**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

**Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de
discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson**

**Ribeirão Preto – SP
2017**

BRUNO LOPES DOS SANTOS

Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson

Tese apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Neurologia Clínica

Área de Concentração: Neurologia / Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Vitor Tumas

**Ribeirão Preto – SP
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Bruno Lopes

Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson.

Ribeirão Preto, 2017.

122p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia / Neurociências.

Orientador: Tumas, Vitor.

1. Doença de Parkinson, 2. L-DOPA, 3. Discinesias, 4. Fatores de Risco, 5. Polimorfismos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Lopes dos Santos

Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson.

Tese apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Neurologia Clínica

Área de Concentração: Neurologia / Neurociências

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vitor Tumas
Instituição: FMRP-USP
Assinatura:

Profa. Dra. Elaine Del BelBelluz Guimarães
Instituição: FMRP-USP
Assinatura:

Prof. Dr. Wilson Marques Junior
Instituição: FMRP-USP
Assinatura:

Prof. Dr. Ignacio Fernandez Mata
Instituição: Universidade de Washington (E.U.A.)
Assinatura:

Prof. Dr. Artur Francisco Schumacher Schuh
Instituição: UFRGS
Assinatura:

DEDICATÓRIA

À Balbina, minha avó,
que partiu deste mundo
sem a minha presença.
Perdoe-me, onde estiver.

Às pessoas portadoras da doença de Parkinson,
principalmente àquelas que depositam suas confianças e esperanças em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Altíssimo, Bendito Seja, por manter minhas forças em todo este processo. E por sempre me permitir voltar ao lar em segurança.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Tumas, por todos os incentivos e ajudas que me fizeram chegar até este ponto da carreira. Creio que estes quase 10 anos de convívio contribuíram para que nossa relação de orientador e orientado evoluir para a de mentor e discípulo.

Agradeço a minha mãe, meu pai, minha irmã e minha tia por uma vida de inteira de amor e dedicação total em prol do meu futuro. Não tenho como expressar a gratidão em palavras. Prefiro traduzi-la em boas ações, para vocês e para toda a sociedade.

Agradeço à minha esposa, Edieny, arquiteta da minha vida. O que seria de mim sem você, meu amor? Mais que tudo, peço perdão por ter que lhe abandonar tantas vezes, para que este trabalho fosse concluído.

Não posso deixar de agradecer ao meu irmão de Neurologia e de alma, André Clériston, por ter me recebido em Ribeirão todos estes anos e por ser meu amigo e confidente.

Agradeço à minha co-orientadora, Profa. Dra. Elaine Del Bel, que persistiu a me ensinar a necessidade de sermos rígidos e firmes na execução da boa ciência.

Agradeço aos meus bons amigos do Setor de Distúrbios de Movimento do HCFMRP-USP: Daniel Sabino, Manuelina Macruz, Ângela Pimentel, Nathália Novaretti e Larissa Serveli. Sem vocês, este trabalho simplesmente não aconteceria.

Agradeço também a todos os residentes de Neurologia do HCFMRP-USP que, em quase 6 anos, estiveram envolvidos com a execução do projeto LARGE-PD.

Agradeço aos Professores Vanderci Borges e Henrique Ballalai Ferraz pela ótima recepção na Escola Paulista de Medicina, e por permitirem que eu analisasse os dados advindos dos pacientes desta escola.

Agradeço à *Movement Disorders Society* pela bolsa que me concedeu para realização do estágio em Seattle, WA, E.U.A.

Agradeço profundamente ao Prof. Dr. Ignacio Mata e ao Prof. Dr. Cyrus Zabetian, ambos da Universidade de Washington (E.U.A.), primeiramente pela fantástica iniciativa de criar o projeto LARGE-PD, e também por me receberem em Seattle para realização dos estudos genéticos pertinentes a esta dissertação. Que os frutos desta cooperação internacional continuem a florescer, pois esta é a maneira certa de se fazer Ciência no século XXI.

Assim como escrevi na dissertação de mestrado, este trabalho é a soma da obra de muitas pessoas. Eu apenas canalizei este esforço. Porém, diferente do mestrado, minhas condições de trabalho foram mais adversas, principalmente no que tange a vida dupla em Ribeirão Preto e em Belém. Envolveu suor, sangue (literalmente) e lágrimas. Posso dizer que dependi muito mais de ajuda neste trabalho que no anterior. Por isso, se eventualmente me esqueci de agradecer a alguém, sinta-se plenamente abraçado por mim.

SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. DOENÇA DE PARKINSON: ASPECTOS GERAIS.....	16
1.2. O SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL E O PAPEL DA L-DOPA NA DOENÇA DE PARKINSON.....	17
1.3. FISIOPATOLOGIA DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	21
1.3.1. O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	22
1.3.1.1. MECANISMOS PRÉ-SINÁPTICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	22
1.3.1.2. MECANISMOS PÓS-SINÁPTICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	24
1.3.2. O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	26
1.3.3. O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	27
1.3.4. O PAPEL DA ADENOSINA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	27
1.3.5. O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO NITRÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	28
1.3.6. O PAPEL DOS ENDOCANABINOIDES NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	29
1.4. DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	30
1.4.1. AS PRIMEIRAS DESCRIÇÕES.....	30
1.4.2. ASPECTOS FENOMENOLÓGICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA....	31
1.4.3. EPIDEMIOLOGIA DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	33
1.4.4. IMPACTOS FUNCIONAIS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	34
1.4.5. ATUAL ESTADO DO TRATAMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA..	37
1.5. ESTRATÉGIAS DE PREDIÇÃO DO SURGIMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	38
1.5.1. FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA – REVISÃO SISTEMÁTICA.....	38
1.5.2. FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA – REVISÃO SISTEMÁTICA.....	41
1.5.2.1. GENE <i>COMT</i> – SNP rs4680.....	46
1.5.2.2. GENES <i>DRD2/ANKK1</i> – SNP rs1800497 (Taq1A).....	47
1.5.2.3. GENE <i>DRD3</i> – SNP rs6280.....	48

1.5.2.4. GENE <i>DAT1</i> – SNP rs393795.....	48
1.5.2.5. GENE <i>MAOB</i> – SNP rs1799836.....	49
1.5.2.6. GENE <i>BDNF</i> – SNP rs6265.....	50
1.5.2.7. GENE <i>ADORA2A</i> – SNP rs2298383.....	51
1.5.2.8. GENE <i>NOS1</i> – SNP rs2682826.....	51
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1. CASUÍSTICA.....	54
3.2. COLETA DE DADOS.....	54
3.3. SELEÇÃO DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	55
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA.....	56
3.5. GENOTIPAGEM.....	56
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3.6.1. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	57
3.6.2. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	59
4.1.1. CASUÍSTICA.....	59
4.1.2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	60
4.1.3. ANÁLISE UNIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	62
4.1.4. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	63
4.1.5. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	64
4.2. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	67
4.2.1. DADOS DA GENOTIPAGEM.....	67
4.2.2. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS.....	69
4.2.3. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE A FREQUÊNCIA DIÁRIA DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS.....	71
4.2.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE O IMPACTO FUNCIONAL DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS.....	73
4.2.5. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DO SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E O POLIMORFISMO rs1799836 DO GENE <i>MAOB</i>	75

5. DISCUSSÃO.....	76
5.1. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	76
5.1.1. CASUÍSTICA.....	76
5.1.2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	77
5.1.3. ANÁLISES UNIVARIADAS DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	78
5.1.4. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	79
5.1.5. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	84
5.2. ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA.....	85
5.2.1. DADOS DA GENOTIPAGEM.....	85
5.2.2. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS.....	87
5.2.3. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE A FREQUÊNCIA DIÁRIA E O IMPACTO FUNCIONAL DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS.....	88
5.2.4. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DO SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E O POLIMORFISMO rs1799836 DO GENE <i>MAOB</i>	89
6. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	106

RESUMO

dos Santos, BL. Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum do mundo, e seu tratamento atual se baseia principalmente no uso de medicações que facilitam a transmissão dopaminérgica nos núcleos da base. A L-DOPA é a principal medicação usada no tratamento da DP, contudo seu uso crônico está associado ao surgimento de complicações motoras, como as discinesias induzidas por L-DOPA (DIL). As DIL ocorrem em cerca de 50% dos pacientes com DP que usaram L-DOPA por cerca de 4 a 6 anos, e podem causar uma série de impactos negativos aos pacientes. Pela incapacidade adicional que esta complicação traz aos pacientes com DP, a definição de fatores que possam prever o surgimento das DIL é de importância direta para o clínico que prescreve L-DOPA rotineiramente. O objetivo deste estudo foi determinar os principais fatores de risco clínicos e genéticos para o desenvolvimento de DIL em uma casuística de pacientes brasileiros com DP. Um estudo transversal foi realizado em pacientes brasileiros de dois centros (Ribeirão Preto e São Paulo) como parte do projeto “*Latin American Research Consortium on the Genetics of PD*” (LARGE-PD), incluindo apenas pacientes com DP e em uso de L-DOPA. A avaliação foi baseada em um exame neurológico completo e em uma entrevista semi-estruturada feita por um médico neurologista especialista em Distúrbios de Movimentos. A presença de DIL foi considerada se a pontuação fosse ≥ 1 no item 32 da Parte IV na MDS-UPDRS. Baseados em estudos prévios, nós escolhemos oito polimorfismos tipo *single nucleotide polymorphism* (SNP) nestes genes: *COMT*, *MAOB*, *ANKK1*, *DRD3*, *DAT1*, *BDNF*, *ADORA2A* and *NOS1*. A genotipagem foi realizada através de ensaios TaqMan SNP. Foram realizados modelos de regressão logística e análises de sobrevivência para identificarmos os fatores de risco clínicos e genéticos associados ao surgimento de DIL. Ao todo, foram analisados 199 pacientes (sexo masculino – 59%; idade média 61.8 anos), sendo 96 indivíduos (48.2%) com DIL. Através de um modelo de regressão logística multivariado com 7 variáveis independentes, o fenótipo clínico motor do tipo *postural instability with gait disorder* (PIGD) (OR 0.17, IC 95% 0.07-0.39; $p < 0.001$), longos períodos de tratamento com L-DOPA (OR 1.31, IC 95% 1.17-1.47; $p < 0.001$), altas doses diárias equivalentes de L-DOPA (OR 1.00, IC 95% 1.000-1.002; $p = 0.04$) e a início precoce dos sintomas da

DP (OR 1.04, IC 95% 1.01-1.07; $p = 0.009$) foram os fatores de risco clínicos mais associados ao surgimento de DIL. Dentre os fatores de risco genéticos, apenas o alelo T do SNP rs1799836 no gene da *MAOB* esteve associado ao aumento na chance de surgimento de DIL (OR 1.51, IC 95% 1.00-2.28; $p = 0.05$). Nossos resultados mostraram que a predição de surgimento de DIL em pacientes com DP em uso de L-DOPA pode ser feita através de alguns fatores de risco clínicos (fenótipo clínico motor, duração do tratamento com L-DOPA, dose diária equivalente de L-DOPA e idade de início de sintomas) e genéticos, como o SNPrs1799836 no gene da *MAOB*. Novos estudos com amostras maiores e desenhos prospectivos longitudinais são necessários para se explorar a associação entre estes preditores e o surgimento de DIL.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson, L-DOPA, discinesia, fatores de risco, polimorfismos.

ABSTRACT

dos Santos, BL. Analysis of clinical and genetic predictors for the onset of L-DOPA-induced dyskinesias in Parkinson's disease. 2017. Análise de preditores clínicos e genéticos para o surgimento de discinesias induzidas por L-DOPA na doença de Parkinson. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the world, and its treatment is mainly based on drugs involved on dopaminergic neurotransmission in basal ganglia. L-DOPA is the major medication used on the management of PD, but its chronic use is associated with the onset of motor complications, as L-DOPA-induced dyskinesias (LID). LID occur in approximately 50% of patients using L-DOPA over 4 and 6 years, and they cause negative impacts on the quality of life of patients PD. To predict the onset of LID based on clinical and genetic risk may be an useful tool for clinicians which prescribe L-DOPA. The aim of this study was to determinate the main clinical and genetic risk factors for the onset of LID in Brazilian PD patients. A cross-sectional study was conducted with Brazilian PD patients from two centers (Ribeirão Preto and São Paulo) as part of the Latin American Research consortium on the Genetics of PD (LARGE-PD), which enrolled only PD patients using L-DOPA. PD patients were submitted to neurological examination and semi-structured interviews performed by movement disorders specialists. Presence of LID was confirmed if UPDRS Part IV had a score ≥ 1 on item 32. Based on previous studies, we chose eight Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in the following genes: *COMT*, *MAOB*, *ANKK1*, *DRD3*, *DAT1*, *BDNF*, *ADORA2A* and *NOS1*. Genotyping was performed using TaqMan SNP genotyping assays. We performed logistic regression and survival analysis to identify clinical and genetic risk factors associated with LID onset. We enrolled 199 PD patients (males – 59%; mean age 61.8 years), and 96 patients (48.2%) had LID. At a multivariate model with 7 independent variables, postural instability with gait disorder (PIGD) clinical phenotype (OR 0.17, CI 95% 0.07-0.39; $p < 0.001$), longer duration of L-DOPA therapy (OR 1.31, CI 95% 1.17-1.47; $p < 0.001$), higher L-DOPA equivalent daily doses (OR 1.00, CI 95% 1.000-1.002; $p = 0.04$), as also as early onset of PD (OR 1.04, CI 95% 1.01-1.07; $p = 0.009$) were the clinical risk factor more associated with onset of LID. Regarding genetic risk factors, only *MAOB* SNP rs1799836 was associated with LID, with the T allele increasing the risk of developing LIDs (OR 1.51, CI 95% 1.00-2.28; $p = 0.05$). Our results showed onset of LID can be predicted based on some clinical (motor clinical

phenotype, duration of L-DOPA therapy, L-DOPA equivalent daily dose and age at PD onset) and genetic risk factors, as *MAOB* SNP rs1799836. Further studies in larger samples, using longitudinal and prospective designs, are needed to explore the association between these predictors and onset of LID.

Keywords: Parkinson's disease, L-DOPA, dyskinesia, risk factors, polymorphisms.

LISTA DE SIGLAS

ADORA2A	GENE DO RECEPTOR DE ADENOSINA A2A
ANKK1	GENE <i>ANKYRIN REPEAT AND KINASE DOMAIN-CONTAINING 1</i>
BDNF	<i>BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR</i>
cAMP	ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO
COMT	CATECOL-O-METILTRANSFERASE
DA	DOPAMINA
DARPP-32	FOSFOPROTEÍNA REGULADA POR DOPAMINA E POR cAMP COM 32KDa
DAT	TRANSPORTADOR DE DOPAMINA
<i>DAT1</i>	GENE DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA
DIL	DISCINESIAS INDUZIDAS PELA L-DOPA
DP	DOENÇA DE PARKINSON
<i>DRD2</i>	GENE DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2
<i>DRD3</i>	GENE DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D3
ERK	CINASES REGULADAS POR SINAIS EXTRACELULARES
HCFMRP	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
LARGE-PD	<i>LATIN AMERICAN RESEARCH CONSORTIUM ON THE GENETICS OF PARKINSON'S DISEASE</i>
L-DOPA	L-3,4-DIIDROXIFENILALANINA (LEVODOPA)
LEDD	<i>L-DOPA EQUIVALENT DAILY DOSE</i>
MAO	MONOAMINO OXIDASE
MDS-UPDRS	<i>INTERNATIONAL PARKINSON AND MOVEMENT DISORDERS SOCIETY – UNIFIED PARKINSON'S DISEASE RATING SCALE (NOVA VERSÃO)</i>
NME	NEURÔNIOS MÉDIOS ESPINHOSOS
nNOS	ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
NO	ÓXIDO NÍTRICO
<i>NOS1</i>	GENE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
PIGD	<i>POSTURAL INSTABILITY WITH GAIT DISORDER</i>
PKA	PROTEÍNA CINASE A
SN	SUBSTÂNCIA NEGRA.
SNP	<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM</i>

STR	<i>SHORT TANDEM REPEATS</i>
UNIFESP	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
UPDRS	<i>UNIFIED PARKINSON'S DISEASE RATING SCALE (VERSÃO ANTIGA)</i>
VMAT2	TRANSPORTADOR DE MONOAMINA VESICULAR TIPO 2
VNTR	<i>VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS</i>

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - DOENÇA DE PARKINSON: ASPECTOS GERAIS

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum do mundo, e sua característica neuropatológica mais típica é a degeneração progressiva de distintos grupos neuronais envolvendo o sistema nervoso periférico e central, com particular relevância em seu efeito sobre a via nigroestriatal dopaminérgica, que produz importantes sintomas motores que caracterizam a doença, como o tremor de repouso, rigidez e a bradicinesia (KALIA; LANG, 2015).

Mesmo sendo descrita inicialmente por James Parkinson em 1817, e clinicamente explorada por Jean-Martin Charcot nas últimas décadas do século XIX, as primeiras explicações fisiopatológicas racionais para a DP se originam de casos descritos por Edouard Brissaud em 1893, que notou a presença de parkinsonismo unilateral em um paciente com um tumor na área da substância negra (SN) mesencefálica. Esta associação entre DP e SN foi fortalecida pelo trabalho seminal de Konstantin Tretiakoff em 1919, que além de comprovar a perda de neurônios na SN de pacientes com DP, descreveu a presença de corpos intracitoplasmáticos nos neurônios sobreviventes desta região, aos quais denominou de “corpos de Lewy”, em referência a descrição destes achados por Friedrich Lewy alguns anos antes de seu estudo (PREDIGER et al., 2014).

Contudo, o papel da dopamina (DA) na gênese da doença só iria ficar esclarecido na década de 1960, quando Carlsson et al. descreveram a DA e sua associação com a fisiologia dos movimentos voluntários, Hornykiewicz et al. descreveram a redução de neurônios dopaminérgicos na SN *pars compacta* e níveis reduzidos de DA no estriado de pacientes parkinsonianos, e Cotzias et al. testaram pela primeira vez uma terapia reposição de DA através da L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) por via oral, com sucesso (LEES; TOLOSA; OLANOW, 2015). Esta cadeia de eventos tem imensa importância clínica, pois a L-DOPA foi a primeira droga com impacto relevante sobre os sintomas motores da doença.

Mesmo que a DA seja o neurotransmissor mais envolvido nos sintomas motores da DP até hoje, uma série de evidências acumuladas até o final da década de 1990 mostrava que também havia redução no número de neurônios não-dopaminérgicos em encéfalos de pessoas com DP (BRAAK et al., 2003). A descoberta da alfa-sinucleína como o principal componente dos corpos e neuritos de Lewy, assim

como a produção de anticorpos contra alfa-sinucleína para imunohistoquímica (SPILLANTINI et al., 1997), permitiu que uma nova metodologia fosse estabelecida para estudo da neurodegeneração da DP. Braak et al. mostraram que o acúmulo de alfa-sinucleína patogênica se inicia no bulbo (núcleo motor dorsal do vago), então se espalha para vários núcleos pontinos (como o *locus coeruleus*), afetando posteriormente o mesencéfalo e a SN (BRAAK et al., 2003). A neurodegeneração continua pela prosencéfalo basal, rinencéfalo e o neocórtex, afetando virtualmente todo encéfalo. A progressão patológica se correlaciona com o surgimento gradual dos sintomas da doença, mostrando que a DP tem um padrão de degeneração caudorrostral (BRAAK et al., 2003). Este estudo foi essencial na demonstração de que a DP provoca um acometimento em vários sistemas de neurotransmissores extranigrais, o que torna sua fisiopatologia mais complexa.

Atualmente, sabemos que a DP é mais extensa que sua conhecida tétrade de sintomas motores (tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, instabilidade postural). Constipação intestinal, disfunção olfatória, distúrbio comportamental do sono REM, depressão e ansiedade, disautonomia e distúrbios cognitivos são sintomas não-motores cada vez mais reconhecidos por profissionais de saúde e pacientes, e grande parte deles é provocada pelos efeitos extranigrais da doença (PREDIGER et al., 2014).

Contudo, grande parte do tratamento medicamentoso da DP ainda é voltado para os sintomas motores, principalmente nos efeitos da L-DOPA. Com o avançar da doença, a frequência de pacientes em uso de L-DOPA é crescente, e cerca de 50 a 80% de todos os pacientes com DP está em uso deste fármaco (NAKAOKA et al., 2014; CRISPO et al., 2015; LIU et al., 2016). Compreender os mecanismos de ação da L-DOPA na DP é parte essencial do entendimento de sua história natural.

1.2 - O SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL E O PAPEL DA L-DOPA NA DOENÇA DE PARKINSON

A DA é um neurotransmissor que se origina do aminoácido tirosina, após a conversão em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) por ação da enzima tirosina hidroxilase, e da DOPA em DA pela DOPA-descarboxilase. Mesmo sendo a última catecolamina descoberta (em 1952, por Henry Dale), seu papel em circuitos neurais essenciais rapidamente lhe trouxeram destaque (PREDIGER et al., 2014).

Dentre os diferentes circuitos dopaminérgicos encefálicos ascendentes, dois deles se originam no mesencéfalo: a via nigroestriatal (oriunda de neurônios da SN) e a via mesocortical/mesolímbica (oriunda da área tegmentar ventral). A via nigroestriatal é composta principalmente por axônios de neurônios da SN *pars compacta*, e tem como destino as porções mais dorsais e posteriores do núcleo caudado e putâmen (conhecidos em conjunto como núcleo estriado) (PREDIGER et al., 2014).

O estriado é o principal núcleo de entrada dos sinais do córtex motor na circuitaria dos núcleos da base, um conjunto de estruturas subcorticais com função de regulação sobre movimento voluntário, comportamento e cognição. Os axônios nigroestriatais fazem importantes sinapses no estriado com os neurônios médios espinhosos (NME), a principal população celular deste núcleo, que possuem receptores dopaminérgicos D1 e D2. Há uma correspondência entre receptores dopaminérgicos ativados pela via nigroestriatal e o tipo de circuito basotálâmico: os NME da via direta expressam seletivamente receptores D1, enquanto que os NME da via indireta expressam seletivamente receptores D2 (Figura 1). A presença de dois circuitos paralelos que respondem distintamente à DA nos núcleos da base é o fundamento da função modulatória que estas estruturas têm sobre o movimento voluntário (SANTOS, 2014). Para uma revisão extensa sobre a fisiologia dos núcleos da base, sugerimos a leitura de SANTOS (2014).

Figura 1: Esquema do modelo canônico clássico dos núcleos da base. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNc: substância negra *pars compacta*; STN: núcleo subtalâmico (retirado de SANTOS, 2014 e adaptado de LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012).

No neurônio nigroestriatal, a DA é sintetizada no citosol e transportada para o interior das vesículas sinápticas através do transportador de monoamina vesicular tipo 2 (VMAT2). Na porção pré-sináptica, a

Figura 2: Esquema representando a sinapse nigroestriatal e as etapas do metabolismo dopaminérgico. Algumas das medicações utilizadas no tratamento da DP estão indicadas na imagem. COMT: catecol-O-metiltransferase; DAT: transportador de DA; MAO-B: monoamino oxidase B; VMAT2: transportador de monoamina vesicular tipo 2 (adaptado de PREDIGER et al., 2014).

DA é liberada na fenda sináptica, e pode ser metabolizada pelas enzimas monoamino oxidase (MAO) em ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico, e pela catecol-O-metiltransferase (COMT) em 3-metoxitiramina. Na fenda sináptica, a DA pode se ligar aos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e ao transportador de DA (DAT) nos neurônios pré-sinápticos (Figura 2) (PREDIGER et al., 2014).

A MAO é uma enzima presente na membrana externa das mitocôndrias e pode ser encontrada no organismo em duas isoformas: MAO-A e MAO-B. Estas isoformas da MAO se distinguem por sua distribuição nos tecidos, propriedades enzimáticas e por serem expressas em genes diferentes. Nos núcleos da base, a MAO-B é a isoforma predominante no total; na sinapse nigroestriatal, a porção pré-sináptica contém majoritariamente MAO-A, enquanto que a MAO-B é a forma predominante no meio extracelular da sinapse e responsável pela metabolização da DA livre na fenda sináptica, à custa de mitocôndrias de astrócitos e outras células da glia (YOUNG; EDMONDSON; TIPTON, 2006).

É importante que se comente sobre a interação entre os sistemas dopaminérgicos e glutamatérgico no nível pós-sináptico estriatal. A via corticoestriatal é predominantemente glutamatérgica, e estes terminais liberam glutamato nos dendritos dos NME do estriado, em íntima relação com os receptores

dopaminérgicos. No estriado, existem receptores ionotrópicos (principalmente o receptor N-metil-D-aspartato, NMDA) e metabotrópicos de várias classes, e ambos têm a função de facilitar o influxo de cálcio intracelular, o que modula várias vias de sinalização intracelular (CALABRESI et al., 2010).

Uma das consequências da interação glutamato-DA no estriado é a processo de plasticidade sináptica, através dos mecanismos de potenciação de longa duração e depressão de longa duração (também chamada de despotenciação) na sinapse corticoestriatal, muito úteis na função de “filtro” de sinais motores dos núcleos da base. Sob uma estimulação de alta frequência (sinais motores adequados), a transmissão glutamatérgica se intensifica, assim como uma estimulação de baixa frequência (sinais motores inadequados) reduz novamente o potencial pós-sináptico. Situações hipodopaminérgicas por degeneração na via nigroestriatal provocam anormalidades nesta plasticidade sináptica (CALABRESI et al., 2010).

No estado fisiológico, a liberação de DA ocorre simultaneamente de modo tônico e fásico da via nigroestriatal, e mantém os níveis estriatais de DA estáveis. Estes neurônios dopaminérgicos nigroestriatais têm a capacidade de absorver a DA extracelular através da DAT e armazenar este neurotransmissor para ser liberado gradualmente na sinapse. Na fase precoce da degeneração nigroestriatal, a administração repetida da reposição dopaminérgica oral provoca um efeito sustentado que persiste por horas e dias, mesmo após suspensão da reposição exógena de DA, no que se chama de “resposta de longa duração” ou estimulação dopaminérgica contínua (CALABRESI et al., 2010).

