Hutz MH (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824–834. doi: 10.1002/ajhb.10217

Calon F, Dridi M, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Rajput AH and Di Paolo T (2004) Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 127:1075–1084. doi: 10.1093/brain/awh128

Cedarbaum JM, Gandy SE and McDowell FH (1991) "Early" initiation of levodopa treatment does not promote the development of motor response fluctuations, dyskinesias, or dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 41:622–629.

Collins FS (2011) Reengineering translational science: the time is right. *Sci Transl Med* 3:90cm17. doi: 10.1126/scitranslmed.3002747

Colombo D, Abbruzzese G, Antonini A, Barone P, Bellia G, Franconi F, Simoni L, Attar M, Zagni E, Haggiag S et al. (2015) The “gender factor” in wearing-off among patients with Parkinson’s disease: a post hoc analysis of DEEP study. *ScientificWorldJournal* 2015:787451. doi: 10.1155/2015/787451

Davies SM (2006) Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: are we there yet? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 111–117. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.111

Del Sorbo F and Albanese A (2008) Levodopa-induced dyskinesias and their management. *J Neurol* 32–41. doi: 10.1007/s00415-008-4006-5

DeMaagd G and Philip A (2015) Part 2: Introduction to the Pharmacotherapy of Parkinson’s Disease, With a Focus on the Use of Dopaminergic Agents. *P T* 40:590–600.

Diederich NJ, Fénelon G, Stebbins G and Goetz CG (2009) Hallucinations in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 5:331–342. doi: 10.1038/nrneurol.2009.62

Duty S (2010) Therapeutic potential of targeting group III metabotropic glutamate receptors in the treatment of Parkinson’s disease. *Br J Pharmacol* 161:271–287. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00882.x

Džoljić E, Grbatinić I and Kostić V (2015) Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol* 30:159–163. doi: 10.11138/fneur/2015.30.3.159

Fénelon G and Alves G (2010) Epidemiology of psychosis in Parkinson’s disease. *J Neurol Sci* 289:12–17. doi: 10.1016/j.jns.2009.08.014

Ferrari M, Comi C, Marino F, Magistrelli L, De Marchi F, Cantello R, Riboldazzi G, Bono G and Cosentino M (2016) Polymorphisms of dopamine receptor genes and risk of visual hallucinations in Parkinson’s patients. *Eur J Clin Pharmacol* 72:1335–1341. doi: 10.1007/s00228-016-2111-4

Findley LJ (2007) The economic impact of Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl:S8-12. doi: 10.1016/j.parkreldis.2007.06.003

Fuxe K, Guidolin D, Agnati LF and Borroto-Escuela DO (2015) Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* 19:377–398. doi: 10.1517/14728222.2014.981529

Gelb DJ, Oliver E and Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 56:33–39.

Grandas F, Galiano ML and Taberner C (1999) Risk factors for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol* 246:1127–1133.

Greco B, Lopez S, van der Putten H, Flor PJ and Amalric M (2010) Metabotropic glutamate 7 receptor subtype modulates motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 332:1064–1071. doi: 10.1124/jpet.109.162115

Guttman M, Boileau I, Warsh J, Saint-Cyr JA, Ginovart N, McCluskey T, Houle S, Wilson A, Mundo E, Rusjan P et al. (2007) Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 14:523–528. doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.01727.x

Hardoff R, Sula M, Tamir A, Soil A, Front A, Badarna S, Honigman S and Giladi N (2001) Gastric emptying time and gastric motility in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 16:1041–1047.

Hohoff C, Mullings EL, Heatherley S V, Freitag CM, Neumann LC, Domschke K, Krakowitzky P, Rothermundt M, Keck ME, Erhardt A et al. (2010) Adenosine A(2A) receptor gene: evidence for association of risk variants with panic disorder and anxious personality. *J Psychiatr Res* 44:930–937. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.02.006

Huse DM, Schulman K, Orsini L, Castelli-Haley J, Kennedy S and Lenhart G (2005) Burden of illness in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:1449–1454. doi: 10.1002/mds.20609

Jankovic J (2005) Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov Disord* S11-16. doi: 10.1002/mds.20458

Khan L (2013) Comparative epidemiology of hospital-acquired adverse drug reactions in adults and children and their impact on cost and hospital stay - a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 69: 1985-1996.