Caso haja uma extensa perda da via nigroestriatal, os neurônios sobreviventes não conseguem manter a mesma função de armazenamento de DA, a liberação dopaminérgica tônica enfraquece, e sua neurotransmissão para o estriado se torna predominantemente pulsátil. A estimulação dopaminérgica pulsátil segue a ingesta oral da reposição exógena de DA, fazendo com que o efeito seja uma “resposta de curta duração”, em contrapartida ao padrão de efeito visto nas fases precoces da degeneração nigroestriatal (CALABRESI et al., 2010). A principal modalidade de reposição exógena de DA na DP tem sido feita com L-DOPA.

A L-DOPA é um isômero da DOPA encontrado na natureza em sementes da planta leguminosa *Vicia faba*, porém tem sido sintetizada desde a primeira metade do século XX. Ao ser absorvida, a L-DOPA ingerida atravessa a barreira hematoencefálica, sofre descarboxilação pela enzima DOPA-descarboxilase, e se transforma em DA nos neurônios dopaminérgicos, principalmente naqueles da via nigroestriatal. É importante lembrar que a L-DOPA também sofre o efeito da DOPA-descarboxilase nos tecidos periféricos, o que provoca efeitos adversos e reduz a eficácia da medicação (PREDIGER et al., 2014). Com esta finalidade, usamos inibidores da DOPA-descarboxilase, como benserazida e carbidopa, para aumentar a concentração de L-DOPA que atravessa a barreira hematoencefálica. Sua

meia-vida dura cerca de 90 a 120 minutos, com níveis plasmáticos máximos ocorrendo após 60 minutos da ingestão oral (HUOT, 2014).

Após cinquenta anos de uso na DP, a L-DOPA ainda hoje é a droga antiparkinsoniana mais usada e a mais efetiva no tratamento dos sintomas motores. Neste período, a L-DOPA sofreu o impacto de algumas polêmicas relacionadas com seu uso crônico. Uma das polêmicas mais conhecidas é de um potencial de toxicidade da medicação sobre os neurônios nigroestriatais dopaminérgicos em risco, com dados oriundos de estudos *in vitro* e em modelos animais, inferindo que a L-DOPA poderia acelerar a neurodegeneração da DP. Contudo, os estudos em pacientes com DP (clínicos e patológicos) não apresentaram evidências diretas de que o tratamento crônico com L-DOPA possa piorar a progressão da doença (OLANOW, 2015).

Além disso, alguns dados vêm mostrando que a L-DOPA pode aumentar a frequência ou exacerbação de melanomas (OLANOW, 2015), e que quadros de polineuropatia na DP podem estar associados ao uso crônico de L-DOPA (OLANOW, 2015). Sintomas não-motores, como psicose, alterações autonômicas e sensoriais, também estão relacionados à terapia dopaminérgica (AQUINO; FOX, 2015).

Apesar destes possíveis problemas ligados ao tratamento com L-DOPA, os efeitos adversos mais ligados a esta droga certamente são as complicações motoras oriundas de seu uso por longo prazo. Ao lado das flutuações motoras, as discinesias induzidas pela L-DOPA (DIL) são um grande desafio para médicos e pacientes com DP até hoje.

1.3 - FISIOPATOLOGIA DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Grande parte das novidades sobre a gênese das DIL advém de novos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares associados aos receptores de DA e sobre o papel dos neurotransmissores não-dopaminérgicos neste fenômeno. Revisaremos estes mecanismos nesta seção.

1.3.1 - O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Atualmente compreendemos que duas condições são essenciais para surgimento de DIL: a degeneração da via nigroestriatal e o uso crônico de L-DOPA. Sabe-se que a L-DOPA não induz movimentos anormais em humanos saudáveis, e que seu surgimento é acelerado quando a medicação é introduzida em pacientes com DP avançada, sugerindo que a quantidade de axônios nigroestriatais degenerados tem correlação direta com a gênese das DIL (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011). Contudo, a inexistência de DIL em alguns raros pacientes com mais de 10 anos de DP, ou seja, indivíduos com avançada degeneração nigroestriatal, indica que provavelmente outros mecanismos estão envolvidos.

Estas duas condições provocam, como resposta do organismo, um processo de neuroplasticidade, que consideramos como mal-adaptada por gerar movimentos indesejáveis (CALABRESI et al., 2010). Esta neuroplasticidade mal-adaptada ocorre nos níveis pré-sináptico e pós-sináptico.

1.3.1.1 - MECANISMOS PRÉ-SINÁPTICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Dentre os mecanismos pré-sinápticos, temos: (1) a disfunção no armazenamento de DA, que causa extremas flutuações de DA extracelular e (2) a disfunção na liberação deste neurotransmissor, que provoca a produção de DA em neurônios não-dopaminérgicos, menos adequados para as funções biológicas do sistema (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Conforme já descrito, os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal têm a propriedade de transportar DA do meio extracelular para dentro de seu citoplasma através da proteína DAT, e com isso servem como depósitos de DA, a qual será liberada fisiologicamente na sinapse, de um modo contínuo. Porém, com a degeneração nigroestriatal, o sistema perde esta capacidade de controlar a concentração de DA extracelular e os níveis dopaminérgicos sinápticos do estriado se elevam progressivamente. Este fenômeno é influenciado pela ingesta oral de L-DOPA, e a concentração de DA estriatal extracelular sofre grandes flutuações de acordo com os níveis periféricos de L-DOPA: minutos após a ingesta da medicação, a concentração de DA forma picos, que se reduzem progressivamente após, até se estabilizar em níveis muito baixos do neurotransmissor. A este novo padrão de

transmissão dopaminérgica, chamamos estimulação pulsátil. Em resumo, a estimulação dopaminérgica pulsátil, com flutuações em picos e vales da concentração encefálica de DA na DP avançada, está diretamente relacionadas ao ciclo de efeito das doses de L-DOPA, assim como ao surgimento clínico das DIL (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Com a evolução da degeneração nigroestriatal, a descarboxilação da L-DOPA ocorre de modo crescente em neurônios não-dopaminérgicos, que tentam compensar a queda brusca na produção de DA pelas vias fisiológicas. Neurônios serotoninérgicos, noradrenérgicos e histaminérgicos são envolvidos na transformação de L-DOPA em DA, porém carecem do fino mecanismo de armazenamento e estabilização da concentração de DA natural aos neurônios dopaminérgicos. Como resultado, estes terminais sinápticos não conseguem recaptar a DA extracelular, contribuindo assim com a estimulação dopaminérgica pulsátil anormal (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Em última análise, a estimulação dopaminérgica pulsátil é causada tanto pela disfunção no armazenamento quanto na liberação da DA pela via nigroestriatal. Nesta situação, a resposta do organismo à L-DOPA é diretamente controlada pelas propriedades farmacocinéticas e pela biodisponibilidade da droga, gerando complicações motoras baseadas em suas concentrações plasmáticas, como as DIL.

Por outro lado, há evidências de que o reestabelecimento da estimulação dopaminérgica contínua em situações de degeneração nigroestriatal, através da administração intraduodenal de L-DOPA ou subcutânea/endovenosa de apomorfina reduz o impacto das DIL, pois os níveis de DA extracelular persistem estáveis, sem marcantes flutuações (IRAVANI; JENNER, 2011). Além disso, os agonistas dopaminérgicos D2/D3 (como pramipexol, ropinirol etc.) também agem através de estimulação dopaminérgica contínua, e provocam muito menos discinesias do que a L-DOPA (CALABRESI et al., 2010). Estas evidências mostram que a tratamento de reposição de DA com estimulação contínua restaura os padrões fisiológicos prévios de transmissão dopaminérgica, reduzindo o surgimento e a intensidade das DIL (IRAVANI; JENNER, 2011).

1.3.1.2 - MECANISMOS PÓS-SINÁPTICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Conforme comentado anteriormente, as alterações pré-sinápticas não explicam totalmente o surgimento das DIL. A própria existência de discinesias induzidas por agonistas dopaminérgicos, cuja ação biológica independe do estado de degeneração nigroestriatal, mostra que alterações pós-sinápticas também são essenciais para o surgimento das DIL (CALABRESI et al., 2010).

Tem se mostrado que o limiar de surgimento de DIL na fase avançada da DP é mais baixo que nas fases iniciais da doença. Isso significa que doses cada vez menores são capazes de provocar mais movimentos discinéticos. Para explicar este fenômeno, sugeriu-se que a depleção progressiva nigroestriatal induz modificações nos receptores dopaminérgicos estriatais, para que estejam mais aptos a responder os níveis decrescentes da DA. A este processo, chama-se de *priming*. A exposição crônica à L-DOPA causa uma sensibilização dos circuitos estriatais à DA, e efeitos biológicos mais intensos surgem com menor nível de estimulação dopaminérgica. Inicialmente, esta estratégia ajuda a função modulatória da via nigroestriatal em degeneração sobre os núcleos da base, mas na fase avançada, esta sensibilização promove o surgimento de sinais motores inadequados, como as DIL (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 estão expressos nos NME do estriado: os neurônios contendo receptores D1 dão origem à via direta (também chamada de estriatonigral) e os neurônios contendo receptores D2 dão origem à via indireta (também chamada de estriatopalidal). As duas vias, além serem bioquimicamente distintas, também apresentam efeitos biológicos opostos, pois a ativação de receptores D1 e D2 têm efeitos distintos na cascata de sinalização ligada à adenosina monofosfato cíclico (cAMP). A ativação de receptores D1 provoca estimulação da adenilato ciclase e aumento nos níveis de cAMP, enquanto que a ativação de receptores D2 inibe a produção de adenilato ciclase e de cAMP (IRAVANI; JENNER, 2011).

Do ponto de vista da gênese das DIL, há evidências sugerindo que a via dos receptores D1 é essencial para seu surgimento, pois está mais expresso no estriado de ratos discinéticos (BERTHET et al., 2009), assim como seu RNA mensageiro (mRNA) está aumentado nestes animais (DARMOPIIL et al., 2009), e sua inativação gênica seletiva reduz DIL (PICCONI et al., 2003). Porém, o fato de existirem discinesias provocadas também por agonistas dopaminérgicos D2/D3 sugere que ambos os tipos de receptores tem um papel no surgimento das DIL, sendo que provavelmente a influência mais relevante é resposta mediada por receptores D1 (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Grande parte do que conhecemos sobre cascatas de sinalização intracelular pós-sináptica ligadas às DIL tem relação com a ativação dos receptores D1. A ligação da DA aos receptores D1 ativam a adenilato ciclase, assim como a proteína cinase A (PKA) e uma molécula chamada fosfoproteína regulada por DA e por cAMP com 32kDa (DARPP-32). A degeneração nigroestriatal causa várias alterações no sistema de sinalização cAMP/PKA/DARPP-32 e a fosforilação da DARPP-32 está em níveis aumentados no estriado de animais discinéticos (PICCONI et al., 2003). O aumento da fosforilação da DARPP-32 está ligado à falha no processo de despotenciação da plasticidade sináptica corticoestriatal, que promove o surgimento de DIL (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011).

Outra via de sinalização intracelular importante na gênese das DIL é a das cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1 e ERK2), também ativadas pelos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos nos NME. Assim como na via cAMP/PKA/DARPP-32, há um aumento na fosforilação das ERK em animais discinéticos (PAVÓN et al., 2006; SANTINI et al., 2007) e a inativação farmacológica seletiva das ERK reduz o surgimento de DIL (SANTINI et al., 2007). Em conjunto, a fosforilação anormal tanto da via da DARPP-32 quanto o das ERK promove o surgimento de sinais motores indesejados, que se traduzem nas DIL.

Para se entender a relação entre a ativação destas cascatas intracelulares com as DIL, devemos considerar o papel do processo de plasticidade sináptica. Os mecanismos de potenciação de longa duração e despotenciação se perdem com o avanço da DP, e a terapia com L-DOPA permite que este equilíbrio de sinais seja novamente restaurado. Também sabemos que os processos de potenciação de longa duração e a despotenciação nos NME são dependentes da fosforilação da DARPP-32 (CALABRESI et al., 2000). Contudo, em determinado momento, a plasticidade sináptica ocorre sem o processo de despotenciação, o que gera a propagação de sinais motores inadequados e surgimento de movimentos involuntários. Esta plasticidade sináptica anormal ocorre em modelos animais de discinesia, e é bloqueada quando se interrompe seletivamente a sinalização da DARPP-32 ligada aos receptores D1 da via direta (CALABRESI et al., 2010). Conclui-se que a ativação dos receptores D1 inibe o processo de despotenciação, pois a fosforilação excessiva da DARPP-32 inibe indiretamente esta forma de plasticidade sináptica, facilitando assim a transmissão de sinais motores indesejados e geradores de movimentos discinéticos (IRAVANI; JENNER, 2011).

1.3.2 - O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A transmissão glutamatérgica é um componente importante da circuitaria corticoestriatal, porém a relação entre glutamato e os núcleos da base é mais ampla, pois a quase totalidade dos neurônios do núcleo subtalâmico são glutamatérgicos e exercem forte influência sobre a via indireta (SANTOS, 2014). Há evidências de que este sistema tenha considerável papel no surgimento das DIL, já que o glutamato promove a entrada de cálcio nos NME estriatais, o que facilita uma série de cascatas de sinalização intracelular que provoca a gênese das DIL (CALABRESI et al., 2010).

Os receptores NMDA têm sua função modificada por fosforilações que modulam a abertura dos canais iônicos, influenciando diretamente o influxo intracelular de cálcio, essencial para as cascatas de sinalização ligadas à plasticidade sináptica anormal e às DIL. A subunidade NR2A do receptor NMDA tem sua expressão aumentada em animais discinéticos, e se sabe que há uma forte interação entre o receptor D1 e o NMDA na membrana pós-sináptica estriatal. Sabe-se que os receptores ionotrópicos do tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isooxazolepropiónico) também têm ação no processo das DIL, porém menos esclarecida (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011; SHARMA et al., 2015).

Já o subtipo mGluR5 dos receptores metabotrópicos do grupo I, que age através de cascatas de sinalização, promova uma hiperexcitabilidade neuronal e facilitação da ação dos receptores NMDA, e há um aumento de expressão de mGluR5 no estriado de animais discinéticos (CALABRESI et al., 2010; IRAVANI; JENNER, 2011; SHARMA et al., 2015).

Do ponto de vista farmacológico, o uso de antagonistas glutamatérgicos reduziria o surgimento de DIL, e neste sentido, é importante lembrar que a medicação anti-discinética mais usada na DP é um antagonista não-seletivo de receptor NMDA, a amantadina. Modelos animais têm mostrado também que antagonistas seletivos da subunidade NR2A do receptor NMDA (CP101606) e antagonistas mGluR5 (mavoglurant) reduzem o aparecimento de DIL e têm sido estudados em ensaios clínicos (NUTT et al., 2008; RASCOL; PEREZ-LLORET; FERREIRA, 2015).

1.3.3 - O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

O papel das terminações serotoninérgicas sobre as DIL se baseia essencialmente no princípio do falso neurotransmissor. Explorado inicialmente por Carta et al. (2007), quando há degeneração da via nigroestriatal suficiente para que sua produção de DA seja criticamente reduzida, os terminais sinápticos de neurônios serotoninérgicos assumem a função de transformar a L-DOPA exógena em DA através de neurônios serotoninérgicos da rafe dorsal que chegam ao estriado (CARTA et al., 2007). Contudo, a terminação serotoninérgica não é equipada com a proteína que reabsorve a DA extracelular, a DAT, piorando a gravidade das flutuações das concentrações estriatais dopaminérgicas e exacerbando as DIL (CALABRESI et al., 2010). Além disso, a serotonina exerce um importante papel na modulação da liberação de DA no estriado (IRAVANI; JENNER, 2011).

O efeito da serotonina sobre as DIL depende do receptor acoplado, pois a ativação dos receptores 5-HT1 reduz a liberação de DA estriatal e os movimentos anormais (SANTIAGO et al., 1998), enquanto que a ativação de receptores 5-HT2 provoca efeito reverso. O uso de agonistas serotoninérgicos 5-HT1a/b reduz a ocorrências de DIL, e tem sido explorado em ensaios clínicos com sarizotan (agonista 5-HT1a) e eltoprazina (agonista 5-HT1a e 5-HT1b) (CALABRESI et al., 2010; RASCOL; PEREZ-LLORET; FERREIRA, 2015).

1.3.4 - O PAPEL DA ADENOSINA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A modulação de sinais no sistema nervoso através da molécula de adenosina tem sido cada vez mais estudada. A adenosina é oriunda do metabolismo das purinas, mais especificamente da transformação da adenosina monofosfato pela 5'-nucleotidase, e por estar associada à cadeia respiratória, pode ser encontrada no espaço extracelular de qualquer área do sistema nervoso. Sua ação biológica ocorre através da ativação de receptores de membrana, existentes em quatro tipos: A1, A2A, A2B e A3. No sistema nervoso, há predomínio dos receptores A1 e A2A e ambos desencadeiam cascatas de sinalização ligadas à adenilato ciclase, porém com respostas opostas: enquanto que o receptor A1 inibe a formação de adenilato ciclase, o receptor A2A estimula a adenilato ciclase (BENARROCH, 2008).

No contexto dos núcleos da base, o predomínio é de receptores A2A, principalmente localizados no terminal do neurônio glutamatérgico corticoestriatal e nos NME da via indireta, que se projetam para o globo pálido externo. Há uma interação antagonística importante entre receptores A2A e D2 nestes neurônios, e a ativação do receptor A2A aumenta a atividade da via indireta, provocando redução na atividade motora (BENARROCH, 2008; IRAVANI; JENNER, 2011; SHARMA et al., 2015).

Há evidências morfológicas de que a expressão dos receptores A2A está aumentada no estriado de animais discinéticos (ZENG et al., 2000) e de pacientes com DIL (CALON et al., 2004). Foi visto que antagonistas A2A são capazes de melhorar os sintomas motores parkinsonianos, e também evitar o surgimento de DIL, por mecanismos pouco evidentes, e nos últimos anos, antagonistas seletivos A2A têm sido testados no tratamento das DIL, como a istradefilina, o preladenant e o tozadenant (SHARMA et al., 2015; RASCOL; PEREZ-LLORET; FERREIRA, 2015).

1.3.5 - O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO NITRÉRGICA NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Nas últimas décadas, uma série de descobertas tem mostrado que o óxido nítrico (NO), uma molécula gasosa e instável, também tem um importante papel na fisiopatologia dos núcleos da base e na gênese das DIL. No sistema nervoso, o NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e se difunde pelas células para exercer seu efeito biológico, ao se acoplar à guanilato ciclase e desencadear cascatas de sinalização intracelular (SANTOS, 2014; DEL BEL et al., 2015).

Nos núcleos da base, o NO é produzido principalmente em interneurônios estriatais, que perfazem 2% do total de neurônios do núcleo, e no núcleo subtalâmico, onde cerca de 90% dos neurônios apresentam atividade nitrérgica (SANTOS-LOBATO et al., 2016). Parte da ação do NO nos núcleos da base ocorre através da facilitação da liberação da DA estriatal, mas também ao interagir com cascatas de sinalização intracelular, como a da DARPP-32 no NME (DEL BEL et al., 2015).

O papel do NO nas DIL já foi explorado em vários estudos com modelos animais. O uso de inibidores da nNOS (7-nitroindazol, L-NAME, L-NOARG) reduziram drasticamente os movimentos discinéticos em roedores (PADOVAN-NETO et al., 2009; NOVARETTI et al., 2010; PADOVAN-NETO et al., 2011; PADOVAN-NETO et al., 2013), além de reduzir a taxa de renovação de DA (DEL BEL et al., 2014) e a

expressão de DARPP-32 (OUIMET; LANGLEY-GULLION; GREENGARD, 1998) e FosB/DeltaFosB (PADOVAN-NETO et al., 2013), todos marcadores moleculares de DIL (DEL BEL et al., 2015).

1.3.6 - O PAPEL DOS ENDOCANABINOIDES NA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Assim como a adenosina e o NO, o papel dos endocanabinoides no sistema nervoso tem sido explorado nas últimas décadas. Os principais endocanabinoides oriundos no sistema nervoso são o 2-aracdonoil glicerol (2-AG) e N-aracdonoil etanolamina (também chamada de anandamida) derivam de fosfolípidios de membranas celulares e possuem uma miscelânea de efeitos biológicos, com forte interação com o sistema glutamatérgico. Em geral, tanto o 2-AG quanto a anandamida estão envolvidas em sinalizações inibitórias, com sutis diferenças de ação entre elas (BENARROCH, 2014).

Estes endocanabinoides também possuem dois tipos de receptores: CB1 e CB2. No sistema nervoso, os receptores CB1 são os principais responsáveis pela sinalização canabinoide. Há uma alta expressão destes receptores em núcleos da base, como estriado, globo pálido e a SN *pars reticulata*. Além disso, os receptores CB1 podem formar complexos heteroméricos com outros tipos de receptores, como D2, A2A, mGluR5, o que aumenta a complexidade de suas ações. Um dos efeitos sinápticos mais clássicos dos endocanabinoides é a sinalização inibitória retrógrada, que se aplica no contexto do circuito corticoestriatal glutamatérgico. A despolarização pós-sináptica nos NME libera endocanabinoides para a sinapse, que se acoplam a receptores CB1 nas terminações glutamatérgicas pré-sinápticas e reduzem a liberação de glutamato no estriado, reduzindo assim a entrada de cálcio intracelular e vias de sinalização intracelular (CALABRESI et al., 2010; BENARROCH, 2014). Existem outros receptores ligados ao sistema endocanabinoide que podem ter um papel na fisiologia dos núcleos da base, como o receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1 (TRPV1) e o receptor nuclear gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ), ativados principalmente pela anandamida (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2016).

Este mesmo mecanismo de sinalização inibitória retrógrada pode estar associado à gênese das DIL, já que os níveis de endocanabinoides e a expressão do receptor CB1 aumentam em animais discinéticos (ZENG et al., 1999; FERRER et al., 2003). Contudo, tanto agonistas CB1 quanto antagonistas do mesmo receptor têm mostrado atividade antidiscinética em modelos animais, um indicativo da grande complexidade inerente às ações biológicas deste sistema (IRAVANI; JENNER, 2011; SHARMA et al.,

2015). Além disso, deve se considerar o efeito dos endocanabinoides sobre mecanismos de neuroinflamação, uma outra potencial fonte de gênese das DIL (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2016).

1.4 - DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

1.4.1 - AS PRIMEIRAS DESCRIÇÕES

Em seu primeiro estudo usando o isômero D,L-DOPA em pacientes com DP, além da dramática resposta nos sintomas motores com doses altas da droga, Cotzias et al. relataram o surgimento de “movimentos atetoides” reversíveis em três pacientes que chegaram a usar doses máximas acima de 9 gramas por um período acima de 2 meses, todos com resposta boa ou ótima após início da L-DOPA. Aparentemente, estes efeitos adversos não preocuparam muito os autores, que priorizaram os quatro casos de granulocitopenia como potencial limitante a esta promissora medicação (COTZIAS; VAN WOERT; SCHIFFER, 1967).

A toxicidade hematológica da D,L-DOPA fez com que George Cotzias tentasse um outro isômero, a L-DOPA, em um novo estudo aberto publicado em 1969. Dos 28 pacientes com DP tratados pela L-DOPA, quatorze indivíduos (50%) desenvolveram os ditos movimentos coreiformes e atetoides, e os autores perceberam que os casos mais graves ocorriam nos pacientes que usavam a medicação por períodos mais longos. Na discussão do estudo, os autores não conseguem explicar as possíveis causas deste efeito inesperado, que se tornam menos relevantes em comparação com os resultados positivos da L-DOPA (COTZIAS; PAPAVALIOU; GELLEN, 1969).

Incomodados pela falta de critérios para avaliação das melhoras provocadas pela L-DOPA, Yahr et al. fizeram um grande ensaio clínico com 60 pacientes. Foi visto que 37 indivíduos (62%) desenvolveram movimentos involuntários, especialmente os que usaram doses mais altas e por períodos mais longos, que desapareciam com a redução da dose de L-DOPA. Assim como nos estudos anteriores, pouca atenção foi dedicada à ocorrência deste efeito adverso (YAHR et al., 1969).

Vários outros autores também relataram o estranho surgimento de movimentos involuntários após início da terapia com L-DOPA, que começaram a ser chamados como DIL. O neurologista e escritor Oliver Sacks foi um dos primeiros pesquisadores a chamar atenção dos efeitos negativos provocados

pelo uso crônico da L-DOPA (SANTOS-LOBATO; TUMAS, 2016), e sua ocorrência deixou de ser um curioso fenômeno para ser abordado como uma grave complicação do tratamento.

1.4.2 - ASPECTOS FENOMENOLÓGICOS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

As DIL são movimentos hipercinéticos que surgem no contexto do tratamento crônico com L-DOPA, geralmente em forma de coreia, distonia, balismo ou atetose podem acontecer. O próprio termo “discinesia” pode ser usado para qualquer movimento involuntário que não seja tremor. Os movimentos podem ocorrer em qualquer parte do corpo, principalmente as partes distais dos membros e a região cervical. Há relatos também de discinesias mais incomuns, como as discinesias respiratórias e oculares (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

Um conceito importante associado às DIL é a influência da concentração encefálica de L-DOPA e DA no fenômeno motor. De acordo com o período de efeito da L-DOPA (período *ON*, quando o paciente apresenta melhora dos sintomas motores; período *OFF*, quando o efeito positivo da L-DOPA termina), podemos classificar as DIL em diferentes tipos. As discinesias do período *ON* são as mais comuns formas de DIL, presentes em mais de 70% dos pacientes com esta complicação, e ocorrem quando a estimulação dopaminérgica encefálica é alta, correlacionando-se com o melhor estado motor do paciente. As DIL do período *ON* são geralmente coreiformes, afetando principalmente membros e a cabeça. Podem ser subclassificadas em discinesias de pico de dose e em onda quadrada ou contínua (Figura 3) (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

As discinesias de pico de dose são o subtipo mais comum de DIL, e se iniciam alguns minutos após a ingestão oral da L-DOPA. Quando as concentrações encefálicas de DA se elevam ao máximo e o paciente experimenta melhora do seu estado motor, os movimentos discinéticos surgem e persistem durante o período mais eficaz de *ON*. Com a redução da concentração encefálica de DA, as discinesias reduzem e somem, durando cerca de 30 a 60 minutos. Em geral, de todo período *ON* do paciente, apenas uma porção é afetada pelas discinesias de pico de dose, e na maior parte do estado *ON* o paciente tem os benefícios motores sem os movimentos involuntários (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

Figura 3: O fenômeno clínico das DIL. A: Diferentes tipos de DIL classificadas de acordo com o momento de surgimento dos movimentos anormais (pico de dose, bifásica, distonia do período OFF). B: O risco de surgimento de DIL depende da degeneração nigroestriatal e da exposição crônica à L-DOPA. C: Redução da janela terapêutica da L-DOPA ao longo do tempo, aumentando o risco de uma resposta clínica fraca à medicação e de surgimento das DIL (adaptado de CALABRESI et al., 2010).

Semelhantes às discinesias de pico de dose, as discinesias em onda quadrada ou contínuas também ocorrem durante o período ON, contudo se mantêm estáveis durante todo período de benefício motor da L-DOPA. Nesta forma, os benefícios motores do período ON são prejudicados pelos movimentos discinéticos, e o paciente vivencia diariamente apenas dois estados: ON com discinesias e o estado OFF, uma situação muito incapacitante (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

De modo paradoxal, há também o surgimento de discinesias do período OFF, que ocorrem quando o paciente tem baixas concentrações de DA encefálica e está em seu pior estado motor. Ocorre

geralmente na forma de distonia, principalmente em membros inferiores e no lado mais afetado da doença. Estas distonias geralmente se associam a contraturas dolorosas, de muito incômodo aos pacientes. Preferencialmente surgem durante à noite, ou ao acordar, antes da primeira dose de L-DOPA (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

Um tipo mais incomum de DIL pode surgir, caracterizado pelos movimentos discinéticos no início e no final do período *ON*, não ocorrendo no melhor estado *ON* do paciente. Chamamos este tipo de discinesias bifásicas, pois ocorre em dois momentos do mesmo ciclo de efeito, e se diferencia da discinesia de pico de dose por ocorrer também minutos antes de o paciente entrar no período *OFF*, encerrando-se quando o paciente fica em seu pior estado motor. Fenomenologicamente, assemelham-se às discinesias de pico de dose, e provavelmente são provocadas pelas mudanças na concentração dopaminérgica encefálica, crescente no início da dose e decrescente no final da dose (ZIS; CHAUDHURI; SAMUEL, 2014).

1.4.3 - EPIDEMIOLOGIA DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Após as primeiras décadas de terapia com L-DOPA, a comunidade neurológica notou que as DIL eram complicações comuns do tratamento crônico, porém não havia dados exatos sobre incidência e prevalência do fenômeno, apenas estimativas muito amplas. Em um estudo clássico, Ahlskog e Muentner (2001) revisaram mais de 200 publicações para tentar encontrar dados mais fidedignos sobre frequência de complicações motoras na DP. Comparando pacientes que iniciaram tratamento com L-DOPA após muitos anos de evolução da doença e pacientes que receberam L-DOPA logo após diagnóstico de DP, o estudo mostrou que metade dos indivíduos com longa duração da doença desenvolvem DIL após cerca de 6 meses de L-DOPA, enquanto que esta mesma frequência só ocorre nos pacientes que receberam L-DOPA precocemente após 4 a 6 anos de tratamento. Além disso, o estudo também mostrou que cerca de 90% dos pacientes com DP em uso de L-DOPA irá desenvolver DIL após 9 anos de tratamento (AHLISKOG; MUENTER, 2001).

Muitos outros estudos, realizados com metodologias distintas, têm investigado a frequência de DIL na população de pacientes com DP que usam L-DOPA (Tabela 1), havendo grande variação nas taxas de incidência e prevalência do fenômeno, porém aparentemente a complicação ocorre de maneira homogênea pelo mundo, sem diferenças entre populações étnicas. Sabemos que a proporção das DIL

se eleva principalmente após 4-5 anos de terapia com L-DOPA, e afeta a grande maioria dos pacientes com mais de 10 anos de tratamento.

Um estudo recente, baseado em comunidade e prospectivo, avaliou o surgimento de complicações motoras em pacientes previamente virgens de tratamento com L-DOPA, mostrando uma prevalência de DIL de 13% após 5 anos com L-DOPA e uma incidência de 59 casos a cada 1000 pacientes-ano (BJORNESTAD et al., 2016). Até o presente momento, este estudo apresenta a melhor evidência de incidência e prevalência de DIL ao longo de 5 anos de tratamento.

1.4.4 - IMPACTOS FUNCIONAIS DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Mesmo sendo uma complicação motora muito comum nas fases avançadas da DP, nem todos os casos de DIL são graves o suficiente para modificar a capacidade funcional dos pacientes. Menos de 20% dos casos de DIL são de intensidade moderada e grave, e no estudo prospectivo baseado em comunidade de Bjornstad et al., apenas 0,6% das DIL que surgiram eram graves (VAN GERPEN et al., 2006; GARCÍA-RUIZ et al., 2012; BJORNESTAD et al., 2016). Além disso, os pacientes geralmente apresentam uma dificuldade na autopercepção de seus movimentos discinéticos, que ocorre principalmente nas DIL mais leves (VITALE et al., 2001; AMANZIO et al., 2010), que tem sido atribuída a uma falha em processos metacognitivos ligados ao lobo frontal (AMANZIO et al., 2010).

Considerando estas questões acima, é válido analisar o quanto as DIL realmente são problemáticas para pacientes com uma doença já debilitante como a DP, e se há um prejuízo na qualidade de vida destas pessoas. Alguns trabalhos têm mostrado que as DIL não têm um impacto sobre os indicadores globais de qualidade de vida em pacientes com DP (SCHRAG; QUINN, 2000; MARRAS et al., 2004; HECHTNER et al., 2014), porém itens como atividades da vida diária, aspectos cognitivos e estigma social parecem ser influenciados individualmente pelos movimentos discinéticos (HECHTNER et al., 2014).

Tabela 1: Estudos com fatores de risco clínicos para o surgimento de DIL em pacientes com DP. A metodologia de busca destes artigos será exposta detalhadamente na seção 1.5.1 (FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA – REVISÃO SISTEMÁTICA).

Autor e Ano	País	Desenho do Estudo	Estratégia de Recrutamento	Amostra de Pacientes	Número de Fatores Analisados	Fatores de Risco Clínico associados às DIL
Wu et al., 1993	Taiwan	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	194	4	Idade Início Sintomas
Grandas et al., 1999	Espanha	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	168	7	Idade Início Sintomas, Dose Inicial L-DOPA
Schrag et al., 2000	Inglaterra	Transversal	Comunidade	87	9	Duração Tratamento com L-DOPA
Whone et al., 2003	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	162	1	Uso Agonista Dopaminérgico
Bracco et al., 2004	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	412	7	Uso Agonista Dopaminérgico
Zappia et al., 2005	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	215	8	Idade Início Sintomas, Sexo, Dose L-DOPA no Estudo, Duração Tratamento com L-DOPA
Benbir et al., 2006	Turquia	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	555	8	Idade Início Sintomas, Duração da DP, Duração Tratamento com L-DOPA, Uso Agonista Dopaminérgico
Hauser et al., 2006	EUA	Retrospectivo	Ensaio Clínico	301	10	Estadiamento Hoehn & Yahr, Uso Agonista Dopaminérgico, Presença de Flutuações Motoras
Rascol et al., 2006	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	268	9	Dose L-DOPA no Estudo, Estadiamento Hoehn & Yahr, Idade no Estudo
Sharma et al., 2006	Inglaterra	Prospectivo	Ambulatório Especializado	220	8	Duração da DP, Peso
Van Gerpen et al., 2006	EUA	Retrospectivo	Comunidade	126	3	Idade Início Sintomas, Dose Inicial L-DOPA
Oertel et al., 2006	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	294	1	Uso Agonista Dopaminérgico
Juri-Claveria et al., 2007	Chile	Transversal	Ambulatório Especializado	124	7	Duração da DP, Sexo, LEDD
Kum et al., 2008	Hong Kong	Transversal	Comunidade	98	7	Duração da DP
Sharma et al. 2008	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	427	6	Idade no Estudo, Peso
Ku et al. 2010	EUA	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	109	1	Idade Início Sintomas
Hassin-Baer et al, 2011	Israel	Prospectivo	Ambulatório Especializado	89	4	Idade Início Sintomas, Sexo, Tempo entre Diagnóstico DP e Início L-DOPA
Kipfer et al., 2011	Suíça	Transversal	Ambulatório Especializado	85	8	Duração da DP, LEDD, Fenótipo Clínico Motor
Walker et al., 2011	Inglaterra	Transversal	Comunidade	75	7	Dose L-DOPA no Estudo

(Continua)

Autor e Ano	País	Desenho do Estudo	Estratégia de Recrutamento	Amostra de Pacientes	Número de Fatores Analisados	Fatores de Risco Clínico associados às DIL
Wickremaratchi et al., 2011	Inglaterra	Transversal	Comunidade	358	8	Idade Início Sintomas, Dose L-DOPA no Estudo, Duração Tratamento com L-DOPA
Cervantes-Arriaga et al., 2012	México	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	482	7	Dose L-DOPA no Estudo, Idade no Diagnóstico DP, Idade Início L-DOPA, Idade no Estudo
Garcia-Ruiz et al., 2012	Espanha	Prospectivo	Ambulatório Especializado	45	3	Idade Início Sintomas, Sexo
Olanow et al., 2013	Multinacional	Prospectivo	Ensaio Clínico	745	12	Idade Início Sintomas, Sexo, UPDRS Parte II, Dose L-DOPA no Estudo, Peso
Wills et al., 2013	EUA/Canadá	Prospectivo	Ensaio Clínico	183	8	Consumo de Café
Zhang et al., 2013	China	Transversal	Ambulatório Especializado	367	8	Idade Início Sintomas, Dose L-DOPA no Estudo, Duração Tratamento com L-DOPA, Fenótipo Clínico Motor
Hashim et al., 2014	Malásia	Transversal	Ambulatório Especializado	95	8	Idade Início Sintomas, Dose L-DOPA no Estudo, Duração Tratamento com L-DOPA
Bjornstad et al., 2016	Noruega	Prospectivo	Comunidade	189	8	Sexo, UPDRS Parte III
Nicoletti et al., 2016	Itália	Retrospectivo	Ambulatório Especializado	485	13	Idade Início Sintomas, Duração da DP, Estadiamento Hoehn & Yahr, LEDD, Fenótipo Clínico Motor

Contudo, outros estudos mostram que as DIL provocam amplos impactos na vida dos pacientes, que se tornam mais problemáticos ao longo da evolução da doença. Através do “*Parkinson’s Disease Questionnaire 39*” (PDQ-39), um instrumento de avaliação da qualidade de vida, Damiano et al. (2000) mostraram que quatro subitens do questionário (atividades da vida diária, bem-estar emocional, comunicação e desconforto corporal) e a pontuação global estavam associados às DIL (DAMIANO et al., 2000).

Através de outras escalas de qualidade de vida, Péchevis et al. (2005) mostraram que, além de haver uma associação entre a presença de DIL e redução nos escores de qualidade de vida, casos mais graves de discinesias estão associados com piora na qualidade de vida, mesmo após ajuste para outras variáveis. Este mesmo estudo também mostrou que a gravidade das DIL se associa com maior chance de depressão (PÉCHEVIS et al., 2005). Parte destes achados foi confirmada por outro estudo do mesmo ano (CHAPUIS et al., 2005).

Além do provável impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes com DP, a DIL também eleva os custos diretos (medicações, hospitalização) e indiretos (gastos com cuidadores, incapacidade no trabalho) com saúde, dobrando os valores em pacientes com discinesias moderadas e graves, principalmente pelos gastos indiretos (DODEL et al., 1998; DODEL; BERGER; OERTEL, 2001;

PÉCHEVIS et al., 2005). Mesmo sendo uma complicação geralmente vista inicialmente pelos pacientes como de pouca importância, há fortes evidências de que as DIL prejudicam em vários aspectos a vida já atribulada de uma pessoa com DP.

1.4.5 - ATUAL ESTADO DO TRATAMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Nas últimas duas décadas, vários estudos foram feitos com a finalidade de se encontrar um tratamento eficaz para as DIL. Estratégias comuns de tratamento para redução das DIL incluem a redução das doses de L-DOPA e a utilização de formas de administração contínuas da medicação, como infusão duodenal ou formas de liberação prolongada de L-DOPA (KATZENSCHLAGER, 2014).

Até o momento, a medicação com mais evidências de redução das DIL é a amantadina, um antagonista não-seletivo do receptor NMDA. Considerando apenas os ensaios clínicos randomizados e controlados, onze estudos avaliaram a eficácia da amantadina na redução das DIL como desfecho primário nos últimos 20 anos (VERHAGEN METMAN et al., 1998; METMAN et al., 1999; LUGINGER et al., 2000; SNOW et al., 2000; DEL DOTTO et al., 2001; THOMAS et al., 2004; SILVA-JUNIOR et al., 2005; SAWADA et al., 2010; WOLF et al., 2010; ORY-MAGNE et al., 2014; PAHWA et al., 2015). No geral, a amantadina é eficaz na redução da gravidade das DIL, assim como benéfica nas atividades da vida diária, porém seu efeito parece decair após 12 meses de tratamento (KATZENSCHLAGER, 2014). As recomendações do Departamento Científico de Transtornos de Movimento da Academia Brasileira de Neurologia sugerem seu uso como possivelmente eficaz (FERRAZ; BARBOSA, 2010).

Uma série de outras drogas tem sido testada no controle das DIL, com resultados modestos ou ineficazes. A partir dos novos conhecimentos adquiridos sobre a fisiopatologia, medicações de origens distintas, desde sinvastatina até modernos antagonistas seletivos glutamatérgicos e agonistas serotoninérgicos, continuam sendo avaliadas em ensaios clínicos randomizados e controlados. Até o momento desta revisão, além da amantadina, o agonista serotoninérgico eltoprazina e o antagonista mGluR5 dipraglurant são as principais medicações promissoras no tratamento das DIL (SVENNINGSSON et al., 2015; TISON et al., 2016).

1.5 - ESTRATÉGIAS DE PREDIÇÃO DO SURGIMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Conforme exposto acima, as DIL são complicações motoras de alta prevalência na DP avançada, com impactos negativos sobre a capacidade funcional e qualidade de vida destes pacientes e poucas opções eficazes de tratamento. Além disso, seu surgimento está fortemente vinculado ao uso crônico da L-DOPA, a medicação antiparkinsoniana mais eficaz até o presente momento. Apesar disso, nem todos pacientes com DP que usam L-DOPA apresentam DIL e apenas alguns terão formas muito severas dos movimentos discinéticos. Isto indica que existem condições individuais que determinam o surgimento e a gravidade das DIL.

Baseado no interesse de se identificar os principais fatores de risco associados ao surgimento das DIL, foram realizadas revisões da literatura sobre fatores de risco clínicos e genéticos ligados às DIL.

1.5.1 - FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA – REVISÃO SISTEMÁTICA

Para revisar os principais fatores de risco clínicos associados ao surgimento de DIL, realizamos uma busca sistemática nas bases de dados MEDLINE, EMBASE e Web of Science (desde suas origens até novembro de 2016) através do seguinte algoritmo de busca (utilizados termos em língua inglesa): 1) para a base de dados MEDLINE – levodopa AND dyskinesia AND “risk factors” NOT “tardive dyskinesia”; 2) para a base de dados EMBASE – levodopa AND dyskinesia AND ‘risk factor*’ NOT ‘tardive dyskinesia’; 3) para a base de dados Web of Science – TS=(levodopa AND “risk factor*” AND dyskinesia) NOT TS=”tardive dyskinesia”. As buscas foram ampliadas para as referências encontradas nos artigos obtidos.

Para seleção dos artigos, foram escolhidos apenas artigos originais com estudos que usaram análise multivariada (regressão logística ou modelos de riscos proporcionais de Cox) para identificar fatores de risco clínicos (como variáveis independentes) associadas ao surgimento de DIL (como variável dependente). Nós limitamos a busca para estudos escritos em língua inglesa e espanhola. Os artigos sobre fatores de risco genético foram excluídos.

Com esta estratégia, foram encontrados 28 artigos de diversos países, envolvendo 6958 pacientes com DP (Tabela 1). Destes, 14 estudos foram baseados em pacientes de ambulatórios especializados, 8

estudos foram baseados em ensaios clínicos e 6 foram feitos em pacientes recrutados na comunidade; em termos de desenho de estudo, 11 estudos foram prospectivos, 9 foram transversais e 8 retrospectivos.

No total, 25 diferentes fatores de risco clínicos foram analisados nestes estudos (sexo, nacionalidade, peso corporal, idade no início dos sintomas de DP, idade no diagnóstico clínico de DP, idade no início do tratamento com L-DOPA, idade no momento do estudo, dose de L-DOPA no início do tratamento, dose de L-DOPA no momento do estudo, duração do tratamento com L-DOPA, dose diária equivalente de L-DOPA [*L-DOPA equivalent daily dose* – LEDD], duração da DP, tempo entre diagnóstico de DP e início do tratamento com L-DOPA, tempo entre início do tratamento com L-DOPA e avaliação, pontuação na Escala Unificada de Avaliação da DP [*Unified Parkinson's Disease Rating Scale* - UPDRS], estadiamento Hoehn & Yahr, escore de Schwab & England, presença de flutuações motoras, fenótipo clínico motor no início da doença, uso de agonista dopaminérgico, uso de inibidor da MAO-B, uso de amantadina, consumo de café e vinho e história de tabagismo). Destes, 6 potenciais fatores de risco clínicos não apresentaram associação com DIL em nenhum dos estudos (idade no diagnóstico clínico de DP, escore de Schwab & England, uso de amantadina, uso de inibidor da MAO-B, consumo de vinho e história de tabagismo).

Considerando os fatores de risco clínicos com maior número de artigos mostrando sua associação com DIL, os seis fatores de risco clínicos mais importantes foram, em ordem decrescente: idade no início dos sintomas de DP, dose de L-DOPA no momento do estudo, duração do tratamento com L-DOPA, duração da DP, sexo e uso de agonista dopaminérgico.

a) Idade no início dos sintomas de DP: Vinte e um estudos analisaram a idade no início dos sintomas de DP como um fator de risco clínico, e 13 estudos mostraram que pacientes com início mais precoce tinham uma maior probabilidade de desenvolverem DIL (total de 3551 pacientes com DP). A redução de um ano na idade do início dos sintomas da DP aumenta em 3 a 9% a chance de surgimento de DIL (ZAPPIA et al., 2005; VAN GERPEN et al., 2006; KU; GLASS, 2010; HASSIN-BAER et al., 2011; HASHIM et al., 2014; NICOLETTI et al., 2016).

b) Dose de L-DOPA no momento do estudo: Dezesesseis estudos analisaram a dose de L-DOPA no momento do estudo como um fator de risco clínico, e 8 deles mostraram que doses mais altas de L-DOPA tinham uma maior probabilidade de DIL (total de 2605 pacientes com DP). A chance de surgimento de DIL após um aumento de 100 mg/dia na dose de L-DOPA variou entre 10% (ZAPPIA et al., 2005) a 100% (CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012).

c) Duração do tratamento com L-DOPA: Oito estudos analisaram a associação entre a duração do uso de L-DOPA e início das DIL, e 6 deles mostraram que uma duração mais longa de DP aumenta a probabilidade do surgimento das DIL (total de 1677 pacientes com DP). Após um ano de tratamento com L-DOPA, há um aumento nas chances de se desenvolver DIL em 9 (ZAPPIA et al., 2005) a 42% (HASHIM et al., 2014).

d) Duração da DP: Dezoito estudos analisaram a associação entre a duração da DP e o surgimento das DIL, e 6 estudos mostraram que uma duração mais longa da DP aumenta a probabilidade de início das DIL (total de 1567 pacientes com DP). Após um ano com DP, há um aumento nas chances de surgimento de DIL em 14% (SHARMA et al., 2006) a 45% (KIPFER et al., 2011).

e) Sexo: Vinte e um estudos analisaram sexo como fator de risco clínico de DIL, e 6 estudos mostraram a presença desta associação (total de 1407 pacientes com DP). Foi visto que mulheres apresentavam uma maior probabilidade de DIL em todos os 6 estudos, e que o aumento no risco de se desenvolver DIL sendo mulher variou entre 1.82 (HASSIN-BAER et al., 2011) a 12.8 vezes (GARCÍA-RUIZ et al., 2012).

f) Uso de agonista dopaminérgico: Nove estudos analisaram o tratamento com agonistas dopaminérgicos (como pramipexol, ropinirol, cabergolina, pergolida) como fator associado ao surgimento de DIL, e 5 trabalhos mostraram que o uso de agonista dopaminérgico reduz a probabilidade de DIL (total de 1724 pacientes com DP). O risco de redução das LID com uso desta classe de medicação variou entre 2.08 (OERTEL et al., 2006) a 8.28 vezes (WHONE et al., 2003).

Outros fatores de risco clínicos merecem atenção, mesmo que analisados em um número menor de estudos, como o estadiamento Hoehn & Yahr, LEDD e idade no momento do estudo.

Considerando os resultados desta busca sistemática, notamos que há um grande número de fatores de risco clínicos explorados nos últimos anos. Os principais fatores de risco clínicos destacados aqui já foram citados e discutidos em revisões prévias sobre o tema (PRASHANTH; FOX; MEISSNER, 2011; MANSON; STIRPE; SCHRAG, 2012; LEE; JEON, 2014; JIMÉNEZ-URBIETA et al., 2015). Contudo, há pouca concordância entre os resultados dos estudos, o que dificulta a interpretação destes dados. Como causas da baixa concordância dos resultados, a variabilidade metodológica dos estudos parece ser o principal motivo.

Para uma análise ideal de fatores de risco para um determinado evento, os estudos observacionais prospectivos representam os melhores modelos a serem utilizados, assim como o recrutamento de indivíduos da população geral (estudos comunitários), sem os vieses de seleção intrínsecos aos ensaios clínicos ou aos estudos feitos em centros de referência (BJORNESTAD et al., 2016). A busca

sistemática realizada evidenciou uma escassez de estudos com este formato ideal: dos 28 artigos analisados, apenas um estudo apresenta estas características, que mostrou o sexo feminino e altas pontuações na parte motora da UPDRS como fatores de risco clínico independentes para surgimento das DIL (BJORNESTAD et al., 2016).

1.5.2 - FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA – REVISÃO SISTEMÁTICA

Estratégia semelhante à usada na revisão de fatores de risco clínicos associados ao surgimento de DIL foi empregada para fatores de risco genéticos ligados a este desfecho. Consideramos “fatores de risco genéticos” como polimorfismos em genes específicos, na sua maior parte polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP), excluindo-se mutações. Foi realizada uma busca sistemática nas bases de dados MEDLINE, EMBASE e Web of Science (desde suas origens até novembro de 2016) através do seguinte algoritmo de busca (utilizados termos em língua inglesa): 1) para a base de dados MEDLINE – levodopa AND dyskinesia AND polymorphism; 2) para a base de dados EMBASE – levodopa AND dyskinesia AND polymorphism NOT ‘tardive dyskinesia’; 3) para a base de dados Web of Science – TS=(levodopa AND polymorphism AND dyskinesia) NOT TS=“tardive dyskinesia”. As buscas foram ampliadas para as referências encontradas nos artigos obtidos.

Para seleção dos artigos, foram escolhidos apenas artigos originais com objetivo de identificar polimorfismos associados ao surgimento de DIL. Nós limitamos a busca para estudos escritos em língua inglesa e espanhola. Os artigos sobre fatores de risco clínico foram excluídos, assim como estudos que analisaram mutações associadas às DIL.

Com esta estratégia, foram encontrados 29 artigos de diversos países, envolvendo 7248 pacientes com DP (Tabela 2). Destes, 26 estudos foram baseados em pacientes de ambulatórios especializados, um estudo usou DNA de pacientes cujos encéfalos faziam parte de um banco de cérebros e 2 artigos não descreveram a origem dos pacientes; em termos de desenho de estudo, 26 foram transversais e apenas 3 estudos foram prospectivos.

No total, 18 diferentes genes foram analisados nestes estudos (*COMT*, *MAOA*, *MAOB*, *DRD1*, *DRD2*, *ANKK1*, *DRD3*, *DRD4*, *DAT1* [*SLC6A3*], *BDNF*, *ADORA2A*, *HOMER1*, *ACE*, *APOE*, *GRIN2B*, *MTHFR*,

SLC6A4, *OPRM1*). Destes, nove genes não apresentaram associação com DIL em nenhum dos polimorfismos estudados (*MAOA*, *DRD1*, *DRD4*, *ACE*, *APOE*, *GRIN2B*, *MTHFR*, *SLC6A4*, *OPRM1*).

Para os outros genes, um ou mais polimorfismos foram associados com discinesias na DP, porém são poucos os artigos com resultados positivos. Descreveremos cada gene de relevância para o surgimento de DIL, pela ordem decrescente da quantidade de estudos publicados sobre o tema.

a) *COMT*: Oito estudos analisaram polimorfismos no gene *COMT* como um fator de risco genético para desenvolvimento de DIL. O polimorfismo mais estudado foi o SNP rs4680, analisado em todos os 8 estudos, e apenas um artigo descreve a análise de outros SNPs (rs6269, rs4633, rs4818) (BIALECKA et al., 2008).

Dos 8 estudos que analisaram o SNP rs4680 com DIL, apenas dois mostraram resultados positivos, ambos mostrando que o alelo A aumenta o risco de discinesias (WATANABE et al., 2003; DE LAU et al., 2012). Através de uma análise multivariada feita em um estudo prospectivo, de Lau et al. (2012) estimaram um risco de quase 3 vezes para surgimento de DIL em pessoas homozigotas para o alelo A. Os outros SNPs estudados no gene *COMT* (rs6269, rs4633, rs4818) não tiveram associação com DIL em nenhum estudo.

b) *DRD2*: Sete estudos analisaram polimorfismos no gene *DRD2* como um fator de risco genético para desenvolvimento de DIL. O polimorfismo mais estudado foi a sequência curta repetida em tandem (*short tandem repeats* – STR) CA(n) no íntron 2, analisado em 4 estudos, seguido pelo polimorfismo INDEL rs1799732, pesquisado em 3 estudos. Vários outros polimorfismos ligados ao gene *DRD2* foram investigados, porém sem qualquer associação com DIL.