Krack P, Pollak P, Limousin P, Benazzouz A, Deuschl G and Benabid AL (1999) From off-period dystonia to peak-dose chorea. The clinical spectrum of varying subthalamic nucleus activity. *Brain* 1133–1146. doi: doi.org/10.1093/brain/122.6.1133

Labbe A, Liu A, Atherton J, Gizenko N, Fortier M-È, Sengupta SM and Ridha J (2012) Refining psychiatric phenotypes for response to treatment: contribution of LPHN3 in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B:776–785. doi: 10.1002/ajmg.b.32083

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279:1200-1205.

Lesch KP, Merker S, Reif A and Novak M (2013) Dances with black widow spiders: dysregulation of glutamate signalling enters centre stage in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:479–491. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.07.013

Lewis SJG, Caldwell MA and Barker RA (2003) Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Rev Mol Med* 5:1–20. doi: doi:10.1017/S1462399403006008

Li X, Li J, Peng X-Q, Spiller K, Gardner EL and Xi Z-X (2009) Metabotropic glutamate receptor 7 modulates the rewarding effects of cocaine in rats: involvement of a ventral pallidal GABAergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 34:1783–1796. doi: 10.1038/npp.2008.236

Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E and Gershon MD (2006) Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci* 26:2798–2807. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006

Lohr KM and Miller GW (2014) VMAT2 and Parkinson's disease: harnessing the dopamine vesicle. *Expert Rev Neurother* 14:1115–1117. doi: 10.1586/14737175.2014.960399

Ma Q and Lu AYH (2011) Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev* 63:437–459. doi: 10.1124/pr.110.003533

Maliepaard M, Nofziger C, Papaluca M, Zineh I, Uyama Y, Prasad K, Grimstein C, Pacanowski M, Ehmann F, Dossena S et al. (2013) Pharmacogenetics in the evaluation of new drugs: a multiregional regulatory perspective. *Nat Rev Drug Discov* 12:103–115. doi: 10.1038/nrd3931

Migueluez C, Morera-Herreras T, Torrecilla M, Ruiz-Ortega JA and Ugedo L (2014) Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease. *Front Neural Circuits* 8:21. doi: 10.3389/fncir.2014.00021

Mishina M, Ishiwata K, Naganawa M, Kimura Y, Kitamura S, Suzuki M, Hashimoto M, Ishibashi K, Oda K, Sakata M et al. (2011) Adenosine A_{2A} receptors measured with [¹¹C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6:e17338. doi: 10.1371/journal.pone.0017338

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225.

Morelli M, Blandini F, Simola N and Hauser RA (2012) A_{2A} Receptor Antagonism and Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2012:489853. doi: 10.1155/2012/489853

Mukherjee A, Biswas A and Das SK (2016) Gut dysfunction in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol* 22:5742–5752. doi: 10.3748/wjg.v22.i25.5742

O'Sullivan ML, Martini F, von Daake S, Comoletti D and Ghosh A (2014) LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Dev* 9:7. doi: 10.1186/1749-8104-9-7

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH V and Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16:653–661. doi: 10.1038/nm.2165

Oertel W and Schulz JB (2016) Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem* 139(S1):325–337. doi: 10.1111/jnc.13750

Pałucha-Poniewiera A, Kłodzińska A, Stachowicz K, Tokarski K, Hess G, Schann S, Frauli M, Neuville P and Pilc A (2008) Peripheral administration of group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts potential antipsychotic effects in rodents. *Neuropharmacology* 55:517–524. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.033

Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO et al. (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6:e17063. doi: 10.1371/journal.pone.0017063

Pfeiffer RF (2003) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2:107–116.

Politis M and Niccolini F (2015) Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 277:136–145. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.037

Ramlackhansingh AF, Bose SK, Ahmed I, Turkheimer FE, Pavese N and Brooks DJ (2011) Adenosine 2A receptor availability in dyskinetic and nondyskinetic patients with Parkinson disease. *Neurology* 76:1811–1816. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821ccce4

Rangel-Barajas C, Coronel I and Florán B (2015) Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis* 6:349–368. doi: 10.14336/AD.2015.0330

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. doi: doi: 10.2217/pgs.12.149.