Dos 4 estudos que analisaram a associação entre o polimorfismo STR CA(n) com DIL, dois trabalhos (realizados pelo mesmo grupo) mostraram que indivíduos portadores de alelos com 13 e 14 cópias da STR têm 3 a 4 vezes menor risco de desenvolver DIL (OLIVERI et al., 1999; ZAPPIA et al., 2005), enquanto outro estudo descreveu um maior risco de DIL para os portadores de alelos com 14 e 15 cópias, na ordem de três vezes (STRONG et al., 2006). Nenhum dos estudos mostrou associação entre o polimorfismo INDEL rs1799732 e as DIL.

Tabela 2: Estudos com fatores de risco genéticos para o surgimento de DIL em pacientes com DP. ND – Não descrito.

Autor e Ano	País	Desenho do Estudo	Estratégia de Recrutamento	Amostra de Pacientes com DP	Genes Analisados	Polimorfismos associados às DIL
Oliveri et al., 1999	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	136	<i>DRD1</i> , <i>DRD2</i>	Gene <i>DRD2</i> (STR CA(n))
Kaiser et al., 2003	Alemanha	Transversal	Ambulatório Especializado	183	<i>DRD2</i> , <i>ANKK1</i> , <i>DRD3</i> , <i>DRD4</i> , <i>DAT1</i>	Gene <i>DAT1</i> (VNTR de 40 bases)
Watanabe et al., 2003	Japão	Transversal	ND	121	<i>COMT</i>	Gene <i>COMT</i> (rs4260)
Contin et al., 2004	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	36	<i>DAT1</i>	Nenhum
Contin et al., 2005	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	104	<i>COMT</i>	Nenhum
Zappia et al., 2005	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	215	<i>DRD2</i>	Gene <i>DRD2</i> (STR CA(n))
Strong et al., 2006	EUA	Transversal	Ambulatório Especializado	92	<i>DRD2</i> , <i>OPRM1</i>	Gene <i>DRD2</i> (STR CA(n))
Lin et al., 2007(a)	Taiwan	Transversal	Ambulatório Especializado	251	<i>ACE</i>	Nenhum
Lin et al., 2007(b)	Taiwan	Transversal	Ambulatório Especializado	94	<i>MTHFR</i>	Nenhum
Bialecka et al., 2008	Polônia	Transversal	ND	159	<i>COMT</i>	Nenhum
Foltynie et al., 2009	Inglaterra	Prospectivo	Ambulatório Especializado	315	<i>BDNF</i>	Gene <i>BDNF</i> (rs6265)
Pascale et al., 2009	Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	120	<i>ACE</i>	Nenhum
Paus et al., 2009	Alemanha	Transversal	Ambulatório Especializado	591	<i>DRD3</i>	Nenhum
Gao et al., 2010	Espanha	Transversal	Ambulatório Especializado	193	<i>BDNF</i>	Nenhum
Karakasis et al., 2011	Grécia	Transversal	Ambulatório Especializado	135	<i>BDNF</i>	Nenhum
Lee et al., 2011	Coreia do Sul	Transversal	Ambulatório Especializado	503	<i>ANKK1</i> , <i>DRD3</i> , <i>GRIN2B</i> , <i>SLC6A4</i>	Gene <i>DRD3</i> (rs6280)
Molchadski et al., 2011	Israel	Prospectivo	Ambulatório Especializado	155	<i>APOE</i>	Nenhum
de Lau et al., 2012	Holanda	Prospectivo	Ambulatório Especializado	219	<i>COMT</i>	Gene <i>COMT</i> (rs4260)
Rieck et al., 2012	Brasil	Transversal	Ambulatório Especializado	199	<i>DRD2</i> , <i>ANKK1</i>	Genes <i>DRD2</i> e <i>ANKK1</i> (Haplótipo TTCTA)

(Continua)

Autor e Ano	País	Desenho do Estudo	Estratégia de Recrutamento	Amostra de Pacientes com DP	Genes Analisados	Polimorfismos associados às DIL
Torkaman-Boutorabi et al., 2012	Irã	Transversal	Ambulatório Especializado	103	<i>COMT</i> , <i>MAOB</i>	Nenhum
Greenbaum et al., 2013	Israel e Itália	Transversal	Ambulatório Especializado	593	<i>COMT</i> , <i>ANKK1</i> , <i>DRD3</i>	Nenhum
Svetel et al., 2013	Sérvia	Transversal	Ambulatório Especializado	177	<i>BDNF</i>	Nenhum
Cervantes-Arriaga et al., 2014	México	Transversal	Ambulatório Especializado	181	<i>APOE</i>	Nenhum
Cheshire et al., 2014	Austrália e Inglaterra	Transversal	Banco de Cérebros	285	<i>COMT</i> , <i>MAOA</i> , <i>BDNF</i>	Nenhum
Hao et al., 2014	China	Transversal	Ambulatório Especializado	1087	<i>COMT</i> , <i>MAOB</i>	Gene <i>MAOB</i> (rs1799836)
Kaplan et al., 2014	Israel	Transversal	Ambulatório Especializado	352	<i>DRD2</i> , <i>ANKK1</i> , <i>DAT1</i> , <i>BDNF</i>	Gene <i>DAT1</i> (rs393795)
Schumacher-Schuh et al., 2014	Brasil	Transversal	Ambulatório Especializado	205	<i>HOMER1</i>	Gene <i>HOMER1</i> (rs4704559)
Cervantes-Arriaga et al., 2015	México	Transversal	Ambulatório Especializado	236	<i>DRD2</i> , <i>ANKK1</i>	Nenhum
Rieck et al., 2015	Brasil	Transversal	Ambulatório Especializado	208	<i>ADORA2A</i>	Gene <i>ADORA2A</i> (rs2298383 e rs3761422)

c) *ANKK1*: Seis estudos analisaram a associação entre DIL e polimorfismos do gene *ANKK1*, todos através do SNP rs1800497 (também chamado de Taq1A). Apenas um estudo observou um polimorfismo diferente (rs2734849) (RIECK et al., 2012).

Dos 6 estudos que analisaram a associação entre o SNP rs1800497 com DIL, cinco artigos pesquisaram o SNP de modo isolado – não foram vistas associações entre o polimorfismo e discinesias nestes estudos. Um estudo avaliou a associação de um haplótipo específico formado por 3 SNPs do gene *DRD2* (rs2283265, rs1076560 e rs6277) e 2 SNPs do gene *ANKK1* (rs1800497 e rs2734849) com o surgimento de DIL, e o haplótipo TTCTA aumenta o risco da complicação em 1.5 vezes (RIECK et al., 2012).

d) *BDNF*: Seis estudos analisaram a associação entre as DIL e polimorfismos do gene *BDNF*. O polimorfismo mais estudado é o SNP rs6265, avaliado em todos os 6 trabalhos. Outros 6 SNPs ligados ao gene *BDNF* foram investigados, sem associação com DIL (KAPLAN et al., 2014).

Dos 6 estudos que analisaram a associação entre o SNP rs6265 com DIL, apenas um trabalho mostrou que indivíduos portadores do alelo que forma metionina (Met) têm 2 vezes maior risco de desenvolver DIL (FOLTYNIE et al., 2009).

e) *DRD3*: Quatro estudos analisaram polimorfismos no gene *DRD3* como um fator de risco genético para desenvolvimento de DIL. O polimorfismo mais estudado foi o SNP rs6280, analisado em todos os 4 estudos. Apenas um artigo descreve a análise de outro SNP (rs4646996), sem associação com DIL (KAISER et al., 2003).

Dos 4 estudos que analisaram a associação entre o SNP rs6280 com DIL, apenas um trabalho mostrou que indivíduos portadores do alelo A têm 3 vezes maior risco de desenvolver DIL (LEE et al., 2011).

f) *DAT1* (*SCL6A3*): Três estudos analisaram a associação entre DIL e polimorfismos do gene *DAT1*. O polimorfismo mais estudado foi a repetição em tandem de número variável (*variable number of tandem repeats* – VNTR) de 40 pares de base na região 3' não-traduzida, analisado em todos os 3 estudos. Apenas um artigo descreve a análise de outros 14 polimorfismos (KAPLAN et al., 2014).

Dos 3 estudos que analisaram a associação entre o polimorfismo VNTR de 40 pares de base com DIL, um trabalho mostrou que indivíduos portadores do alelo com 9 cópias da VNTR apresentam maior associação com discinesias (KAISER et al., 2003). Dentre os polimorfismos analisados por Kaplan et al. (2014), foi visto que portadores do alelo C do SNP rs393795 apresentam 5 vezes mais chance de desenvolver DIL.

g) *MAOB*: Dois estudos analisaram a associação entre DIL e polimorfismos do gene *MAOB*. O único polimorfismo estudado foi o SNP rs1799836. Destes 2 estudos, um trabalho mostrou que indivíduos heterozigotos (AG) apresentam 4 vezes mais risco de desenvolverem DIL (HAO et al., 2014).

h) *ADORA2A* e *HOMER1*: Cada um destes genes foi analisado por estudos diferentes. O estudo envolvendo polimorfismos do gene *ADORA2A* analisou 2 SNPs (rs2298383, rs3761422) (RIECK et al., 2015), o estudo referente ao gene *HOMER1* analisou 3 SNPs (rs4704559, rs10942891, rs4704560) (SCHUMACHER-SCHUH et al., 2014). Para o gene *ADORA2A*, foi visto que ambos os SNPs aumentam o risco de DIL na ordem de 2 a 3 vezes (os dois estão em desequilíbrio de ligação) (RIECK et al., 2015). No gene *HOMER1*, apenas o SNP rs4704559 demonstrou ser um fator de proteção para o surgimento de discinesias (SCHUMACHER-SCHUH et al., 2014).

A baixa quantidade de estudos positivos, assim como a considerável heterogeneidade de resultados pode ser atribuída às divergências metodológicas. Apenas quatro estudos foram realizados com mais de 500 participantes, quase metade dos estudos não excluiu pacientes que não usavam L-DOPA,

assim como quase metade dos estudos testaram a associação entre os genótipos e DIL através de métodos estatísticos pouco confiáveis, como o teste de qui-quadrado.

Nos estudos que utilizaram análises multivariadas para avaliar a associação entre genótipos, DIL e outras variáveis, o sexo foi a variável confundidora mais empregada nos modelos, seguido de idade de início da DP e duração do tratamento com L-DOPA.

Dentre os nove genes com polimorfismos que apresentam associação com DIL, os que tiveram mais resultados positivos foram os genes *DRD2* (3 estudos) e *COMT* (2 estudos), com os polimorfismos STR CA(n) e rs4680, respectivamente. Todos os outros genes (*ANKK1*, *DRD3*, *DAT1*, *BDNF*, *MAOB*, *ADORA2A*, *HOMER1*) só tiveram resultados positivos em um estudo.

Dentre estes nove genes, foram escolhidos 7 polimorfismos com maior importância clínica para comporem um quadro geral de variações genéticas ligadas ao surgimento de DIL, que iremos descrever melhor em seguida.

1.5.2.1 - GENE *COMT* – SNP rs4680

O gene que expressa a enzima COMT está localizado em humanos no cromossomo 22 (22q11.2). É composto por 6 éxons, sendo que os dois primeiros são não-codificantes. Parte importante da regulação da expressão do gene é controlada por duas regiões promotoras localizadas no éxon 3. O mesmo gene codifica duas isoformas de COMT: uma solúvel (S-COMT) e outra ligada à membrana (MB-COMT). No encéfalo humano, 70% das formas da enzima são MB-COMT e 30% S-COMT. A COMT catalisa a transferência de um grupamento metil para a catecolamina (L-DOPA, DA, noradrenalina) envolvida (orto-metilação) (MÄNNISTÖ; KAAKKOLA, 1999).

A atividade da COMT pode ser classificada de acordo com sua sensibilidade à temperatura (termolabilidade): baixa atividade, atividade intermediária e alta atividade. Foi visto que esta atividade da COMT está relacionada a um polimorfismo no gene, o SNP rs4680 localizado no éxon 4. A substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 158 provoca a transição do aminoácido valina (Val) para Met na posição 108 da estrutura do peptídeo, respectivamente. A variação Met-108 se associa à COMT de baixa atividade, reduzindo a atividade da enzima em cerca de 3 a 4 vezes (MÄNNISTÖ; KAAKKOLA, 1999).

A frequência deste polimorfismo (Met) em indivíduos brasileiros varia de 43% (MELO-FELIPPE et al., 2016) a 51% (SOEIRO-DE-SOUZA et al., 2013) da população. Sua presença tem repercussões clínicas em várias doenças psiquiátricas, como o transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, alcoolismo e transtorno depressivo. Alguns estudos tentaram explorar a associação entre este polimorfismo e a risco de se desenvolver DP, com resultados inconclusivos (MÄNNISTÖ; KAAKKOLA, 1999).

1.5.2.2 - GENES *DRD2/ANKK1* – SNP rs1800497 (Taq1A)

Conforme já descrito acima, o receptor dopaminérgico D2 é essencial na fisiopatologia das DIL. O seu gene (*DRD2*) está localizado em humanos no cromossomo 11 (11q23.2) e possui 8 éxons. Duas isoformas são expressas pelo gene, uma curta e outra longa, com capacidades funcionais semelhantes em relação à DA. Estudos prévios de associação genótipo-fenótipo têm explorado as variações do gene *DRD2* em aprendizado e mecanismos de recompensa, assim como em condições psiquiátricas como esquizofrenia e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (RIECK, 2012).

Antes de 2004, a região 11q23.1 era considerada como pertencente ao gene *DRD2*, porém foi visto que se tratava de um gene a parte, ao qual se denominou *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain-containing 1*). Este gene expressa uma proteína da família das cinases, também conhecida como RIP5 (*receptor interacting protein kinase 5*), que está envolvida em interações proteína-proteína e é expressa no sistema nervoso central. Há evidências de considerável interação entre os genes *DRD2* e *ANKK1* (RIECK, 2012; PATRIQUIN et al., 2015).

Um SNP funcional conhecido como Taq1A (rs1800497), localizado no último éxon do gene *ANKK1*, foi considerado como parte do gene *DRD2*. O polimorfismo se caracteriza pela substituição de uma citosina (alelo A2) por uma timina (alelo A1), o que provoca a troca de uma glutamina (Glu) por uma lisina (Lys) no códon 713. Não há uma definição sobre a repercussão clínica desta variação genética: alguns autores sugerem que o alelo variante esteja associado a uma menor densidade de receptores D2 no cérebro, assim como a uma atividade aumentada da enzima DOPA-descarboxilase ou redução na densidade da DAT (RIECK, 2012).

O SNP Taq1A já foi estudado em uma ampla variedade de condições psiquiátricas, como alcoolismo, esquizofrenia, distúrbios de personalidade e distúrbios alimentares. Por sua relação com o gene *DRD2*, também se tornou um polimorfismo de interesse na DP, com resultados contraditórios até o momento

(RIECK, 2012). A frequência do alelo A1 (Lys) em pacientes caucasianos com DP nos Estados Unidos foi de 22% (HASSAN et al., 2016), enquanto que em pacientes parkinsonianos brasileiros representou 27% da amostra estudada (RIECK et al., 2012).

1.5.2.3 - GENE *DRD3* – SNP rs6280

Classicamente, os receptores dopaminérgicos podem ser classificados, por suas estruturas e funções, em *D1-like* (D1 e D5) e *D2-like* (D2, D3 e D4). O receptor dopaminérgico D3 é expresso pelo gene *DRD3*, localizado no cromossomo 3 (3q13.3) e que contém 6 éxons. Este receptor é mais frequente em estruturas associadas ao sistema límbico e ao estriado ventral (GRIFFON et al., 1995; WONG; BUCKLE; VAN TOL, 2000).

Dentre outros polimorfismos, destaca-se o SNP funcional rs6280, localizado no éxon 1 e causado pela troca de uma timina por uma citosina, provocando a substituição de uma serina (Ser) por uma glicina (Gly) na posição 9. A importância funcional deste polimorfismo ainda não está clara, mas há evidências de que a variante (Gly) aumenta a afinidade do receptor pela DA (WONG; BUCKLE; VAN TOL, 2000; SHIROMA; GEDA; MRAZEK, 2010).

A maioria dos estudos explorou a associação deste SNP com esquizofrenia, assim como outros transtornos psiquiátricos. A discinesia tardia, um distúrbio de movimento induzido pelo uso crônico de neurolépticos, parece ter sua suscetibilidade modulada por este polimorfismo (SHIROMA; GEDA; MRAZEK, 2010), e a variação Gly-9 está associada a um início mais precoce da DP (HASSAN et al., 2016). A frequência do alelo variante em uma população de pacientes caucasianos norte-americanos com DP foi de 32% (HASSAN et al., 2016), enquanto que em indivíduos saudáveis do Brasil foi de 47% (MESSAS et al., 2005).

1.5.2.4 - GENE *DAT1* – SNP rs393795

Conforme já comentado acima, a DAT é uma proteína essencial no transporte da DA extracelular para o compartimento intracelular, e é expressa pelo gene *DAT1* (ou também conhecida como SCL6A3 –

solute carrier family 6 member 3). O gene *DAT1* está localizado no cromossomo 5 (5p15.3) e contém 15 éxons. A proteína está presente principalmente nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (UHL, 2003).

O polimorfismo mais estudado no gene *DAT1* é o VNTR de 40 pares de base na região 3' não-traduzida, porém os estudos não mostraram associação entre ele, a DP e suas complicações (PATRIQUIN et al., 2015). Contudo, outro polimorfismo mostrou interessante associação com o surgimento de DIL, o SNP rs393795 (KAPLAN et al., 2014). O SNP rs393795 está no íntron 4 e consiste na troca de uma citosina por uma timina. Especula-se que este polimorfismo possa modificar a taxa de recaptação da DA extracelular, mesmo estando presente em uma região não-codificadora (KAPLAN et al., 2014).

Este SNP também foi associado a uma redução no risco de se desenvolver *delirium* (VAN MUNSTER et al., 2010) e presente em um haplótipo ligado ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (SHANG; GAU, 2014). A frequência do alelo variante em uma população de pacientes caucasianos europeus com DP foi de 24% (dbSNP - SHORT GENETIC VARIATIONS - rs393795, 2017), porém não há estudos de frequência deste polimorfismo na população brasileira.

1.5.2.5 - GENE *MAOB* – SNP rs1799836

A MAO-B é uma das principais enzimas do sistema de metabolização da DA, ao lado da COMT, por sua função de deaminação oxidativa de aminas biogênicas e exógenas, tanto no sistema nervoso quanto na periferia. É expressa pelo gene *MAOB*, que está localizado no cromossomo X (Xp11.3) e contém 15 éxons e 14 íntrons, e assim como a COMT, a MAO-B também existe em distintos níveis de atividade baseada em termolabilidade (baixa atividade, atividade intermediária e alta atividade) (YOU DIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006; ZHANG et al., 2016).

A região do íntron 13 tem sido bem explorada na associação com doenças neurológicas, principalmente com o SNP rs1799836. Este polimorfismo se caracteriza pela troca de uma timina por uma citosina a 36 pares de base a montante do início do éxon 14. Há evidências de que este polimorfismo possa modificar a atividade da MAO-B no encéfalo (BALCIUNIENE et al., 2002).

O SNP rs1799836 foi associado à esquizofrenia em alguns estudos (WEI et al., 2011; CAMARENA et al., 2012), porém sua associação com o risco de DP foi estudada em diversos trabalhos. Em uma meta-

análise recente, Zhang et al. (2016) descrevem que 14 estudos analisaram a associação entre DP e o SNP rs1799836, e que o alelo A aumenta o risco de se desenvolver a doença, particularmente em populações asiáticas. Em um estudo feito em pacientes com DP asiáticos, a frequência do alelo variante C foi de 19% (HAO et al., 2014), enquanto que a frequência dos genótipos CC e CT em pacientes brasileiros com DP foi de 31% e 27%, respectivamente (SCHUMACHER-SCHUH, 2011).

1.5.2.6 - GENE *BDNF* – SNP rs6265

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) é o principal membro da família das neurotrofinas no sistema nervoso central. Suas várias funções envolvem síntese proteica, crescimento axonal, maturação dendrítica, plasticidade sináptica e neuroproteção, e está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neuropsiquiátricas, como a doença de Alzheimer, doença de Huntington, ataxia espinocerebelar tipo 6, depressão maior, esquizofrenia e drogadição (BENARROCH, 2015). O gene *BDNF* está localizado no cromossomo 11 (11p.14.1) e é composto por 11 éxons, porém apenas o éxon 9 contém a região codificadora da proteína. Através de processos alternativos de *splicing*, diferentes isoformas do BDNF podem ser geradas (BENARROCH, 2015; CATTANEO et al., 2016).

O polimorfismo do gene *BDNF* com maior relevância clínica é o SNP funcional rs6265, que consiste na troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 196. A troca produz a transição de uma Val por uma Met no códon 66, a qual se situa na região pró-BDNF e é clivada da molécula de BDNF madura. Mesmo não estando presente na conformação final do BDNF, este polimorfismo tem impactos funcionais sobre a atividade da proteína, como alterações em cascatas de sinalização e no transporte intracelular da mesma (NOTARAS; HILL; VAN DEN BUUSE, 2015).

A importância clínica do SNP rs6265 já foi explorada em várias condições neuropsiquiátricas, com destaque para declínio cognitivo com redução do volume do hipocampo e esquizofrenia (BENARROCH, 2015; NOTARAS; HILL; VAN DEN BUUSE, 2015). Em relação à DP, uma meta-análise mostrou a falta de uma associação entre o SNP rs6265 e o risco de DP (MARIANI et al., 2015), porém há estudos isolados mostrando que pacientes com DP portadores do alelo A têm maior risco de declínio cognitivo em relação aos portadores do alelo G (GUERINI et al., 2006; ALTMANN et al., 2016). A frequência do genótipo variante (AA) na população de pacientes com DP brasileiros foi de 4% (ALTMANN et al., 2016).

1.5.2.7 - GENE *ADORA2A* – SNP rs2298383

O papel da adenosina na regulação da circuitaria dos núcleos da base foi descrita anteriormente, assim como os diferentes papéis biológicos exercidos por distintos receptores de adenosina. O receptor A2A tem particular importância por serem predominantes no estriado e por estimularem a via indireta do circuito corticobasotálâmico. Este receptor é expresso pelo gene *ADORA2A*, localizado no cromossomo 22 (22q11.23) e contém 6 éxons (BENARROCH, 2008).

Um dos polimorfismos mais estudados no gene *ADORA2A* é o SNP rs2298383, causado pela troca de uma citosina por uma timina no íntron 1, uma região promotora com possível relevância funcional evidenciada em estudos *in silico* através de modificações no processo de transcrição do gene (RIECK et al., 2015).

Este polimorfismo no gene *ADORA2A* já foi associado ao consumo de café e seus efeitos ansiogênicos (CHILDS et al., 2008) e a encefalopatias epiléticas (SHINOHARA et al., 2013), e nos estudos relacionados à DP, sua única associação foi com o surgimento de DIL (RIECK et al., 2015). Em pacientes brasileiros com DP, a frequência do alelo variante T foi de 56% (RIECK et al., 2015).

1.5.2.8 - GENE *NOS1* – SNP rs2682826

Conforme visto em nossa revisão sistemática, não há estudos que associem polimorfismos no gene que expressa a nNOS ao surgimento de DIL. Contudo, conforme descrito anteriormente, há importantes evidências de que o NO seja um modulador dos processos plásticos que provocam as discinesias na DP, e sendo assim, a funcionalidade da sua enzima de síntese (nNOS) é essencial na compreensão deste processo. Polimorfismos no gene que expressa a nNOS podem ter associação direta com o surgimento de DIL.

A proteína nNOS é expressa pelo gene *NOS1*, localizado no cromossomo 12 (12q24.2), consistindo em 29 éxons (FREUDENBERG; ALTOA; REIF, 2015). Dentre os vários polimorfismos do gene *NOS1*, um dos mais explorados é o SNP rs2682826, caracterizado pela troca de uma guanina por uma adenosina em uma região não-codificadora (região 3' não-traduzida) do éxon 29 (LEVECQUE et al., 2003). Mesmo estando em uma região não-codificadora, esta região é crítica para a regulação dos processos

de *splicing*, eficiência na tradução e na estabilidade e processamento do mRNA do gene (HALL et al., 1994). Contudo, ainda não há maiores evidências da relevância funcional deste SNP.

A associação do SNP rs2682826 com condições neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia (SHINKAI et al., 2002), degeneração lobar frontotemporal (VENTURELLI et al. 2008), doença de Alzheimer (GALIMBERTI et al., 2005) e comportamento suicida (RUJESCU et al., 2008; CUI et al., 2010), tem sido explorada. Em relação à DP, dois estudos prévios mostraram que portadores do alelo A do SNP rs2682826 têm um maior risco de surgimento da doença (LEVECQUE et al., 2003; HANCOCK et al., 2008). Em indivíduos brasileiros, a frequência do alelo variante A é de 25% (LACCHINI et al., 2014).

Em resumo, podemos considerar que há uma literatura robusta envolvendo a compreensão dos processos clínicos e fisiopatológicos das DIL. Contudo, nossa capacidade de predição do surgimento desta complicação motora da DP continua insuficiente. Mesmo que cerca de 50% dos pacientes parkinsonianos desenvolvam DIL após 5 anos de terapia com L-DOPA, seria fundamental que os clínicos pudessem saber, com antecedência, quais pessoas teriam maior risco de desenvolver complicações decorrentes do uso crônico desta droga, antes de prescrevê-la. Este conceito de "medicina personalizada" é fundamental no manejo de doenças crônico-degenerativas, como a DP.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi determinar os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DIL em uma casuística de pacientes brasileiros com DP.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar os principais fatores de risco clínicos para o desenvolvimento de DIL em pacientes com DP em uso de L-DOPA;
- 2) Determinar os principais fatores de risco genéticos para o desenvolvimento de DIL em pacientes com DP em uso de L-DOPA;

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo transversal baseado em pacientes oriundos de ambulatórios especializados.

Os pacientes com DP avaliados neste estudo foram recrutados como parte da iniciativa internacional “*Latin American Research Consortium on the Genetics of Parkinson’s Disease*” (LARGE-PD), que engloba indivíduos com DP em centros de vários países da América Latina. No Brasil, os pacientes foram recrutados em dois centros: o Setor de Distúrbios de Movimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) e do Ambulatório de Distúrbios de Movimento da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O período de recrutamento de pacientes foi entre maio de 2007 a fevereiro de 2014.