Rodríguez-Violante M , Velázquez-Osuna S , Cervantes-Arriaga A , Corona-Vázquez T and de la Fuente -Sandoval C (2015) Prevalence, associated factors and phenomenology of psychosis in patients with Parkinson's disease . *Gac médica México* 151:169–175.

Sanger GJ and Andrews PLR (2006) Treatment of nausea and vomiting: gaps in our knowledge. *Auton Neurosci* 129:3–16. doi: 10.1016/j.autneu.2006.07.009

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. doi: 10.1002/humu.21159

Schapira AH V (2008) The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S515-520. doi: 10.1002/mds.22146

Schiffmann SN, Libert F, Vassart G and Vanderhaeghen JJ (1991) Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci Lett* 130:177–181.

Schnabel J (2010) Secrets of the shaking palsy. *Nature* 466:S2-5. doi: 10.1038/466S2b

Schrag A and Quinn N (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 229:2297–2305.

Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Rieder CR and Hutz MH (2013) Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 1–8. doi: 10.1017/S1461145712001666

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

1271. doi: 10.2217/pgs.14.93

Schumacher-Schuh AF, Altmann V, Rieck M, Tovo-Rodrigues L, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Medeiros MS, Rieder CRM and Hutz MH (2014b) Association of common genetic variants of HOMER1 gene with levodopa adverse effects in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics J* 14:289–294.

Spillantini MG and Goedert M (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 920:16–27.

Svenningsson P, Hall H, Sedvall G and Fredholm BB (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* 27:322–335. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199712)27:4<322::AID-SYN6>3.0.CO;2-E

Szczurowska E and Mares P (2009) Controversial action of positive modulator of subtype 7 of metabotropic glutamate receptors AMN082 on cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *Eur J Pharmacol* 623:37–40. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.009

Tse GG, Kim BB, McMurtray AM and Nakamoto BK (2013) Case of levodopa toxicity from ingestion of *Mucuna gigantea*. *Hawaii J Med Public Health* 72:157–160.

Trends Neurosci. 2009 Oct;32(10):538-47. doi: 10.1016/j.tins.2009.06.005. Epub 2009 Sep 16.

Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32:538-547.

Van Gerpen JA, Kumar N, Bower JH, Weigand S and Ahlskog JE (2006) Levodopa-associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Arch Neurol* 63:205–209. doi: 10.1001/archneur.63.2.205

Vijayakumar D and Jankovic J (2016) Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. *Drugs* 76:759–777. doi: 10.1007/s40265-016-0566-3

Wallman M-J, Gagnon D and Parent M (2011) Serotonin innervation of human basal ganglia. *Eur J Neurosci* 33:1519–1532. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07621.x

Whetten-Goldstein K, Sloan F, Kulas E, Cutson T and Schenkman M (1997) The burden of Parkinson's disease on society, family, and the individual. *J Am Geriatr Soc* 45:844–849.

Woitalla D, Kassubek J, Timmermann L, Lauterbach T, Berkels R, Grieger F and Müller T (2014) Reduction of gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease after a switch from oral therapy to rotigotine transdermal patch: A non-interventional prospective multicenter trial. *Parkinsonism Relat Disord* 21:199–204. doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.11.024

World Health Organization (1972) International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting. *World Health Organ Tech Rep Ser* 498:1–25.

Wright GEB, Carleton B, Hayden MR and Ross CJD (2016) The global spectrum of protein-coding pharmacogenomic diversity. *Pharmacogenomics J* [Epub ahead of print]. doi: 10.1038/tpj.2016.77

Yelin R and Schuldiner S (2002) Vesicular Neurotransmitter Transporters. 313–354. doi: 10.1007/978-1-59259-158-9_9

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. doi: 10.1001/archneur.62.4.601

Zucca FA, Basso E, Cupaioli FA, Ferrari E, Sulzer D, Casella L and Zecca L (2014) Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox Res* 25:13–23. doi: 10.1007/s12640-013-9435-y

ANEXO