Os seguintes critérios de inclusão foram usados:

- a) Diagnóstico de DP de acordo com os Critérios do Banco de Cérebro de Londres;
- b) Estar em uso de L-DOPA;

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP sob o número de processo nº 3977/2008, e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 - COLETA DE DADOS

Todos os pacientes foram examinados por médicos neurologistas especialistas em Distúrbios de Movimento, através de um questionário padronizado para a iniciativa LARGE-PD. Este questionário envolveu a coleta de dados epidemiológicos e clínicos sobre os indivíduos, como sexo, idade no início dos sintomas da doença, ano de início do tratamento com L-DOPA, medicações antiparkinsonianas, história familiar de DP, tabagismo, etilismo, consumo de bebidas cafeinadas, uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, história de traumatismo cranioencefálico e contatos com metais pesados, pesticidas ou produtos químicos em geral.

Dentre os dados clínicos, os pacientes foram classificados de acordo com o fenótipo clínico motor da DP – forma tremor-dominante, forma instabilidade postural com distúrbios de marcha (*postural instability with gait disorder* – PIGD) e forma indeterminada, através de metodologia descrita em Stebbins et al. (2013), no momento da avaliação.

Os dados clínicos referentes ao uso crônico de L-DOPA, duração do tratamento com L-DOPA, doses das medicações antiparkinsonianas, presença das DIL, data do início das DIL e medicações em uso no momento do surgimento das DIL foram revisados e confirmados nos prontuários médicos dos pacientes.

Para simplificação da análise das informações referentes a tempo, todos os intervalos registrados inferiores a um ano foram arredondados para 0.5 ano.

O estado da doença nos pacientes foi avaliado pela nova versão da Escala Unificada de Avaliação da DP (*International Parkinson and Movement Disorders Society – Unified Parkinson's Disease Rating Scale* - MDS-UPDRS), uma escala desenvolvida pela *International Parkinson and Movement Disorders Society* e considerado instrumento padrão-ouro na avaliação dos aspectos motores e não-motores da DP. A MDS-UPDRS é dividida em quatro partes: Parte I – aspectos não-motores da vida diária, com 13 subitens), Parte II (aspectos motores da vida diária, com 13 subitens), Parte III (avaliação motora, com 33 subitens) e Parte IV (complicações motoras, com 6 subitens), e cada subitem pode ser pontuado de 0 a 4. Ao final da avaliação, cada parte apresenta uma pontuação total, e a somatória destes valores consiste na pontuação final da MDS-UPDRS (GOETZ et al., 2008).

3.3 - SELEÇÃO DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A presença de DIL foi considerada em um paciente quando a pontuação do item 4.1 da MDS-UPDRS (tempo com discinesias) foi igual ou maior que 1. A presença de DIL foi confirmada posteriormente nas avaliações clínicas periódicas registradas nos prontuários de cada paciente.

Nos indivíduos com DIL, a gravidade dos movimentos discinéticos foi avaliada pelo item 4.2 da MDS-UPDRS (impacto funcional das discinesias).

Dez pacientes foram avaliados com uma versão prévia da UPDRS (FAHN; ELTON, 1987). Para estes participantes, a pontuação da Parte III (avaliação motora) da versão prévia da Escala Unificada de Avaliação da DP foi convertida para a Parte III da MDS-UPDRS pela adição de 7 pontos, conforme

descrito anteriormente (HENTZ et al., 2015), e as pontuações dos itens 32 (frequência diária de DIL) e 33 (impacto funcional das DIL) da versão prévia da Escala Unificada de Avaliação da DP foram usadas como as mesmas pontuações para os itens 4.1 e 4.2 da MDS-UPDRS, respectivamente, por suas similaridades.

3.4 - EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico através do seguinte protocolo: o sangue coletado com EDTA foi transferido para um tubo de 50 ml, onde foi adicionado o tampão de lise I gelado. O sangue e o tampão de lise I foram misturados e centrifugados por 8 minutos a 3240 rpm a +4°C. Após se desprezar o sobrenadante, foi adicionado ao precipitado tampão de lise II, SDS 10% e perclorato de sódio 5 M e a solução foi agitada vigorosamente por 20 segundos.

Para extração das proteínas, foi adicionado à solução NaCl 6 M e após agitada vigorosamente e centrifugada por 8 minutos a 3240 rpm em temperatura ambiente. Após se desprezar o sobrenadante, foi adicionado isopropanol absoluto, e o DNA precipitado foi cuidadosamente removido. A amostra de DNA foi lavada e hidratada com álcool, e após armazenada em freezer.

3.5 - GENOTIPAGEM

Todos os indivíduos foram genotipados para oito SNPs: gene *COMT* – SNP rs4680, gene *ANKK1* – SNP rs1800497, gene *DRD3* – SNP rs6280, gene *DAT1* – SNP rs393795, gene *MAOB* – SNP rs1799836, gene *BDNF* – SNP rs6265, gene *ADORA2A* – SNP rs2298383 e gene *NOS1* – SNP rs2682826.

A genotipagem foi realizada no centro coordenador do LARGE-PD em Seattle, Washington, E.U.A. (Universidade de Washington - *VA Puget Sound Health Care System*), através de ensaios de para discriminação alélica TaqMan SNP (Applied Biosystems, Califórnia, E.U.A.) em um sequenciador 7900HT (ABI Prism, Califórnia, E.U.A.).

Esta metodologia de genotipagem (TaqMan) se baseia na associação da técnica de amplificação do DNA através de PCR em tempo real e na utilização de sondas para marcar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados, através de fluorescência. É considerada como uma técnica sensível para se determinar a presença ou ausência de sequências específicas de DNA, de execução pouco complexa e capaz de analisar várias amostras em um curto espaço de tempo (ISLER; VERTERGVIIST; BURCZYNSKI, 2007). Foram adquiridos *primers* e sondas (Assay Mix) específicas para detecção de cada um dos SNPs listados acima (Applied Biosystems, Califórnia, E.U.A.).

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.6.1 - ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS para Windows versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, E.U.A.). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade da hipótese de nulidade (p) fosse menor que 0.05. As variáveis quantitativas foram descritas na forma de mediana e intervalo interquartil. As diferenças entre medianas e proporções foram comparadas através dos testes de Mann-Whitney e do qui-quadrado, respectivamente.

Foram realizadas análises de regressão logística univariadas entre a variável dependente binária (presença ou ausência de DIL) e cada uma das 20 variáveis independentes estudadas: sexo, idade no início dos sintomas de DP, duração do tratamento com L-DOPA, LEDD no momento da avaliação, duração da DP, pontuação na MDS-UPDRS Parte III, estadiamento Hoehn & Yahr, fenótipo clínico motor da doença, história familiar de DP, consumo regular de café (> 1 xícara/dia), consumo regular de chá preto (> 1 xícara/dia), consumo regular de refrigerante de cola (> 1 copo/dia), uso frequente de anti-inflamatórios não-esteroidais (> 1 vez/semana), história de traumatismo cranioencefálico com alteração de consciência prévio, trabalho prévio com pesticidas ou produtos químicos em geral, residência próxima a plantações até os 25 anos de idade, trabalho prévio em plantações, trabalho prévio com metais pesados, história de tabagismo (> 100 cigarros na vida) e de etilismo regular (toda semana por, pelo menos, 6 meses). Foram calculados valores de *odds ratio* (OR), intervalo de confiança 95% (IC 95%) e valor de p (teste bicaudal).

Foram selecionadas as variáveis independentes mais relacionadas com o surgimento de DIL, se o valor de p fosse inferior a 0.1 na análise univariada. As variáveis independentes selecionadas foram adicionadas em um modelo de regressão logística multivariada (estratégia *stepwise*) para se investigar o potencial efeito de risco ou protetor das variáveis no surgimento de DIL. Testes de multicolinearidade foram realizados.

A probabilidade cumulativa de surgimento de DIL ao longo do tempo foi estimada através de curvas de Kaplan-Meier, sendo que os pacientes com DP sem discinesia foram considerados como dados censurados, e a duração do tratamento com L-DOPA a variável de tempo usada nestes casos. A possível correlação das curvas de tempo de sobrevivência (tempo entre início do tratamento com L-DOPA e o surgimento de DIL) com diferentes as variáveis independentes foi testada pelo teste de *log rank*.

3.6.2 - ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A análise estatística genética foi realizada com o programa STATA versão 14.0 (StataCorp, Texas, E.U.A.). O equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos SNPs testados foi avaliado através do teste exato de Fisher. A associação entre os SNPs e o surgimento de DIL foi testada através de análise de regressão logística multivariada com um modelo aditivo, ajustada para sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA. A associação entre os SNPs e frequência diária das DIL (medida pelo item 4.1 da MDS-UPDRS), ou entre SNPs e o impacto funcional das DIL (mensurado pelo item 4.2 da MDS-UPDRS), foi testada através de uma análise de regressão ordinal, ajustada para sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA.

O teste de *log rank* foi aplicado para as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com a finalidade de avaliar a diferença de tempo de surgimento de DIL entre os genótipos dos polimorfismos associados às discinesias.

4 - RESULTADOS

4.1 - RESULTADOS DA ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

4.1.1 - CASUÍSTICA

Durante o período de maio de 2007 a fevereiro de 2014, o estudo recrutou 268 pacientes com DP. Sessenta e nove pacientes foram excluídos por não se adequarem aos critérios de inclusão. Ao final, os dados de 199 pacientes com DP foram analisados. As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com e sem DIL podem ser observadas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3: Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com DP, comparados de acordo com a presença de DIL. * - Valor de p referente ao teste de Mann-Whitney entre medianas de pacientes com e sem DIL, ‡ - Valor de p referente ao teste do qui-quadrado entre frequências de pacientes com e sem DIL. Os valores entre parênteses expressam o intervalo interquartil das medianas.

Variável	DP com Discinesia (n = 96)	DP sem Discinesia (n = 103)	Valor de p
Idade na Avaliação	59 (52-68)	64 (54-71)	0.04*
Idade no Início dos Sintomas	46 (39-55)	56 (48-66)	<0.0001*
Idade no Diagnóstico de DP	48 (42-56)	58 (49-66)	<0.0001*
Duração da DP (anos)	13 (8-16)	6 (4-9)	<0.0001*
Fenótipo Clínico DP - PIGD (%)	60.4	17.6	<0.0001‡
Estadiamento Hoehn & Yahr	2 (2-3)	2 (2-2)	0.0001*
MDS-UPDRS Parte III	33.5 (20-46)	28 (17-41)	0.04*
Sexo (Proporção Homem:Mulher)	1.28:1	1.64:1	0.71‡
Duração do Tratamento com L-DOPA (anos)	10 (5-13)	2 (1-5)	<0.0001*
LEDD na Avaliação (mg/dia)	900 (643-1150)	575 (300-700)	<0.0001*
História de DP Familiar (%)	31.2	28.1	0.63‡
Uso Regular de Café (%)	59.4	68.9	0.16‡
Uso Regular de Chá Preto (%)	11.5	12.6	0.8‡
Uso Regular de Refrigerante de Cola (%)	21.9	8.7	0.01‡
Uso Frequente de AINEs (%)	8.3	13.6	0.23‡
História de TCE com Perda de Consciência (%)	19.8	21.4	0.78‡
Trabalho Prévio com Produtos Químicos (%)	22.9	23.3	0.94‡
Residência Próxima a Plantações até 25 anos (%)	54.2	47.6	0.35‡
Trabalho Prévio em Plantações (%)	46.9	43.7	0.65‡
Trabalho Prévio com Metais Pesados (%)	11.5	8.7	0.52‡
História de Tabagismo (%)	38.5	38.8	0.96‡
História de Etilismo (%)	45.8	47.6	0.8‡

Na comparação entre os grupos, percebe-se que os pacientes com DIL são mais jovens, tanto na idade de surgimento da doença, quanto no momento do diagnóstico e na idade em que foi feita a avaliação. Além disso, este grupo apresenta DP há mais tempo, com maior gravidade (baseado no estadiamento Hoehn & Yahr), maior comprometimento motor (baseado na MDS-UPDRS Parte III) e maior frequência de pessoas com fenótipo motor PIGD. Em comparação com os pacientes sem DIL, os pacientes com movimentos discinéticos têm maior tempo de uso e maiores doses diárias equivalentes de L-DOPA. Não houve diferenças no surgimento de DIL entre os sexos. Houve maior proporção de pessoas com uso regular de refrigerante de cola no grupo com DIL.

4.1.2 – CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Para os 96 pacientes com DIL incluídos no estudo, foram coletadas informações adicionais referentes ao surgimento dos movimentos anormais. Os seguintes dados clínicos foram registrados e analisados: intervalo de tempo entre início do tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL, duração das DIL, pontuação na MDS-UPDRS Parte IV e LEDD no período do surgimento das DIL. Em 11 pacientes, foi realizada a versão prévia da Escala Unificada de Avaliação da DP, e como não há regras de correção para a pontuação da MDS-UPDRS Parte IV, seus dados de pontuação da Parte IV foram excluídos.

A tabela abaixo resume as características dos pacientes portadores de DIL, comparados de acordo com a idade no momento da avaliação (Tabela 4).

Tabela 4: Dados clínicos de pacientes com DP que desenvolveram DIL, comparados de acordo com a idade no momento da avaliação. Os valores de p são referentes ao teste de Mann-Whitney entre medianas de pacientes com idade abaixo e acima de 60 anos, no momento da avaliação. Os valores entre parênteses expressam o intervalo interquartil das medianas.

Variável	Total (n = 96)	Idade < 60a (n = 52)	Idade > 60a (n = 44)	Valor de p
Duração da DP (anos)	13 (8-16)	13 (7-15)	12 (8-18)	0.82
Duração do Tratamento com L-DOPA (anos)	10 (1-13)	10 (5-13)	9 (6-14)	0.59
Intervalo Início L-DOPA e DIL (anos)	4 (2-8)	2 (1-6)	5 (3-8)	0.009
Duração das DIL (anos)	4.5 (1-8)	5 (1-9)	3 (1-6)	0.42
MDS-UPDRS Parte III	33.5 (20-46)	33.5 (19-46)	33.5 (23-45)	0.73
MDS-UPDRS Parte IV	7 (4-11)	7.5 (6-12)	6 (4-10)	0.04
MDS-UPDRS Item 4.1 (Tempo com Discinesia)	2 (1-3)	2 (1-3)	1 (1-3)	0.67
MDS-UPDRS Item 4.2 (Impacto Funcional)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)	0.73
LEDD na Avaliação (mg/dia)	900 (643-1150)	925 (700-1150)	875 (587-1162)	0.47
LEDD no Surgimento da DIL (mg/dia)	550 (400-825)	600 (400-825)	537 (400-843)	0.88

No geral, os pacientes com DIL têm mais que 10 anos de DP, assim como um longo tempo de tratamento com L-DOPA. As DIL surgem após 4 a 5 anos de tratamento com L-DOPA, com níveis moderados de LEDD, ocorrendo em menos de 50% do tempo de ON e com pequeno impacto funcional. Os pacientes com DIL acima de 60 anos demoraram mais tempo para desenvolver o fenômeno e têm menos queixas relativas às complicações motoras (DIL, flutuações motoras, distonias dolorosas), quando comparados aos pacientes com menos de 60 anos.

Consideramos que existem pacientes com maior suscetibilidade para o surgimento de DIL, e uma maneira de avaliar esta hipótese é comparar o intervalo de tempo entre início do tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL. Para fins de análise, os pacientes com DP discinéticos foram divididos em “precoces” (surgimento de DIL inferior a 5 anos de tratamento com L-DOPA) e “tardios” (surgimento de DIL após 5 anos de tratamento com L-DOPA). Dezoito pacientes não tinham dados confiáveis sobre o intervalo entre início de tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL e foram excluídos da análise (total final de 78 pacientes com DIL).

A tabela abaixo resume algumas características dos pacientes portadores de DIL, comparados de acordo com o intervalo de tempo entre início do tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL (Tabela 5).

Tabela 5: Dados clínicos de pacientes com DP que desenvolveram DIL, comparados de acordo com o intervalo de tempo entre início do tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL. * - Valor de p referente ao teste de Mann-Whitney entre medianas de pacientes com e sem DIL, ‡ - Valor de p referente ao teste do qui-quadrado entre frequências de pacientes com e sem DIL. Os valores entre parênteses expressam o intervalo interquartil das medianas.

Variável	DIL Precoce (n = 44)	DIL Tardia (n = 34)	Valor de p
Idade no Início dos Sintomas	45.5 (39-57)	46.5 (41-56)	0.91*
Duração da DP (anos)	9.5 (6-14)	15 (12-19)	<0.0001*
Duração do Tratamento com L-DOPA (anos)	6 (3-11)	12.5 (9-14)	<0.0001*
Duração das DIL (anos)	3 (1-8)	4 (1-7)	0.99*
Sexo (Proporção Homem:Mulher)	0.69:1	3.25:1	0.002‡
Fenótipo Clínico DP - PIGD (%)	56.8	58.8	0.67‡
MDS-UPDRS Parte III	33.5 (17-46)	33 (24-43)	0.55*
MDS-UPDRS Parte IV	6 (4-10)	7 (5-11)	0.36*
MDS-UPDRS Item 4.1 (Tempo com Discinesia)	2 (1-3)	1 (1-3)	0.19*
MDS-UPDRS Item 4.2 (Impacto Funcional)	1 (0-2)	1 (0-2)	0.56*
LEDD na Avaliação (mg/dia)	850 (512-1163)	950 (700-1138)	0.52*
LEDD no Surgimento da DIL (mg/dia)	500 (350-758)	750 (500-962)	0.005*

Estes resultados mostram que pacientes com DIL precoce (< 5 anos de uso de L-DOPA) apresentam menor duração de doença e de uso de L-DOPA, assim como uso de menores doses de L-DOPA no momento do surgimento das discinesias, em comparação com os que desenvolveram DIL tardiamente (> 5 anos de uso de L-DOPA). Além disso, a proporção de pacientes do sexo feminino no grupo de DIL precoce foi consideravelmente mais elevada.

4.1.3 – ANÁLISE UNIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Foram realizadas análises univariadas (regressão logística) isoladas entre a presença de DIL (variável dependente) e cada uma das 20 variáveis independentes estudadas. Um total de 199 indivíduos foi analisado. A tabela 6 mostra as estatísticas de cada análise.

Tabela 6: Análise de regressão logística univariada para os fatores de risco clínicos associados à DIL. B – Coeficiente de regressão, OR – *odds ratio*, IC 95% - intervalo de 95% de confiança.

Variável	B	OR	IC 95%	Valor de <i>p</i>
Idade no Início dos Sintomas	-0.05	0.94	0.92-0.96	< 0.0001
Duração da DP (anos)	0.24	1.27	1.17-1.37	< 0.0001
Fenótipo Clínico DP (Referência PIGD)				
Tremor-Dominante	-2.04	0.13	0.06-0.25	< 0.0001
Indeterminado	-1.52	0.21	0.07-0.65	0.007
Estadiamento Hoehn & Yahr	0.97	2.64	1.54-4.52	< 0.0001
MDS-UPDRS Parte III	0.008	1.008	0.99-1.02	0.32
Sexo	-0.24	0.78	0.44-1.38	0.39
Duração do Tratamento com L-DOPA (anos)	0.32	1.38	1.25-1.53	< 0.0001
LEDD na Avaliação (mg/dia)	0.003	1.003	1.002-1.004	< 0.0001
História de DP Familiar	0.14	1.16	0.63-2.13	0.63
Uso Regular de Café	-0.41	0.65	0.36-1.18	0.16
Uso Regular de Chá Preto	-0.11	0.89	0.38-2.1	0.8
Uso Regular de Refrigerante de Cola	1.07	2.92	1.27-6.76	0.01
Uso Frequente de AINEs	-0.54	0.57	0.23-1.44	0.24
História de TCE com Perda de Consciência	-0.09	0.9	0.45-1.8	0.78
Trabalho Prévio com Produtos Químicos	-0.22	0.97	0.5-1.89	0.94
Residência Próxima a Plantações até 25 anos	0.26	1.3	0.74-2.27	0.35
Trabalho Prévio em Plantações	0.12	1.13	0.65-1.98	0.65
Trabalho Prévio com Metais Pesados	0.3	1.35	0.53-3.42	0.52
História de Tabagismo	-0.01	0.98	0.55-1.74	0.96
História de Etilismo	-0.07	0.93	0.53-1.62	0.8

Estas 7 variáveis independentes apresentaram relação com o surgimento de DIL, de acordo com o critério de um valor de $p < 0.1$ na análise univariada: idade no início dos sintomas de DP, duração da DP, fenótipo clínico motor da DP, estadiamento Hoehn & Yahr, duração do tratamento com L-DOPA, LEDD no momento da avaliação e consumo regular de refrigerante de cola.

4.1.4 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Para se investigar o potencial efeito de risco ou protetor das variáveis clínicas no surgimento de DIL, foi construído um modelo multivariado (regressão logística) incluindo as 7 variáveis independentes selecionadas na análise univariada. Pela estratégia *stepwise*, as variáveis independentes são excluídas do modelo final. Um total de 198 indivíduos foi analisado, e não houve colinearidade. A tabela 7 mostra as estatísticas deste modelo.

Tabela 7: Análise de regressão logística multivariada para os fatores de risco clínicos associados à DIL. B – Coeficiente de regressão, OR – *odds ratio*, IC 95% - intervalo de 95% de confiança.

Variável	B	OR	IC 95%	Valor de p
Idade no Início dos Sintomas	-0.04	0.95	0.92-0.99	0.009
Fenótipo Clínico DP (Referência PIGD)				
Tremor-Dominante	-1,74	0,17	0,07-0,39	< 0.0001
Indeterminado	-1.28	0.27	0.07-1.09	0.06
Duração do Tratamento com L-DOPA (anos)	0.27	1.31	1.17-1.47	< 0.0001
LEDD na Avaliação (mg/dia)	0.001	1.001	1.000-1.002	0.04

As variáveis independentes excluídas foram: duração da DP, estadiamento Hoehn & Yahr e consumo regular de refrigerante de cola. O presente modelo mostra que idade no início dos sintomas de DP, fenótipo clínico motor da DP, duração do tratamento com L-DOPA e LEDD no momento da avaliação são as variáveis clínicas mais associadas com o risco de surgimento de DIL.

Após, foi construído um novo modelo multivariado sem a inclusão das variáveis excluídas no primeiro modelo (duração da DP, estadiamento Hoehn & Yahr e consumo regular de refrigerante de cola). Neste

segundo modelo, não houve modificação nos valores de p e nem nos coeficientes de regressão, indicando que o início dos sintomas de DP, fenótipo clínico motor da DP, duração do tratamento com L-DOPA e LEDD no momento da avaliação são as variáveis essenciais do modelo, em definitivo.

Neste modelo final, foi vista uma relação inversa entre idade no início dos sintomas de DP e o risco de DIL, e a redução de um ano na idade do início dos sintomas da DP aumenta em 5% a chance de DIL. Em relação à duração do tratamento com L-DOPA e LEDD na avaliação, a relação foi direta: a cada ano adicional de tratamento com L-DOPA, a chance de DIL aumentou em 31%, enquanto que a cada 100 mg de LEDD, a chance de DIL se elevou em 10%.

Contudo, a variável independente com maior impacto sobre o risco de surgimento de DIL foi o fenótipo clínico motor. Os pacientes com fenótipo PIGD apresentaram uma chance 5.88 vezes maior de desenvolver DIL, em relação aos pacientes com fenótipo tremor-dominante.

4.1.5 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Conforme descrito acima, os fatores de risco clínicos mais associados ao surgimento de DIL foram início dos sintomas de DP, fenótipo clínico motor da DP, duração do tratamento com L-DOPA e LEDD no momento da avaliação.

Como a duração do tratamento com L-DOPA covaria diretamente com a variável de tempo utilizada pela análise de sobrevivência (tempo desde início do tratamento com L-DOPA), utilizamos apenas as variáveis início dos sintomas de DP, fenótipo clínico motor da DP e LEDD no momento da avaliação para construção de modelos de sobrevivência para se avaliar a probabilidade cumulativa do surgimento de DIL desde o início do tratamento com L-DOPA.

As variáveis contínuas foram dicotomizadas a partir de suas medianas. Um número de 18 (início dos sintomas e LEDD) e 19 (fenótipo clínico motor) participantes foi excluído da análise por informações perdidas.

As figuras abaixo mostram as curvas de sobrevivência relativas à probabilidade cumulativa de se desenvolver DIL de acordo com as variáveis testadas. De acordo com o teste de *log rank*, o início dos sintomas de DP antes dos 50 anos ($p = 0.007$), a forma clínica PIGD ($p < 0.001$) e uso de doses

maiores que 700 mg/dia ($p = 0.02$) estiveram associados a uma maior probabilidade de surgimento de DIL.

Figura 4: Curva de Kaplan-Meier mostrando a probabilidade cumulativa de não surgir DIL relacionada à idade de início dos sintomas da doença em uma série de 181 pacientes com DP.

De acordo com a curva da figura 4, os indivíduos com início de sintomas antes dos 50 anos têm uma probabilidade cumulativa de não desenvolverem DIL no valor de 51% após 5 anos de uso de L-DOPA, e de 29% após 9 anos de tratamento com a medicação. Os pacientes com início de sintomas após os 50 anos têm probabilidade de não terem DIL em 73% e 31% após 5 e 9 anos de uso de L-DOPA, respectivamente.

Figura 5: Curva de Kaplan-Meier mostrando a probabilidade cumulativa de não surgir DIL relacionada ao fenótipo clínico motor em uma série de 180 pacientes com DP. PIGD – *Postural instability with gait disorder*; TD – Tremor-dominante.

De acordo com a curva da figura 5, os indivíduos com fenótipo motor PIGD têm uma probabilidade cumulativa de não desenvolverem DIL no valor de 51% após 5 anos de uso de L-DOPA, e de 12% após 9 anos de tratamento com a medicação. Os pacientes com fenótipo motor tremor-dominante têm probabilidade de não terem DIL em 78% e 50% após 4 e 9 anos de uso de L-DOPA, respectivamente.

Figura 6: Curva de Kaplan-Meier mostrando a probabilidade cumulativa de não surgir DIL relacionada à LEDD no momento da avaliação em uma série de 181 pacientes com DP.

De acordo com a curva da figura 6, os indivíduos com LEDD inferior a 700 mg/dia no momento da avaliação têm uma probabilidade cumulativa de não desenvolverem DIL no valor de 73% após 5 anos de uso de L-DOPA, e de 33% após 11 anos de tratamento com a medicação. Os pacientes com LEDD maior que 700 mg/dia no momento da avaliação têm probabilidade de não terem DIL em 55% e 16% após 5 e 11 anos de uso de L-DOPA, respectivamente.

4.2 - RESULTADOS DA ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

4.2.1 – DADOS DA GENOTIPAGEM

Dentre os 199 pacientes selecionados para análise dos fatores de risco clínico, 186 indivíduos foram genotipados para oito SNPs: gene *COMT* – SNP rs4680, gene *ANKK1* – SNP rs1800497, gene *DRD3* – SNP rs6280, gene *DAT1* – SNP rs393795, gene *MAOB* – SNP rs1799836, gene *BDNF* – SNP rs6265, gene *ADORA2A* – SNP rs2298383 e gene *NOS1* – SNP rs2682826. Todos os SNPs foram genotipados com sucesso. Apenas um indivíduo do grupo DP com DIL não pode ser genotipado para os SNPs rs6280 (gene *DRD3*) e rs6265 (gene *BDNF*). Todos os SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A frequência dos genótipos dos SNPs analisados está descrita na tabela abaixo (Tabela 8). Quando o grupo de pacientes com DIL foi comparado com o grupo sem discinesias, a frequência do genótipo TT do SNP rs1799836 no gene *MAOB* apresentou uma tendência a ser maior no grupo com DIL (estatística $X^2 = 3.14$; $p = 0.07$), porém apenas em indivíduos do sexo masculino. Não houve diferenças estatísticas na frequência de genótipos de indivíduos com e sem DIL para os outros SNPs.

Tabela 8: Frequência de genótipos e alelos em 186 pacientes com DP. O valor de p se refere ao teste do qui-quadrado para comparação das frequências dos genótipos entre pacientes com e sem DIL.

Genótipo	Todos os pacientes (n = 186)	DP com Discinesia (n = 91)	DP sem Discinesia (n = 95)	Valor de p
COMT - rs4680				0.39
AA	33 (17.7)	16 (17.5)	17 (17.8)	
AG	82 (44.1)	36 (39.5)	46 (48.4)	
GG	71 (38.2)	39 (42.8)	32 (33.6)	
<i>Alelo</i>				
A	39.7	37.3	42.1	
G	60.2	62.6	57.8	
ANKK1 - rs1800497				0.31
AA	8 (4.3)	6 (6.6)	2 (2.1)	
AG	70 (37.6)	33 (36.3)	37 (38.9)	
GG	108 (58.1)	52 (57.1)	56 (58.9)	
<i>Alelo</i>				
A	23.1	24.7	21.5	
G	76.8	75.2	78.4	
DRD3 - rs6280				0.48
CC	37 (19.9)	15 (16.7)	22 (23.2)	
CT	88 (47.3)	46 (51.1)	42 (44.2)	
TT	60 (32.3)	29 (32.2)	31 (32.6)	
<i>Alelo</i>				
C	43.7	42.2	45.2	
T	56.2	57.7	54.7	
DAT1 - rs393795				0.78
GG	117 (62.9)	59 (64.8)	58 (61.1)	
GT	59 (31.7)	28 (30.8)	31 (32.6)	
TT	10 (5.4)	4 (4.4)	6 (6.3)	
<i>Alelo</i>				
G	78.7	80.2	77.3	
T	21.2	19.7	22.6	
MAOB - rs1799836				0.46
<i>Sexo Feminino</i>				
CC	23 (29.8)	11 (26.8)	12 (33.3)	
CT	34 (44.1)	17 (41.4)	17 (47.2)	
TT	20 (25.9)	13 (31.7)	7 (19.4)	
<i>Sexo Masculino</i>				0.07
C	58 (53.2)	22 (44)	36 (61)	
T	51 (46.7)	28 (56)	23 (38.9)	
<i>Alelo (Ambos Sexos)</i>				
C	52.6	45.6	59.4	
T	47.3	54.4	40.5	
BDNF - rs6265				0.55
CC	129 (69.4)	60 (66.7)	69 (72.6)	
CT	51 (27.4)	28 (31.1)	23 (24.2)	
TT	5 (2.7)	2 (2.2)	3 (3.2)	
<i>Alelo</i>				
C	83.5	82.2	84.7	
T	16.4	17.7	15.2	
ADORA2A - rs2298383				0.11
CC	35 (18.8)	22 (24.2)	13 (13.7)	
CT	92 (49.5)	39 (42.9)	53 (55.8)	
TT	59 (31.7)	30 (33)	29 (30.5)	
<i>Alelo</i>				
C	43.5	45.6	41.5	
T	56.4	54.4	58.4	

(Continua)

Genótipo	Todos os pacientes (n = 186)	DP com Discinesia (n = 91)	DP sem Discinesia (n = 95)	Valor de <i>p</i>
NOS1 - rs2682826				0.99
AA	12 (6.5)	6 (6.6)	6 (6.3)	
AG	74 (39.8)	36 (39.6)	38 (40)	
GG	100 (53.8)	49 (53.8)	51 (53.7)	
<i>Alelo</i>				
A	26.3	26.3	26.3	
G	73.6	73.6	73.6	

4.2.2 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS

Para se investigar o potencial efeito de risco ou protetor dos SNPs selecionados no surgimento de DIL, foram construídos modelos multivariados (regressão logística) para cada SNP, que incluíram como variáveis independentes a frequência do genótipo mais raro do SNP analisado e três fatores clínicos relevantes neste estudo: sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA. Um total de 179 indivíduos foi analisado, e não houve colinearidade. A tabela 9 mostra as estatísticas destes modelos.

Tabela 9: Análises de regressão logística multivariada para os SNPs associados à DIL. B – Coeficiente de regressão, OR – odds ratio, IC 95% - intervalo de 95% de confiança.

Variável	B	OR	IC 95%	Valor de p
COMT - rs4680				
Alelo A	-1.15	0.73	0.44-1.23	0.24
Sexo	-0.95	0.68	0.32-1.48	0.34
Idade no Início dos Sintomas	-2.61	0.95	0.92-0.98	0.009
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.83	1.39	1.24-1.55	< 0.0001
ANKK1 - rs1800497				
Alelo A	0.6	1.22	0.63-2.33	0.54
Sexo	-0.83	0.72	0.33-1.54	0.4
Idade no Início dos Sintomas	-2.61	0.95	0.92-0.98	0.009
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.84	1.38	1.24-1.54	< 0.0001
DRD3 - rs6280				
Alelo C	-1.3	0.7	0.41-1.19	0.19
Sexo	-0.89	0.7	0.32-1.51	0.37
Idade no Início dos Sintomas	-2.87	0.95	0.92-0.98	0.004
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.86	1.38	1.23-1.53	< 0.0001
DAT1 - rs393795				
Alelo T	0.35	1.11	0.6-2.07	0.72
Sexo	-0.85	0.71	0.33-1.53	0.39
Idade no Início dos Sintomas	-2.71	0.95	0.92-0.98	0.007
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.82	1.38	1.23-1.54	< 0.0001
MAOB - rs1799836				
Alelo T	1.96	1.51	1.00-2.28	0.05
Sexo	-0.84	0.71	0.33-1.54	0.4
Idade no Início dos Sintomas	-2.72	0.95	0.92-0.98	0.006
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.78	1.38	1.23-1.54	< 0.0001
BDNF - rs6265				
Alelo T	-0.78	0.74	0.35-1.56	0.43
Sexo	-0.86	0.71	0.33-1.53	0.39
Idade no Início dos Sintomas	-2.67	0.95	0.92-0.98	0.008
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.87	1.38	1.24-1.54	< 0.0001
ADORA2A - rs2298383				
Alelo C	0.68	1.19	0.71-2.01	0.49
Sexo	-0.82	0.72	0.34-1.55	0.41
Idade no Início dos Sintomas	-2.67	0.95	0.92-0.98	0.008
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.82	1.37	1.23-1.53	< 0.0001
NOS1 - rs2682826				
Alelo A	0.19	1.05	0.58-1.92	0.85
Sexo	-0.82	0.72	0.34-1.55	0.41
Idade no Início dos Sintomas	-2.71	0.95	0.92-0.98	0.007
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.83	1.38	1.23-1.53	< 0.0001

A tabela mostra que apenas o alelo T do SNP rs1799836 ligado ao gene *MAOB* apresentou uma associação com o surgimento de DIL, aumentando o risco desta complicação em 51% para cada alelo

T presente em ambos os cromossomos. Mesmo se tratando de um gene ligado ao X, os indivíduos com alelo T do sexo feminino (homozigotos) e do sexo masculino (hemizigotos) foram analisados em conjunto. A associação do genótipo com o risco de surgimento de DIL persistiu mesmo com ajuste para sexo.

Quando a mesma análise é feita entre pacientes do sexo feminino (genótipo TT) e do sexo masculino (genótipo T0) de modo separado, não há associação entre os alelos do SNP e o surgimento de DIL (sexo feminino – coeficiente B = 0.91, OR 2.5, IC 95% 0.55-11.34, $p = 0.23$; sexo masculino – coeficiente B = 0.82, OR 2.29, IC 95% 0.82-6.36, $p = 0.11$).

4.2.3 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE A FREQUÊNCIA DIÁRIA DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS

Para se investigar o potencial efeito dos SNPs selecionados na frequência diária das DIL (baseada no item 4.1 da MDS-UPDRS), foram construídos modelos multivariados por regressão ordinal para cada SNP, que incluíram como variáveis independentes a frequência do genótipo mais raro do SNP analisado e três fatores clínicos relevantes neste estudo: sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA. Um total de 179 indivíduos foi analisado. A tabela 10 mostra as estatísticas destes modelos.

Tabela 10: Análises de regressão ordinal multivariada para os SNPs associados à frequência diária de DIL. B – Coeficiente de regressão, OR – *odds ratio*, IC 95% - intervalo de 95% de confiança.

Variável	B	OR	IC 95%	Valor de p
COMT - rs4680				
Alelo A	-0.28	0.94	0.61-1.44	0.78
Sexo	-0.55	0.83	0.45-1.56	0.58
Idade no Início dos Sintomas	-2.09	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.39	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
ANKK1 - rs1800497				
Alelo A	-0.22	0.94	0.56-1.57	0.82
Sexo	-0.51	0.85	0.45-1.58	0.61
Idade no Início dos Sintomas	-2.1	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.4	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
DRD3 - rs6280				
Alelo C	-1.76	0.67	0.42-1.04	0.07
Sexo	-0.64	0.81	0.43-1.52	0.61
Idade no Início dos Sintomas	-2.33	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.49	1.19	1.12-1.27	< 0.0001
DAT1 - rs393795				
Alelo T	0.44	1.12	0.66-1.89	0.66
Sexo	-0.52	0.84	0.45-1.57	0.61
Idade no Início dos Sintomas	-2.07	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.4	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
MAOB - rs1799836				
Alelo T	2.2	1.45	1.04-2.04	0.02
Sexo	-0.51	0.85	0.45-1.58	0.61
Idade no Início dos Sintomas	-2.1	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.38	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
BDNF - rs6265				
Alelo T	-0.15	0.95	0.51-1.75	0.88
Sexo	-0.52	0.84	0.45-1.57	0.6
Idade no Início dos Sintomas	-2.09	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.37	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
ADORA2A - rs2298383				
Alelo C	0.2	1.04	0.67-1.61	0.84
Sexo	-0.53	0.84	0.45-1.56	0.59
Idade no Início dos Sintomas	-2.09	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.39	1.18	1.11-1.26	< 0.0001
NOS1 - rs2682826				
Alelo A	-0.46	0.89	0.54-1.45	0.64
Sexo	-0.56	0.83	0.45-1.55	0.57
Idade no Início dos Sintomas	-2.1	0.97	0.94-0.99	0.03
Duração do Tratamento com L-DOPA	5.39	1.18	1.11-1.26	< 0.0001

A tabela mostra que apenas o genótipo TT do SNP rs1799836 ligado ao gene MAOB apresentou uma associação com a frequência diária de DIL. O achado significa que indivíduos com este genótipo têm

um risco 45% maior de ter alta frequência diária de DIL. Também foi visto que há uma tendência de associação inversa entre o genótipo CC do SNP rs6280 ligado ao gene *DRD3* e a frequência diária de DIL ($p = 0.07$).

4.2.4 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE O IMPACTO FUNCIONAL DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS

Para se investigar o potencial efeito dos SNPs selecionados no impacto funcional das DIL (baseada no item 4.2 da MDS-UPDRS), foram construídos modelos multivariados por regressão ordinal para cada SNP, que incluíram como variáveis independentes a frequência do genótipo mais raro do SNP analisado e três fatores clínicos relevantes neste estudo: sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA. Um total de 178 indivíduos foi analisado. A tabela 11 mostra as estatísticas destes modelos.

Tabela 11: Análises de regressão ordinal multivariada para os SNPs associados ao impacto funcional das DIL. B – Coeficiente de regressão, OR – *odds ratio*, IC 95% - intervalo de 95% de confiança.

Variável	B	OR	IC 95%	Valor de p
COMT - rs4680				
Alelo A	-0.6	0.86	0.53-1.39	0.55
Sexo	-1.35	0.62	0.32-1.23	0.17
Idade no Início dos Sintomas	-0.99	0.98	0.95-1.01	0.32
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.27	1.14	1.07-1.22	< 0.0001
ANKK1 - rs1800497				
Alelo A	-1.71	0.58	0.31-1.07	0.08
Sexo	-1.33	0.63	0.32-1.24	0.18
Idade no Início dos Sintomas	-1.29	0.98	0.95-1.00	0.19
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.37	1.15	1.08-1.22	< 0.0001
DRD3 - rs6280				
Alelo C	-0.74	0.84	0.53-1.33	0.45
Sexo	-1.32	0.63	0.32-1.24	0.18
Idade no Início dos Sintomas	-1.11	0.98	0.95-1.01	0.26
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.31	1.15	1.07-1.22	< 0.0001
DAT1 - rs393795				
Alelo T	-0.01	0.99	0.57-1.71	0.99
Sexo	-1.29	0.64	0.33-1.25	0.19
Idade no Início dos Sintomas	-1.03	0.98	0.95-1.01	0.30
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.25	1.14	1.07-1.22	< 0.0001
MAOB - rs1799836				
Alelo T	1.59	1.34	0.93-1.94	0.11
Sexo	-1.33	0.63	0.32-1.24	0.18
Idade no Início dos Sintomas	-0.97	0.98	0.95-1.01	0.33
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.24	1.14	1.07-1.22	< 0.0001
BDNF - rs6265				
Alelo T	0.44	1.16	0.59-2.25	0.65
Sexo	-1.31	0.64	0.32-1.24	0.19
Idade no Início dos Sintomas	-1.06	0.98	0.95-1.01	0.29
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.19	1.14	1.07-1.22	< 0.0001
ADORA2A - rs2298383				
Alelo C	0.33	1.08	0.67-1.73	0.73
Sexo	-1.31	0.63	0.32-1.24	0.18
Idade no Início dos Sintomas	-1.02	0.98	0.95-1.01	0.30
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.26	1.14	1.07-1.22	< 0.0001
NOS1 - rs2682826				
Alelo A	1.35	1.44	0.84-2.45	0.17
Sexo	-1.19	0.66	0.33-1.29	0.23
Idade no Início dos Sintomas	-1.0	0.98	0.95-1.01	0.31
Duração do Tratamento com L-DOPA	4.34	1.15	1.07-1.22	< 0.0001

A tabela mostra que nenhum SNP apresentou associação com o impacto funcional das DIL.

4.2.5 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DO SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E O POLIMORFISMO rs1799836 DO GENE MAOB

Conforme descrito acima, o SNP analisado mais associado com surgimento de DIL foi o rs1799836 do gene MAOB. Este SNP foi utilizado para a construção de um modelo de sobrevivência para se avaliar a probabilidade cumulativa do surgimento de DIL desde o início do tratamento com L-DOPA, de acordo com o genótipo deste polimorfismo. Um número de 19 participantes foi excluído da análise por informações perdidas.

A figura abaixo mostra a curva de sobrevivência relativa à probabilidade cumulativa de se desenvolver DIL de acordo com o genótipo do SNP rs1799836 (Figura 7). De acordo com o teste de *log rank*, o genótipo TT não esteve associado a uma maior probabilidade de surgimento de DIL em relação aos genótipos CC e CT juntos ($p = 0.38$).

Figura 7: Curva de Kaplan-Meier mostrando a probabilidade cumulativa de não surgir DIL relacionada ao genótipo do SNP rs1799836 do gene MAOB em uma série de 167 pacientes com DP.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

5.1.1 - CASUÍSTICA

Em comparação com a literatura prévia, o presente estudo teve um número de participantes superior a 54% dos trabalhos anteriores. Alguns destes estudos não excluíram ou não descreveram a exclusão de pacientes que não faziam uso de L-DOPA, opção que pode causar vieses negativos à análise dos dados.

O padrão do paciente com DIL retratado em nossos dados (mais jovem, com doença mais grave e mais duradoura, em uso de altas doses de L-DOPA) é muito semelhante ao pacientes com a complicação de diversos outros estudos da área.

Nenhum dos trabalhos prévios revisados descreveu a frequência de exposição a fatores ambientais específicos que elevariam o risco de desenvolvimento de DP nos participantes da casuística.

É importante se considerar um relativo grau de imprecisão referente à definição do momento de surgimento das DIL.

O método de detecção de DIL usado neste trabalho (pontuação no item 4.1 da MDS-UPDRS) foi utilizado em 9 estudos com fatores de risco clínicos e 7 estudos com fatores de risco genético, incluindo os dois trabalhos mais recentes envolvendo fatores de risco clínico (NICOLETTI et al., 2016; BJORNESTAD et al., 2016). A maioria dos estudos utilizou a percepção de DIL do paciente e/ou do médico, e uma minoria utilizou o desafio terapêutico com L-DOPA. Consideramos que o desafio terapêutico é um método trabalhoso como instrumento de triagem, e que usar apenas a percepção subjetiva de DIL pelo paciente traz risco de incluir pacientes sem movimentos discinéticos reais. Contudo, o uso isolado da Parte IV da MDS-UPDRS também considera a percepção do paciente da existência de DIL.

Para reduzirmos o risco de incluir pacientes que eventualmente não apresentavam DIL, os prontuários de todos os pacientes foram revisados, e incluímos apenas os indivíduos com DIL presente em, pelo menos, duas consultas. Com isso, pudemos selecionar os pacientes com e sem DIL em alto grau de confiança.

5.1.2 – CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DOS PACIENTES COM DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA

Nesta seção, alguns aspectos clínicos específicos foram analisados apenas nos pacientes com DIL. Alguns dados (intervalo de tempo entre início do tratamento com L-DOPA e surgimento das DIL, duração das DIL) são diretamente dependentes da data de surgimento dos movimentos discinéticos. O momento de surgimento de DIL foi a primeira consulta descrita em prontuário com registro de DIL.

Conforme já descrito em outros estudos (RASCOL et al., 2006; SHARMA et al., 2008; CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012), os pacientes com idade acima de 60 anos apresentam uma frequência inferior de DIL, quando comparados com pacientes mais jovens (idade abaixo de 60 anos).

Sendo um estudo voltado para a predição de DIL em pacientes com DP, dividimos os 96 pacientes em dois grupos: os indivíduos que desenvolveram DIL precocemente e tardiamente. Ao invés de utilizar a duração da doença, consideramos o intervalo entre início do tratamento com L-DOPA e o surgimento de DIL como a variável temporal mais associada à suscetibilidade para o aparecimento da complicação. O tempo de cinco anos escolhido foi baseado no período de seguimento final no único estudo longitudinal prospectivo e feito em comunidade (BJORNESTAD et al., 2016).

Por uma análise simples (teste do qui-quadrado), os pacientes com DIL precoce apresentaram a complicação com menores parâmetros de terapia dopaminérgica (tanto duração de tratamento quanto LEDD no momento de surgimento das DIL), o que reforça a hipótese de existir uma suscetibilidade inerente à terapia dopaminérgica em alguns indivíduos.

A mesma análise mostrou que a frequência de mulheres no grupo de DIL precoce (59%) foi maior que a proporção encontrada no grupo de DIL tardia (23%). Conforme já descrito, o sexo feminino foi associado a uma maior chance de surgimento de DIL em vários estudos.

Quanto à influência do sexo no surgimento das DIL, ainda não se compreende porque mulheres teriam um maior risco. Já se propôs que este efeito distinto entre os sexos seja causado pelas diferenças de

peso corporal e concentração da dose de L-DOPA por quilograma; supostamente, mulheres teriam um peso inferior ao dos homens e acumulariam níveis mais altos de L-DOPA por quilo de peso (PARKINSON STUDY GROUP, 1996). Contudo, um estudo mostrou que sexo e peso corporal são preditores independentes do surgimento das DIL (OLANOW et al., 2013).

5.1.3 – ANÁLISES UNIVARIADAS DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

A ausência da relação entre a quase totalidade dos fatores ambientais estudados e o surgimento de DIL já era esperada, principalmente porque há muita incerteza sobre a ação destas variáveis na fisiopatologia da DP (KALIA; LANG, 2015). Contudo, o consumo regular de refrigerante de cola (> 1 copo/dia) apresentou um aumento de 3 vezes no risco de surgimento de DIL na análise univariada. Os refrigerantes de cola são conhecidos pelas altas concentrações de cafeína (80 a 168 mg/dL) em sua composição (CELEC; BEHULIAK, 2010), e é sabido que a cafeína inibe os receptores de adenosina (BENARROCH, 2008; NICOLETTI; ZAPPIA, 2015).

Conforme já descrito anteriormente, os antagonistas seletivos A2A têm sido testados no tratamento das DIL. Considerando estes achados, é possível que o uso de cafeína em refrigerantes de cola iniba antagonistas A2A e reduza o surgimento dos movimentos discinéticos. Contudo, o consumo de outras bebidas cafeinadas, como o próprio café e o chá preto, não mostrou associação com DIL.

A duração da DP e o estadiamento Hoehn & Yahr são variáveis que interagem entre si, em correlação positiva. Em seção anterior, mostramos que seis estudos já haviam mostrado a associação entre duração mais longa da DP e surgimento de DIL. O estadiamento Hoehn & Yahr foi associado às DIL em três estudos, havendo um aumento de cerca de 2 vezes no risco de surgimento de DIL a cada ponto a mais no estadiamento (HAUSER; McDERMOTT; MESSING, 2006; RASCOL et al., 2006; NICOLETTI et al., 2016).

5.1.4 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Nossa análise de fatores de risco foi baseada principalmente em modelos de regressão logística. Segundo Hosmer, Lemeshow e Sturdivant¹ (2013 apud BISSACOT, 2015, p. 29), os modelos de regressão logística devem seguir uma metodologia específica para definição das variáveis associadas ao surgimento de DIL, para se garantir a qualidade e força do modelo.

Em relação aos achados encontrados no modelo final, a idade no início dos sintomas de DP já foi explorada em 13 estudos prévios, conforme descrito anteriormente. Nosso estudo mostrou um aumento de 5% na chance de DIL para cada ano a menos no início dos sintomas da DP, compatível com o aumento de 3 a 9% na chance de DIL visto em trabalhos anteriores.

A idade no início dos sintomas de DP é um fator de risco de DIL bastante explorado. Vários estudos prévios mostraram uma maior suscetibilidade ao surgimento de DIL em pacientes com DP precoce (idade de início < 40 anos) (LEE; JEON, 2014), porém ainda sem evidências explicando este fenômeno. Em tese de doutoramento feita com pacientes brasileiros, Schumacher-Schuh (2014) descreveu que cada 10 anos a mais na idade de início da DP reduz a chance de DIL em 22%.

Sugere-se que pacientes com DP de início precoce tenham mais mutações patogênicas (parkina, PINK1) do que os pacientes com doença de início tardio, que estas formas genéticas de DP estejam associadas a DIL mais precoces e graves (SCHRAG; QUINN, 2000; PAPAPETROPOULOS et al., 2004; SCHRAG; SCHOTT, 2006). É possível que os pacientes com DP de início precoce tenham mecanismos compensatórios mais vigorosos à degeneração dopaminérgica e sejam mais vulneráveis às DIL (LEE; JEON, 2014).

Tanto a duração do tratamento com L-DOPA quanto a LEDD são variáveis relacionadas à terapia de reposição dopaminérgica, e interagem entre si. Conforme já citado acima, seis estudos prévios mostraram que há um aumento de chance de 9 a 42% de se desenvolver DIL a cada um ano de tratamento com L-DOPA. Nossos resultados mostraram um aumento de 31% no risco desta complicação, estando em concordância com os achados anteriores.

¹ HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R.X. Applied Logistic Regression. 3rd Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

Em relação à dose de medicações com efeito dopaminérgico na DP, os estudos utilizam a dose diária de L-DOPA ou a LEDD, sendo que a maioria optou por registrar apenas a dose de L-DOPA. Contudo, a L-DOPA não é a única medicação com efeito sobre o sistema da DA: agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B, inibidores da COMT e a amantadina também agem atuam nestas vias. Além disso, há diferenças de concentração nas diferentes formulações de L-DOPA, principalmente entre as de liberação imediata e liberação controlada.

Para resolver estas singularidades, tem-se utilizado a LEDD, que consiste na dose em que uma medicação antiparkinsoniana se equivale a 100 mg de L-DOPA (liberação imediata). Com isso, quase todas as medicações antiparkinsonianas são analisadas, e não apenas a L-DOPA, tornando-se uma variável mais fidedigna que o uso isolado da dose diária de L-DOPA. Por isso, foi optado pelo uso da LEDD nas análises. Foi utilizado o protocolo de cálculo da LEDD descrito por Tomlinson et al. (2010).

Três estudos prévios mostraram uma associação positiva entre LEDD e surgimento de DIL, e a chance de surgimento desta complicação aumentou entre 10% (JURI-CLAVERIA et al., 2007) a 100% (KIPFER et al., 2011) a cada 100 mg de LEDD. Nosso resultado foi semelhante ao Juri-Claveria et al. (2007). Em pacientes brasileiros, Schumacher-Schuh (2014) mostrou que a chance de surgimento aumentou em 10% a cada acréscimo de 200 mg na LEDD.

O uso crônico de L-DOPA é um requisito essencial para o surgimento das DIL (MANSON; STIRPE; SCHRAG, 2012; LEE; JEON, 2014), conforme já explicado anteriormente. Tanto a dose utilizada quanto o tempo de tratamento crônico de L-DOPA são fatores de grande relevância nos modelos animais de DIL (CALABRESI et al., 2010).

O fenótipo motor no momento da avaliação foi o fator clínico mais associado ao surgimento de DIL em nosso modelo multivariado, considerando a magnitude do *odds ratio*. Sete estudos já avaliaram a influência de fenótipo motor no início da doença sobre o risco de DIL: três não detectaram associação (GRANDAS; GALIANO; TABERNERO, 1999; CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012; GARCÍA-RUIZ et al., 2012) e quatro estudos mostraram uma associação positiva (KIPFER et al., 2011; ZHANG et al., 2013; SCHUMACHER-SCHUH, 2014; NICOLETTI et al., 2016). Nenhum estudo revisado utilizou o fenótipo motor no momento da avaliação.

Grandas et al. (1999) utilizam como variável o “primeiro sintoma parkinsoniano predominante”, baseada na recordação do paciente, para classificar os pacientes em padrão tremor-dominante, rígido-acinético ou combinado. Cervantes-Arriaga et al. (2012) também utilizam da recordação do paciente sobre seu primeiro sintoma parkinsoniano para classificá-lo em tremor-dominante, rígido-acinético e instabilidade

postural ou de marcha. Já Garcia-Ruiz et al. (2012) classificam os pacientes em presença ou ausência de tremor no início da doença, também baseados na recordação do paciente.

Dentre os estudos com associação positiva entre fenótipo motor, Kipfer et al. (2011) classificam os pacientes baseados na presença ou ausência de tremor de repouso no início da doença, com um aumento de chance de DIL em 8.67 vezes nos indivíduos que não tiveram tremor de repouso inicial. Segundo os autores, a detecção de tremor de repouso no início da doença foi baseada na recordação do paciente ou nos sintomas predominantes na primeira consulta.

Zhang et al. (2013) mostraram que há uma redução de chance de 49% no surgimento de DIL em pacientes cujo início da doença tenha sido com sintomas tremor-dominantes. Os autores descrevem que classificaram os pacientes em subtipo tremor-dominante, rígido-acinético e misto, baseados nos sintomas iniciais e na classificação de fenótipos descrita por Rajput et al. (2009), que descrevem uma metodologia de classificação de fenótipo baseada nas avaliações clínicas feitas em várias consultas, ao longo do tempo, incluindo dados antigos e mais recentes. A nosso ver, esta metodologia de classificação de fenótipo não se aplica para uma única avaliação feita no início da doença. Os próprios autores comentam que o esquema de definição de fenótipos utilizado tem limitações.

Schumacher-Schuh (2014) classificou o fenótipo inicial dos pacientes em tremor ou rígido-acinético, baseado na recordação do paciente. Em modelo multivariado (regressão de Poisson), o autor relatou que o fenótipo inicial de tremor reduziu as chances de surgimento de DIL em 34%, em relação aos pacientes que iniciaram a doença com rigidez e/ou bradicinesia. O autor também comentou sobre o viés de memória que envolve esta classificação.

Nicoletti et al. (2016) também exploraram esta associação entre surgimento de DIL e o fenótipo inicial da DP, notando que os pacientes com fenótipo inicial tremor-dominante tiveram uma redução de risco de DIL de 52% em relação ao subtipo rígido-acinético. Os pacientes foram classificados em fenótipo tremor-dominante, rígido-acinético e misto, baseados nos sintomas mais proeminentes no início da doença, através de recordação do paciente. Os autores comentam que a definição de um fenótipo motor através da recordação dos sintomas iniciais não é acurada, e pode levar a uma classificação errônea.

Em comum, notamos que estes sete estudos utilizaram critérios de classificação do fenótipo motor com alto grau de subjetividade (impressão do paciente). Além disso, foram baseados na recordação de sintomas surgidos no passado. Para reduzir a subjetividade desta classificação, surgiram métodos mais objetivos de classificação dos fenótipos clínicos da DP.

Utilizando os dados do estudo DATATOP, Jankovic et al. (1990) buscaram a existência de subgrupos específicos de DP. Para classificar os pacientes em fenótipo tremor-dominante e PIGD, os autores utilizaram um cálculo baseado nas pontuações de tremor e de marcha/estabilidade postural da versão prévia da UPDRS. Através deste método, foi visto que os pacientes de fenótipo tremor-dominante apresentavam características clínicas mais favoráveis que os portadores do fenótipo PIGD. A partir de então, a classificação do fenótipo motor da DP baseado na UPDRS foi utilizada em diversos estudos.

Com o surgimento da MDS-UPDRS, Stebbins et al. (2013) propuseram uma modificação para o cálculo dos fenótipos tremor-dominante e PIGD na nova forma da escala, a qual apresentou semelhantes características de sensibilidade e especificidade em comparação com a classificação original. Por ter sido elaborada por alguns investigadores que propuseram a primeira classificação, e que também estiveram envolvidos com o Comitê da *International Parkinson and Movement Disorders Society* responsável pela forma final da MDS-UPDRS, o método de Stebbins et al. nos pareceu adequado para a classificação de fenótipos do presente estudo.

Contudo, por qual razão o fenótipo tremor-dominante apresentaria menor suscetibilidade ao surgimento de DIL? Os três estudos que mostraram associação entre um fenótipo tremor-dominante no início da DP e redução das chances de DIL sugerem que estes pacientes tenham uma forma mais benigna da doença. A observação vem desde o trabalho de Zetuský et al. (1985), que descreveu uma menor incapacidade funcional e progressão mais benigna para indivíduos com predomínio de tremor, enquanto que a forma PIGD esteve associada a acentuado declínio funcional e cognitivo, disfagia, disartria e progressão mais acelerada.

Algumas evidências sugerem que as formas tremor-dominante e PIGD representem entidades biológicas distintas da DP, com processos de neurodegeneração diferentes. Na forma tremor-dominante, foi vista uma morte neuronal mais intensa na região medial da SN, enquanto que a morte dos neurônios nigroestriais na forma rígido-acinética é mais grave na região ventrolateral da SN (JELLINGER, 2002).

Outro resultado que corrobora com esta hipótese é a baixa concentração líquórica das proteínas beta-amiloide 1-42, tau total, tau fosforilada e alfa-sinucleína no fenótipo motor PIGD, em comparação com a forma tremor-dominante (KANG et al., 2013). Além disso, um estudo recente mostrou que o genótipo GG de um SNP próximo ao gene da alfa-sinucleína (rs356182) esteve associado ao fenótipo tremor-dominante (COOPER et al., 2016).

Contudo, não há um consenso sobre a existência dos fenótipos tremor-dominante e PIGD como distintas patológicas entidades. Autores recentes ressaltaram as contradições da hipótese (NUTT,

2016; KOTAGAL, 2016), argumentando que as diferenças de fenótipo significam mais um estado da doença do que distintas formas biológicas da DP.

Um dos argumentos mais fortes contra esta hipótese vem de um estudo prospectivo feito em comunidade. Alves et al. (2006) acompanharam pacientes com DP no início da doença por 8 anos, após os classificarem em fenótipos tremor-dominante e PIGD pela metodologia de Jankovic et al. (1990). Eles mostraram que, ao final de 8 anos, dos 43 pacientes inicialmente classificados como tremor-dominante, apenas 5 continuavam neste mesmo fenótipo e 31 pacientes haviam se convertido para o fenótipo PIGD. Estes resultados sugerem que o fenótipo tremor-dominante pode significar apenas uma fase mais inicial da doença, enquanto que, após muitos anos de doença, a grande maioria dos pacientes estaria no fenótipo PIGD.

Enquanto esta controvérsia sobre os fenótipos motores representarem diferentes entidades biológicas da DP ou apenas progressão da doença não é resolvida, devemos contextualizá-la nos achados do presente estudo. Considerando que os fenótipos tremor-dependente e PIGD representem distintas entidades biológicas, a maior suscetibilidade nos pacientes PIGD ao surgimento de DIL em relação ao fenótipo tremor-dependente pode ser explicada por diferenças no padrão de neurodegeneração. Caso representem apenas a progressão da doença, como o estadiamento Hoehn & Yahr, nosso achado representaria apenas o impacto da duração da doença sobre o surgimento da complicação.

Porém, devemos considerar que duração da DP e estadiamento Hoehn & Yahr fizeram parte de nosso modelo multivariado com sete variáveis, e que não apresentaram associação com o surgimento de DIL. Isto significa que o resultado referente à associação entre fenótipo motor e DIL já está ajustado para duração da doença e estadiamento Hoehn & Yahr, sendo independente destas duas variáveis independentes. Esta observação reforça a hipótese de que os fenótipos motores representam distintas entidades biológicas.

Uma observação a ser feita é que nossa avaliação do fenótipo motor foi realizada em um único momento. Não temos como afirmar se os pacientes classificados mantinham seus fenótipos iniciais ou se continuarão assim nos próximos anos, o que pode comprometer o uso do fenótipo motor baseado nas pontuações da MDS-UPDRS como preditor de DIL.

5.1.5 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO CLÍNICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

Estudos anteriores também exploraram a probabilidade cumulativa de surgimento de DIL ao longo do tratamento com L-DOPA. O fator mais comum nas análises de sobrevivência é a idade no início da DP. Seis estudos utilizaram estatísticas Kaplan-Meier para esta variável (KOSTIC et al., 1991; WU et al., 1993; BLANCHET et al., 1996; GRANDAS; GALIANO; TABERNERO, 1999; KU; GLASS, 2010; CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012), e 5 deles mostraram associação. Destes, três estudos mostraram um aumento da probabilidade de DIL em pacientes com início de sintomas antes dos 50 anos (WU et al., 1993; GRANDAS; GALIANO; TABERNERO, 1999; CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012), conforme visto no presente estudo.

Nenhum dos estudos fez análise de sobrevivência comparando os pacientes de acordo com a LEDD, porém dois estudos avaliaram a dose de L-DOPA diária no momento da avaliação (CERVANTES-ARRIAGA et al., 2012; OLANOW et al., 2013), que se mostrou associada ao surgimento de DIL nos pacientes doses acima de 600 mg/dia. Estes achados se equivalem aos nossos resultados referentes à LEDD.

Nenhum dos estudos prévios fez análise de sobrevivência comparando os pacientes de acordo com o fenótipo clínico motor.

Estes resultados estão de acordo com as estatísticas oriundas da análise de regressão logística multivariada. Em conjunto com os achados da regressão logística, os resultados da análise de sobrevivência adicionam o aspecto temporal à predição das DIL, mostrando graficamente o impacto do fator de risco na chance de surgimento da complicação ao longo dos meses de tratamento com L-DOPA.

5.2 - ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO GENÉTICOS ASSOCIADOS À DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA

5.2.1 – DADOS DA GENOTIPAGEM

Em relação ao método de genotipagem, foi visto que a maioria dos estudos prévios utilizou a reação em cadeia da polimerase com enzimas de restrição para localização do polimorfismo (68%), quase todos antes de 2010. Por apresentar qualidade inferior nos resultados e interpretação subjetiva dos dados, além da recente necessidade de se avaliar milhares de fragmentos de DNA em um único ensaio, métodos mais recentes de genotipagem têm substituído a técnica com enzimas de restrição para genotipagem (ISLER; VERTERGIVIST; BURCZYNSKI, 2007).

O segundo método mais usado foi a discriminação alélica por tecnologia Taqman (27%), como a utilizada no presente estudo. Os outros métodos de genotipagem usados foram os baseados em espectrometria de massas (4 estudos) e sequenciamento completo do gene de interesse (1 estudo).

Todos os SNPs analisados no presente trabalho já foram explorados no contexto das DIL na DP, com exceção do rs2682826 no gene *NOS1*. Quase todos os SNPs foram genotipados em amostras de população brasileira, porém poucos no contexto das DIL na DP. De acordo com nossos resultados, não houve diferenças na frequência dos genótipos entre as populações com e sem DIL.

Em relação ao SNP rs4680 do gene *COMT*, a distribuição dos genótipos na população de pacientes com DP mostra que o alelo principal é o G na maioria dos estudos (WATANABE et al., 2003; CONTIN et al., 2005; SCHUMACHER-SCHUH, 2011; GREENBAUM et al., 2013; CHESHIRE et al., 2014; HAO et al., 2014). Apenas os estudos de Bialecka et al. (2008) e de Lau et al. (2012), feitos na Polônia e na Holanda respectivamente, mostram o alelo A como principal. Destes, o único estudo em indivíduos brasileiros é a dissertação de Schumacher-Schuh (2011), com resultados semelhantes aos do presente estudo.

A distribuição dos genótipos do SNP rs1800497 no gene *ANKK1* em pacientes com DP nos estudos prévios foi semelhante: o alelo G foi o alelo principal em todos os estudos revisados (KAISER et al., 2003; LEE et al., 2011; RIECK, 2012; GREENBAUM et al., 2013; CERVANTES-ARRIAGA et al. 2015). A população estudada por Rieck et al. (2012) foi de pacientes brasileiros, com proporção muito próxima da descrita no presente estudo.

A distribuição dos genótipos do SNP rs6280 no gene *DRD3* em pacientes com DP nos estudos prévios mostra que o alelo principal é o T (KAISER et al., 2003; PAUS et al., 2009; LEE et al., 2011; GREENBAUM et al., 2013). Nossos resultados estão de acordo com os estudos de associação genética em DP citados acima. Não existem dados sobre frequência deste alelo em pacientes brasileiros com DP, porém em outras condições neuropsiquiátricas. Um estudo sobre drogadição feito na cidade de São Paulo mostrou que o alelo T como o principal (MESSAS et al., 2005), porém outro estudo sobre psicose na mesma cidade mostrou o alelo C como o principal (KRELLING et al., 2008).

Em relação ao SNP rs393795 no gene *DAT1* em pacientes com DP, apenas um estudo analisou positivamente a associação entre o alelo G e o surgimento de DIL, porém não descreveu a frequência dos genótipos em sua casuística (KAPLAN et al., 2014). Não encontramos estudos de associação genética com o SNP rs393795 na população brasileira.

A distribuição dos genótipos do SNP rs1799836 no gene *MAOB* em pacientes com DP mostra que o alelo T foi o principal nos dois estudos envolvendo o polimorfismo ao surgimento de DIL, independente do sexo (TORKAMAN-BOUTORABI et al., 2012; HAO et al., 2014). A dissertação de mestrado de Schumacher-Schuh (2011) avaliou este SNP em uma população de pacientes brasileiros com DP, e também descreveu o alelo T como o mais frequente, em conformidade com nossos resultados.

Em relação ao SNP rs6265 no gene *BDNF* em pacientes com DP, o alelo principal foi o C em todos os estudos analisados (FOLTYNIE et al., 2009; GAO et al., 2010; KARAKASIS et al., 2011; SVETEL et al., 2013; CHESHIRE et al., 2014; KAPLAN et al., 2014). Mesmo não sendo um estudo voltado para o surgimento de DIL, Altmann et al. (2016) analisaram o efeito de alguns polimorfismos no declínio cognitivo na DP e o alelo G também foi o mais frequente. Todos estes resultados estão em conformidade com os dados do presente estudo.

Apenas um estudo analisou a associação entre o SNP rs2298383 do gene *ADORA2A*, e em pacientes brasileiros. Rieck et al. (2015) mostraram que o alelo T foi o mais comum em paciente com DP, assim como os resultados do presente estudo.

O SNP rs2682826 do gene *NOS1* ainda não havia sido analisado em pacientes com DP. Contudo, em um estudo sobre disfunção erétil em brasileiros, Lacchini et al. (2014) mostraram que o alelo mais frequente foi o G, semelhante ao mostrado em nossos resultados.

5.2.2 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS

As análises de associação genética foram realizadas com as três variáveis independentes mais utilizadas nos estudos prévios: sexo, idade no início dos sintomas de DP e duração do tratamento com L-DOPA. Um dos genes (*MAOB*) é ligado ao X e deve ser ajustado para o sexo no modelo multivariado, justificando a inclusão desta variável, analisada em 75% dos modelos genéticos prévios. A idade no início dos sintomas de DP é uma variável independente usada em 62% dos trabalhos prévios, e duração do tratamento com L-DOPA foi usada em 43% dos trabalhos.

Além disso, optamos por utilizar um modelo genético aditivo nas regressões logísticas. Este modelo prevê que o risco de um desfecho conferido por um alelo é r -vezes nos indivíduos heterozigotos e $2r$ -vezes nos homozigotos para o alelo analisado (CLARKE et al., 2011).

O único SNP associado ao surgimento de DIL foi o rs1799836 do gene *MAOB*. Três estudos prévios testaram esta associação. Em um pequeno estudo feito no Irã, Torkaman-Boutorabi et al. (2012) analisaram o efeito de polimorfismos deste gene sobre complicações motoras em 103 pacientes, através de genotipagem por enzimas de restrição, e não foi vista a associação. É importante ser comentado que os autores utilizaram um teste estatístico simples (qui-quadrado) para avaliar esta associação.

Hao et al. (2014) avaliaram o efeito do SNP no surgimento de complicações motoras em 1087 chineses, usando enzimas de restrição para genotipagem. A associação foi testada através de regressão logística, e mostrou que o genótipo CT aumentou o risco de DIL em quatro vezes, independente do sexo.

Em sua dissertação de mestrado, Schumacher-Schuh (2011) analisou o SNP rs1799836 em 122 pacientes com DP brasileiros e testou sua associação com complicações, como a DIL. Através de modelo com regressão de Poisson, os autores não conseguiram mostrar que algum dos alelos do SNP possa estar relacionado ao risco no surgimento de DIL, em ambos os sexos.

Nossos resultados mostraram que o alelo T está associado ao risco de surgimento de DIL, mesmo após ajuste para o sexo. Contudo, nas análises separadas em pacientes do sexo feminino e masculino, a associação não foi vista. Estando em um gene ligado ao X, o efeito do SNP pode se tornar mais difícil de ser demonstrado, pelas diferentes proporções do alelo em homens e mulheres. É possível que a associação genótipo-fenótipo fique mais evidente com números maiores de participantes. Ao

separarmos os pacientes de acordo com o sexo, a casuística total é dividida e o poder do teste se reduz.

Não está claro como um SNP localizado em um íntron pode ter uma consequência funcional direta sobre a enzima MAO-B. Balciuniene et al. (2002) avaliaram a relação entre o SNP rs1799836, a expressão do mRNA e a atividade da enzima MAO-B no encéfalo humano, e descreveram que os portadores do alelo T apresentam uma atividade enzimática maior do que os portadores do alelo C. Porém, não houve diferença na expressão de mRNA.

Os autores deste estudo sugerem que deve haver um polimorfismo funcional em desequilíbrio de ligação com o SNP rs1799836. Outra possibilidade é que, mesmo estando em região não-codificadora, o SNP possa afetar a estabilidade e a transcrição do mRNA, o que levaria a uma modificação na quantidade e atividade da enzima MAO-B. Em última análise, as modificações na concentração e atividade da MAO-B no encéfalo afetariam as concentrações de DA na sináptica nigroestriatal, evento diretamente ligado à fisiopatologia das DIL.

5.2.3 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE A FREQUÊNCIA DIÁRIA E O IMPACTO FUNCIONAL DA DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E POLIMORFISMOS

Além do risco de surgimento de DIL associado aos polimorfismos, também quantificamos a associação dos SNP com dois desfechos clinicamente relevantes: a frequência diária dos movimentos anormais e o impacto funcional destas DIL sobre a funcionalidade dos pacientes. Deve-se considerar que 47% dos pacientes com DIL apresentaram os movimentos em menos de 25% do tempo acordado, e que 49% dos pacientes com DIL sentiram apenas um discreto impacto dos movimentos em suas atividades.

Nenhum dos trabalhos prévios avaliados avaliou a associação entre estas variáveis clínicas com os SNPs estudados.

Em conformidade com os resultados da associação entre presença de DIL e genótipos, apenas os indivíduos homozigotos para o alelo T do SNP rs1799836 do gene *MAOB* apresentaram maior chance de ter DIL durante quase todo o tempo acordado. Contudo, esta associação não se refletiu para a gravidade dos movimentos discinéticos, pois não houve associação dos SNPs estudados com o impacto funcional das DIL.

A ausência de uma associação robusta entre impacto funcional e os SNPs pode ser consequência de um baixo número de pacientes com formas mais graves de DIL. Apenas 6 pacientes tiveram DIL classificadas como incapacitantes (4 pontos no item 4.2 da MDS-UPDRS).

5.2.4 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DO SURGIMENTO DE DISCINESIA INDUZIDA PELA L-DOPA E O POLIMORFISMO rs1799836 DO GENE *MAOB*

Nenhum dos estudos prévios utilizou a análise de sobrevivência para surgimento de DIL entre os diferentes genótipos deste polimorfismo. A associação vista na regressão logística entre o alelo T e as DIL não se refletiu no teste de *log-rank*. É possível que o número de participantes na análise tenha sido inferior ao necessário para confirmação do efeito.

6 – CONCLUSÕES

(I) A idade no início dos sintomas de DP, o fenótipo clínico motor da doença, a duração do tratamento com L-DOPA e a LEDD no momento da avaliação são as variáveis clínicas mais associadas com o risco de surgimento de DIL.

(II) Sendo o fator preditor de DIL com maior impacto, os pacientes com fenótipo motor PIGD apresentaram um risco aproximadamente 6 vezes maior de desenvolverem DIL, em relação aos de fenótipo tremor-dominante.

(III) Dentre os oito SNPs estudados, apenas o rs1799836 ligado ao gene *MAOB* teve associação com o risco de surgimento de DIL.

(IV) Os pacientes com o alelo variante T do SNP rs1799836 ligado ao gene *MAOB* apresentaram um risco 51% maior de desenvolverem DIL, em relação ao alelo principal C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLSSKOG, J.E.; MUENTER, M.D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 448-58, 2001.
- ALTMANN, V. et al. Val66Met BDNF polymorphism is associated with Parkinson's disease cognitive impairment. **Neurosci Lett**, v. 615, p. 88-91, 2016.
- ALVES, G. et al. Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 21, n. 8, p. 1123-30, 2006.
- AMANZIO, M. et al. Impaired awareness of movement disorders in Parkinson's disease. **Brain Cogn**, v. 72, n. 3, p. 337-46, 2010.
- AQUINO, C.C.; FOX, S.H. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 80-9, 2015.
- BALCIUNIENE, J. et al. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. **Hum Genet**, v. 110, n. 1, p. 1-7, 2002.
- BENARROCH, E.E. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. **Neurology**, v. 70, n. 3, p. 231-6, 2008.
- BENARROCH, E.E. Synaptic effects of cannabinoids: complexity, behavioral effects, and potential clinical implications. **Neurology**, v. 83, n. 21, p. 1958-67, 2014.
- BENARROCH, E.E. Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. **Neurology**, v. 84, n. 16, p. 1693-704, 2015.
- BENBIR, G. et al. A hospital-based study: risk factors in development of motor complications in 555 Parkinson's patients on levodopa therapy. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 108, n. 8, p. 726-32, 2006.
- BERTHET, A. et al. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-dopa-induced dyskinesia. **J Neurosci**, v. 29, n. 15, p. 4829-35, 2009.
- BIALECKA, M. et al. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. **Pharmacogenet Genomics**, v. 18, n. 9, p. 815-21, 2008.

- BISSACOT, A.C.G. **Estudo Comparativo entre Regressão Logística Binária e Redes Neurais Artificiais na Avaliação dos Resultados Clássicos de Hosmer, Lemeshow e Sturdivant**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2015.
- BJORNESTAD, A. et al. Risk and course of motor complications in a population-based incident Parkinson's disease cohort. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 22, p. 48-53, 2016.
- BLANCHET, P.J. et al. Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. **Can J Neurol Sci**, v. 23, n. 3, p. 189-93, 1996.
- BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003.
- BRACCO, F. et al. The long-acting dopamine receptor agonist cabergoline in early Parkinson's disease: final results of a 5-year, double-blind, levodopa-controlled study. **CNS Drugs**, v. 18, n. 11, p. 733-46, 2004.
- CALABRESI, P. et al. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 20, n. 22, p. 8443-51, 2000.
- CALABRESI, P. et al. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 11, p. 1006-17, 2010.
- CALON, F. et al. Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. **Brain**, v. 127, n. 5, 1075-84, 2004.
- CAMARENA, B. et al. Monoamine oxidase A and B gene polymorphisms and negative and positive symptoms in schizophrenia. **ISRN Psychiatry**, v. 2012, p. 852949, 2012.
- CARTA, M. et al. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. **Brain**, v. 130, n. 7, p. 1819-33, 2007.
- CATTANEO, A. et al. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. **Transl Psychiatry**, v. 6, n. 11, p. e958.
- CELEC, P.; BEHULIAK, M. Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. **J Psychopharmacol**, v. 24, n. 10, p. 1569-72, 2010.

- CERVANTES-ARRIAGA, A. et al. Incidence and determinants of levodopa-induced dyskinesia in a retrospective cohort of Mexican patients with Parkinson's disease. **Rev Invest Clin**, v. 64, n. 3, p. 220-6, 2012.
- CERVANTES-ARRIAGA, A. et al. ApoE polymorphisms and dopaminergic replacement therapy in Parkinson's disease. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 52, n. 1, p. 14-8, 2014.
- CERVANTES-ARRIAGA, A. et al. Relación entre el polimorfismo DRD2/ANKK1 y el desarrollo de complicaciones motoras em enfermedad de Parkinson. **Neurol Arg**, v. 7, n. 1, p. 28-33, 2015.
- CHAPUIS, S. et al. Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. **Mov Disord**, v. 20, n. 2, p. 224-30, 2005.
- CHESHIRE, P. et al. Influence of single nucleotide polymorphisms in COMT, MAO-A and BDNF genes on dyskinesias and levodopa use in Parkinson's disease. **Neurodegener Dis**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 2014.
- CHILDS, E. et al. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 2791-800, 2008.
- CLARKE, G.M. et al. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nat Protoc**, v. 6, n. 2, p. 121-33, 2011.
- CONTIN, M. et al. Dopamine transporter gene polymorphism, spect imaging, and levodopa response in patients with Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 27, n. 3, p. 111-5, 2004.
- CONTIN, M. et al. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 20, n. 6, p. 734-9, 2005.
- COOPER, C.A. et al. Common variant rs356182 near SNCA defines a Parkinson's disease endophenotype. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 4, n. 1, p. 15-25, 2016.
- COTZIAS, G.C.; VAN WOERT, M.H.; SCHIFFER, L.M. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. **N Engl J Med**, v. 276, n. 7, p. 374-9, 1967.
- COTZIAS, G.C.; PAPAVALIOU, P.S.; GELLENE, R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. **N Engl J Med**, v. 280, n. 7, p. 337-45, 1969.
- CRISPO, J.A.G. et al. Trends in inpatient antiparkinson drug use in the USA, 2001-2012. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 71, n. 8, p. 1011-9, 2015.

CUI, H. et al. A common polymorphism in the 3'-UTR of the NOS1 gene was associated with completed suicides in Japanese male population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 992-6, 2010.

DAMIANO, A.M. et al. Evaluation of a measurement strategy for Parkinson's disease: assessing patient health-related quality of life. **Qual Life Res**, v. 9, n. 1, p. 87-100, 2000.

DARMOPIŁ, S. et al. Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. **Biol Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 603-13, 2009.

dbSNP - SHORT GENETIC VARIATIONS - rs393795. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=393795>. Acesso em: 14 mar. 2017.

DE LAU, L.M. et al. Catechol-O-methyltransferase Val158Met and the risk of dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 27, n. 1, p. 132-5, 2012.

DEL BEL, E. et al. Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. **Neurotox Res**, v. 25, n. 1, p. 33-44, 2014.

DEL BEL, E. et al. Nitric oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia? **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 7, p. 168-192, 2015.

DEL DOTTO, P. et al. Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 515-20, 2001.

DODEL, R.C. et al. The economic impact of Parkinson's disease. An estimation based on a 3-month prospective analysis. **Pharmacoeconomics**, v. 14, n. 3, p. 299-312, 1998.

DODEL, R.C.; BERGER, K.; OERTEL, W.H. Health-related quality of life and healthcare utilization in patients with Parkinson's disease: impact of motor fluctuations and dyskinesias. **Pharmacoeconomics**, v. 19, n. 10, p. 1013-38, 2001.

DOS-SANTOS-PEREIRA, M. et al. Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: Possible mechanism of action. **Neurobiol Dis**, v. 94, p. 179-95, 2016.

FAHN, S.; ELTON, R. Members of the UPDRS Development Committee. In: FAHN, S; MARSDEN, C.D.; CALNE, D.B.; GOLDSTEIN, M. (Eds). **Recent Developments in Parkinson's Disease, Vol. 2**. Florham Park, NJ: Macmillan Health Care Information, 1987.

FERRAZ, H.B.; BARBOSA, E.R. Tratamento da fase avançada da doença de Parkinson com estratégias terapêuticas para flutuações motoras e discinesias. In: TOSTA, E.D. et al (Ed). **Doença de Parkinson: Recomendações**. São Paulo: Omnifarma, 2010.

FERRER, B. et al. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 6, p. 1607-14, 2003.

FOLTYNIE, T. et al. BDNF val66met influences time to onset of levodopa induced dyskinesia in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 80, n. 2, p. 141-4, 2009.

FREUDENBERG, F.; ALTHOFF, A.; REIF, A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. **Genes Brain Behav**, v. 14, n. 1, p. 46-63, 2015.

GALIMBERTI, D. et al. Association of neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism with Alzheimer's disease. **J Neurol**, v. 252, n. 8, p. 985-6, 2005.

GAO, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor G196A polymorphism and clinical features in Parkinson's disease. **Acta Neurol Scand**, v. 122, n. 1, p. 41-5, 2010.

GARCÍA-RUIZ, P.J. et al. What factors influence motor complications in Parkinson disease?: a 10-year prospective study. **Clin Neuropharmacol**, v. 35, n. 1, p. 1-5, 2012.

GOETZ, C.G. et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. **Mov Disord**, v. 23, n. 15, p. 2129-70, 2008.

GRANDAS, F.; GALIANO, M.L.; TABERNERO, C. Risk factors for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 246, n. 12, p. 1127-33, 1999.

GREENBAUM, L. et al. Do tardive dyskinesia and L-dopa induced dyskinesia share common genetic risk factors? An exploratory study. **J Mol Neurosci**, v. 51, n. 2, p. 380-8, 2013.

GRIFFON, N. et al. The dopamine D3 receptor and schizophrenia: pharmacological, anatomical and genetic approaches. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 5 (Suppl), p. 3-9, 1995.

GUERINI, F.R. et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. **Eur J Neurol**, v. 16, n. 11, p. 1240-5, 2006.

HALL, A.V. et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). **J Biol Chem**, v. 269, n. 52, p. 33082-90, 1994.

- HANCOCK, D.B. et al. Nitric oxide synthase genes and their interactions with environmental factors in Parkinson's disease. **Neurogenetics**, v. 9, n. 4, p. 249-62, 2008.
- HAO, H. et al. Association of Catechol-O-Methyltransferase and monoamine oxidase B gene polymorphisms with motor complications in Parkinson's disease in a Chinese population. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 20, n. 10, p. 1041-5, 2014.
- HASHIM, H.Z. et al. Risk factors and predictors of levodopa-induced dyskinesia among multiethnic Malaysians with Parkinson's disease. **Int J Neurosci**, v. 124, n. 3, p. 187-91, 2014.
- HASSAN, A. et al. Association of Parkinson disease age of onset with DRD2, DRD3 and GRIN2B polymorphisms. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 22, p. 102-5, 2016.
- HASSIN-BAER, S. et al. Gender effect on time to levodopa-induced dyskinesias. **J Neurol**, v. 258, n. 11, p. 2048-53, 2011.
- HAUSER, R.A.; McDERMOTT, M.P.; MESSING, S. Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 63, n. 12, p. 1756-60, 2006.
- HECHTNER, M.C. et al. Quality of life in Parkinson's disease patients with motor fluctuations and dyskinesias in five European countries. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 20, n. 9, p. 969-74, 2014.
- HENTZ, J.G. et al. Simplified conversion method for unified Parkinson's disease rating scale motor examinations. **Mov Disord**, v. 30, n. 14, p. 1967-70, 2015.
- HUOT, P. Pharmacological properties of levodopa. In: FOX, S.H.; BROTHIE, J.M. (Ed). **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease**. London: Springer-Verlag, 2014.
- IRAVANI, M.M.; JENNER, P. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 118, n. 12, p. 1661-90, 2011.
- ISLER, J.A.; VERTERGVIST, O.E.; BURCZYNSKI, M.E. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 4, p. 353-68, 2007.
- JANKOVIC, J, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. **Neurology**, v. 40, n. 10, p. 1529-34, 1990.
- JELLINGER, K.A. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl**, v. 62, p. 347-76, 2002.
- JIMÉNEZ-URBIETA, H. et al. Dyskinesias and impulse control disorders in Parkinson's disease: From pathogenesis to potential therapeutic approaches. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 56, p. 294-314, 2015.

JURI-CLAVERIA, C. et al. Risk factors associated with the development of motor complications in Parkinson's disease. A study in a Chilean population. **Rev Neurol**, v. 45, n. 2, p. 77-80, 2007.

KAISER, R. et al. L-dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. **Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1750-5, 2003.

KALIA, L.V.; LANG, A.E. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 386, p. 896-912, 2015.

KANG, J.H. et al. Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naïve patients with early Parkinson disease. **JAMA Neurol**, v. 70, n. 10, p. 1277-87, 2013.

KAPLAN, N. et al. Sequence variants in SLC6A3, DRD2, and BDNF genes and time to levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 53, n. 2, p. 183-8, 2014.

KARAKASIS, C. et al. Association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism with Parkinson's disease in a Greek population. **J Clin Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 1744-5, 2011.

KATZENSCHLAGER, R. Pharmacological Treatment Options for Levodopa-Induced Dyskinesia. In: FOX, S.H.; BROTHIE, J.M. (Ed). **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease**. London: Springer-Verlag, 2014.

KIPFER, S. et al. Resting tremor in Parkinson disease: a negative predictor of levodopa-induced dyskinesia. **Arch Neurol**, v. 68, n. 8, p. 1037-9, 2011.

KOSTIC, V. et al. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. **Neurology**, v. 41, n. 2, p. 202-5, 1991.

KOTAGAL, V. Is PIGD a legitimate motor subtype in Parkinson disease? **Ann Clin Transl Neurol**, v. 3, n. 6, p. 473-7, 2016.

KRELLING, R. et al. Molecular genetic case-control women investigation from the first Brazilian high-risk study on functional psychosis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 30, n. 4, p. 341-5, 2008.

KU, S.; GLASS, G.A. Age of Parkinson's disease onset as a predictor for the development of dyskinesia. **Mov Disord**, v. 25, n. 9, p. 1177-82, 2010.

KUM, W.F. et al. Risk factors in development of motor complications in Chinese patients with idiopathic Parkinson's disease. **J Clin Neurosci**, v. 16, n. 8, p. 1034-7, 2009.

LACCHINI, R. et al. nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 6, p. 775-84, 2014.

- LEE, J.Y. et al. Differential genetic susceptibility in diphasic and peak-dose dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 26, n. 1, p. 73-9, 2011.
- LEE, J.Y.; JEON, B.S. Risk factors for Levodopa-Induced Dyskinesia. In: FOX, S.H.; BROTCHE, J.M. (Ed). **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease**. London: Springer-Verlag, 2014.
- LEES, A.J.; TOLOSA, E.; OLANOW, C.W. Four pioneers of L-DOPA treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 19-36, 2015.
- LEVECQUE, C. et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 1, p. 7-86, 2003.
- LIN, J.J. et al. Genetic polymorphism of the angiotensin converting enzyme and L-dopa-induced adverse effects in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 252, p. 130-4, 2007.
- LIN, J.J. et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism can influence age at onset of Parkinson's disease. **Acta Neurol Taiwan**, v. 16, n. 3, p. 150-7, 2007.
- LIU, W.M. et al. National Trends of Antiparkinsonism Treatment in Taiwan: 2004-2011. **Parkinsons Dis**, v. 2016, p. 1859321, 2016.
- LUGINGER, E. et al. Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 15, n. 5, p. 873-8, 2000.
- MÄNNISTÖ, P.T.; KAAKKOLA, S. COMT - Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 4, p. 593-628, 1999.
- MANSON, A.; STIRPE, P.; SCHRAG, A. Levodopa-induced-dyskinesias clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life. **J Parkinsons Dis**, v. 2, n. 3, p. 189-98, 2012.
- MARIANI, S. et al. Meta-analysis study on the role of bone-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Parkinson's disease. **Rejuvenation Res**, v. 18, n. 1, p. 40-7, 2015.
- MARRAS, C. et al. Quality of life in early Parkinson's disease: impact of dyskinesias and motor fluctuations. **Mov Disord**, v. 19, n. 1, p. 22-8, 2004.
- MELO-FELIPPE, F.B. et al. Catechol-O-Methyltransferase Gene Polymorphisms in Specific Obsessive-Compulsive Disorder Patients' Subgroups. **J Mol Neurosci**, v. 58, n. 1, p. 129-36, 2016.
- MESSAS, G. et al. Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. **Psychiatr Genet**, v. 15, n. 3, p. 171-4, 2005.

- METMAN, L.V. et al. Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. **Arch Neurol**, v. 56, n. 11, p. 1383-6, 1999.
- MOLCHADSKI, I. et al. The role of apolipoprotein E polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia. **Acta Neurol Scand**, v. 123, n. 2, p. 117-21, 2011.
- NAKAOKA, S. et al. Prescribing pattern of anti-Parkinson drugs in Japan: a trend analysis from 2005 to 2010. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99021, 2014.
- NICOLETTI, A.; ZAPPIA, M. Coffee consumption and risk of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: The FRAGAMP study. **Mov Disord**, v. 30, n. 13, p. 1854-6, 2015.
- NICOLETTI, A. et al. Clinical phenotype and risk of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 263, n. 5, p. 888-94, 2016.
- NOTARAS, M.; HILL, R.; VAN DEN BUUSE, M. A role for the BDNF gene Val66Met polymorphism in schizophrenia? A comprehensive review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 51, p. 15-30, 2015.
- NOVARETTI, N. et al. Lack of tolerance for the anti-dyskinetic effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 11, p. 1047-53, 2010.
- NUTT, J.G. et al. Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. **Mov Disord**, v. 23, n. 13, p. 1860-6, 2008.
- NUTT, J.G. Motor subtype in Parkinson's disease: Different disorders or different stages of disease? **Mov Disord**, v. 31, n. 7, p. 957-61, 2016.
- OERTEL, W.H. et al. Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. **Mov Disord**, v. 21, n. 3, p. 343-53, 2006.
- OLANOW, C.W. et al. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 28, n. 8, p. 1064-71, 2013.
- OLANOW, C.W. Levodopa: effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2015.
- OLIVERI, R.L. et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphism and the risk of levodopa-induced dyskinesias in PD. **Neurology**, v. 53, n. 7, p. 1425-30, 1999.
- ORY-MAGNE, F. et al. Withdrawing amantadine in dyskinetic patients with Parkinson disease: the AMANDYSK trial. **Neurology**, v. 82, n. 4, p. 300-7, 2014.
- OUIMET, C.C.; LANGLEY-GULLION, K.C.; GREENGARD, P. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. **Brain Res**, v. 808, n. 1, p. 8-12, 1998.

- PADOVAN-NETO, F.E. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 927-35, 2009.
- PADOVAN-NETO, F.E. et al. Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. **Front Syst Neurosci**, v. 5, p. 40, 2011.
- PADOVAN-NETO, F.E. et al. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. **Neurosci Lett**, v. 541, p. 126-31, 2013.
- PAHWA, R. et al. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). **Mov Disord**, v. 30, n. 6, p. 788-95, 2015.
- PAPAPETROPOULOS, S. et al. Comparison of motor fluctuations and L-dopa-induced dyskinesias in patients with familial and sporadic Parkinson's disease. **Eur J Neurol**, v. 11, n. 2, p. 115-9, 2004.
- PARKINSON STUDY GROUP. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. **Ann Neurol**, v. 39, n. 1, p. 37-45, 1996.
- PASCALE, E. et al. 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**, v. 276, n. 1-2, p. 18-21, 2009.
- PATRIQUIN, M.A. et al. Addiction pharmacogenetics: a systematic review of the genetic variation of the dopaminergic system. **Psychiatr Genet**, v. 25, n. 5, p. 181-3 2015.
- PAUS, S. et al. Motor complications in patients from the German Competence Network on Parkinson's disease and the DRD3 Ser9Gly polymorphism. **Mov Disord**, v. 24, n. 7, p. 1080-4, 2009.
- PAVÓN, N. et al. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 64-74, 2006.
- PÉCHEVIS, M. et al. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective European study. **Eur J Neurol**, v. 12, n. 12, p. 956-63, 2005.
- PICCONI, B. et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 5, p. 501-6, 2003.
- PRASHANTH, L.K.; FOX, S.; MEISSNER, W.G. L-DOPA-induced Dyskinesia – Clinical presentation, genetics, and treatment. In: BROTHIE, J.; BEZARD, E; JENNER, P. (Ed). **Pathophysiology, Pharmacology, and Biochemistry of Dyskinesia**. London: Elsevier Inc., 2011.
- PREDIGER, R.D. et al. Dopaminergic neurons in Parkinson's disease. In: KOSTRZEWA, R.M. (Ed). **Handbook of Neurotoxicity**. New York: Springer Science, 2014.

RAJPUT, A.H. et al. Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. **Neurology**, v. 73, n. 3, p. 206-12, 2009.

RASCOL, O. et al. Development of dyskinesias in a 5-year trial of ropinirole and L-dopa. **Mov Disord**, v. 21, n. 11, p. 1844-50, 2006.

RASCOL, O.; PEREZ-LLORET, S.; FERREIRA, J.J. New treatments for levodopa-induced motor complications. **Mov Disord**, v. 30, n. 11, p. 1451-60, 2015.

RIECK, M. **Influência dos genes DRD2 e ANKK1 na resposta ao tratamento da doença de Parkinson**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RIECK, M. et al. DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 15, p. 1701-10, 2012.

RIECK, M. et al. Is there a role for ADORA2A polymorphisms in levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients? **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 6, p. 573-82, 2015.

RUJESCU, D. et al. NOS-I and -III gene variants are differentially associated with facets of suicidal behavior and aggression-related traits. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 147B, n. 1, p. 42-8, 2008.

SANTIAGO, M. et al. Influence of serotonergic drugs on in vivo dopamine extracellular output in rat striatum. **J Neurosci Res**, v. 52, n. 5, p. 591-8, 1998.

SANTINI, E. et al. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neurosci**, v. 27, n. 26, p. 6995-7005, 2007.

SANTOS, B.L. **Efeitos do envelhecimento sobre o sistema nitrérgico dos núcleos da base em humanos**. 2014. 125 f. Dissertação (Mestrado em Neurologia) – Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17140/tde-13052014-175226/pt-br.php>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2017.

SANTOS-LOBATO, B.L. et al. Cytoarchitecture of nitrenergic neurons in the human striatum and subthalamic nucleus. **Brain Res Bull**, v. 124, p. 129-135, 2016.

SANTOS-LOBATO, B.L.; TUMAS, V. Harbinger of storm: influence of Oliver Sacks on levodopa therapy in early 1970s. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 74, n. 8, p. 687-9, 2016.

SAWADA, H. et al. Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15298, 2010.

SCHRAG, A.; QUINN, N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. **Brain**, v. 123, n. 11, p. 2297-305, 2000.

SCHRAG, A; SCHOTT, J.M. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 4, p. 355-63, 2006.

SCHUMACHER-SCHUH, A.F. **Farmacogenética da levodopa na doença de Parkinson: estudo de polimorfismos nos genes da COMT, MAO-B e DAT**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SCHUMACHER-SCHUH, A.F. **Estudo de fatores clínicos e genéticos associados à variabilidade da resposta farmacológica à terapia dopaminérgica na doença de Parkinson**. 2014. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SCHUMACHER-SCHUH, A.F. et al. Association of common genetic variants of HOMER1 gene with levodopa adverse effects in Parkinson's disease patients. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 3, p. 289-94, 2014.

SHANG, C.Y.; GAU, S.S. Association between the DAT1 gene and spatial working memory in attention deficit hyperactivity disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 17, n. 1, p. 9-21, 2014.

SHARMA, J.C. et al. Cascade of levodopa dose and weight-related dyskinesia in Parkinson's disease (LD-WD-PD cascade). **Parkinsonism Relat Disord**, v. 12, n. 8, p. 499-505, 2006.

SHARMA, J.C. et al. Relationship between weight, levodopa and dyskinesia: the significance of levodopa dose per kilogram body weight. **Eur J Neurol**, v. 15, n. 5, p. 493-6, 2008.

SHARMA, S. et al. Neurobiology of L-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. **Biomed Pharmacother**, v. 70, p. 283-93, 2015.

SHINKAI, T. et al. Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 6, p. 560-3, 2002.

SHINOHARA, M. et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. **Neurology**, v. 80, n. 17, p. 1571-6, 2013.

SHIROMA, P.R.; GEDA, Y.E.; MRAZEK, D.A. Pharmacogenomic implications of variants of monoaminergic-related genes in geriatric psychiatry. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 9, p. 1305-30, 2010.

SILVA-JUNIOR, F.P. et al. Amantadine reduces the duration of levodopa-induced dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Amantadine reduces the duration of levodopa-induced dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 11, n.7, p. 449-52, 2005

SNOW, B.J. et al. The effect of amantadine on levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. **Clin Neuropharmacol**, v. 23, n. 2, p. 82-5, 2000.

SOEIRO-DE-SOUZA, M.G. et al. Gender effects of the COMT Val 158 Met genotype on verbal fluency in healthy adults. **Mol Med Rep**, v. 8, n. 3, p. 837-44, 2013.

SPILLANTINI, M.G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839-40, 1997.

STEBBINS, G.T. et al. How to identify tremor dominant and postural instability/gait difficulty groups with the movement disorder society unified Parkinson's disease rating scale: comparison with the unified Parkinson's disease rating scale. **Mov Disord**, v. 28, n. 5, p. 668-70, 2013.

STRONG, J.A. et al. Genotype and smoking history affect risk of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 21, n. 5, p. 654-9, 2006.

SVENNINGSSON, P. et al. Eltoprazine counteracts L-DOPA-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a dose-finding study. **Brain**, v. 138, n. 4, p. 63-73, 2015.

SVETEL, M. et al. No association between brain-derived neurotrophic factor G196A polymorphism and clinical features of Parkinson's disease. **Eur Neurol**, v. 70, n. 5-6, p. 257-62, 2013.

THOMAS, A. et al. Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75, n. 1, p. 141-3, 2004.

TISON, F. et al. A Phase 2A Trial of the Novel mGluR5-Negative Allosteric Modulator Dipraglurant for Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. **Mov Disord**, v. 31, n. 9, p. 1373-80, 2016.

TOMLINSON, C.L. et al. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 25, n. 15, p. 2649-53, 2010.

TORKAMAN-BOUTORABI, A. et al. The catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B polymorphisms and levodopa therapy in the Iranian patients with sporadic Parkinson's disease. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 72, n. 3, p. 272-82, 2012.

- UHL, G.R. Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. **Mov Disord**, v. 18, n. 7 (Suppl), p. S71-80, 2003.
- VAN GERPEN, J.A. et al. Levodopa-associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. **Arch Neurol**, v. 63, n. 2, p. 205-9, 2006.
- VAN MUNSTER, B.C. et al. Genetic polymorphisms in the DRD2, DRD3, and SLC6A3 gene in elderly patients with delirium. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 153B, n. 1, p. 38-45, 2010.
- VENTURELLI, E. et al. Neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism increases the risk for frontotemporal lobar degeneration. **Eur J Neurol**, v. 15, n. 1, p. 77-81, 2008.
- VERHAGEN METMAN, L. et al. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 50, n. 5, p. 1323-6, 1998
- VITALE, C. et al. Unawareness of dyskinesias in Parkinson's and Huntington's diseases. **Neurol Sci**, v. 22, n. 1, p. 105-6, 2001.
- WALKER, R.W.; HOWELLS, A.R.; GRAY, W.K. The effect of levodopa dose and body weight on dyskinesia in a prevalent population of people with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 17, n. 1, p. 27-9, 2011.
- WATANABE, M. et al. Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease. **Neuropsychobiology**, v. 48, n. 4, p. 190-3, 2003.
- WEI, Y.L. et al. Association study of monoamine oxidase A/B genes and schizophrenia in Han Chinese. **Behav Brain Funct**, v. 7, p. 42, 2011.
- WHONE, A.L. et al. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. **Ann Neurol**, v. 54, n. 1, p. 93-101, 2003.
- WICKREMARATCHI, M.M. et al. The motor phenotype of Parkinson's disease in relation to age at onset. **Mov Disord**, v. 26, n. 3, p. 457-63, 2011.
- WILLS, A.M. et al. Caffeine consumption and risk of dyskinesia in CALM-PD. **Mov Disord**, v. 28, n. 3, p. 380-3, 2013.
- WOLF, E. et al. Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 25, n. 10, p. 1357-63, 2010.
- WONG, A.H.; BUCKLE, C.E.; VAN TOL, H.H. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? **Eur J Pharmacol**, v. 410, n. 2-3, p. 183-203, 2000.

WU, R.M. et al. Risk factors on the occurrence of response fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 5, n. 2, 127-33, 1993.

YAHN, M.D. et al. Treatment of parkinsonism with levodopa. **Arch Neurol**, v. 21, n. 4, p. 343-54, 1969.

YODanis, M.B.H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.

ZAPPIA, M. et al. Sex differences in clinical and genetic determinants of levodopa peak-dose dyskinesias in Parkinson disease: an exploratory study. **Arch Neurol**, v. 62, n. 4, p. 601-5, 2005.

ZENG, B.Y. et al. Chronic L-DOPA treatment increases striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neurosci Lett**, v. 276, n. 2, p. 71-4, 1999.

ZENG, B.Y. et al. Alterations in preproenkephalin and adenosine-2a receptor mRNA, but not preprotachykinin mRNA correlate with occurrence of dyskinesia in normal monkeys chronically treated with L-DOPA. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 1096-104, 2000.

ZETUSKY, W.J.; JANKOVIC, J.; PIROZZOLLO, F.J. The heterogeneity of Parkinson's disease: clinical and prognostic implications. **Neurology**, v. 35, n. 4, 522-6, 1985.

ZHANG, Y.H. et al. The relationship between the phenotype of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia. **Neurosci Lett**, v. 556, p. 109-12, 2013.

ZHANG, Y. et al. A meta-analysis on relationship of MAOB intron 13 polymorphisms, interactions with smoking/COMT H158L polymorphisms with the risk of PD. **Int J Neurosci**, v. 126, n. 5, p. 400-7, 2016.

ZIS, P.; CHAUDHURI, K.R.; SAMUEL, M. Phenomenology of Levodopa-Induced Dyskinesia. In: FOX, S.H.; BROTHIE, J.M. (Ed). **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease**. London: Springer-Verlag, 2014.

ANEXO A – TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE RIBEIRÃO PRETO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2011

Ofício nº 3545/2011
CEP/RCC

PROCESSO HCRP nº 3977/2008

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 333ª Reunião Ordinária, realizada em 26/09/2011, tomou ciência do relatório parcial, referente a pesquisa intitulada **“ESTUDO MULTICÊNTRICO SOBRE GENÉTICA DA DOENÇA DE PARKINSON EM PACIENTES LATINO-AMERICANOS”**.

O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI

Vice-Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

PROF. DR. VITOR TUMAS

Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Accepted Manuscript

Association of a neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism with levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease

Bruno Lopes Santos-Lobato, Vanderci Borges, Henrique Ballalai Ferraz, Ignacio Fernandez Mata, Cyrus P. Zabetian, Vitor Tumas

PII: S1089-8603(17)30002-2

DOI: [10.1016/j.niox.2017.06.004](https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.06.004)

Reference: YNIOX 1679

To appear in: *Nitric Oxide*

Received Date: 31 January 2017

Revised Date: 18 April 2017

Accepted Date: 6 June 2017

Please cite this article as:

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**ASSOCIATION OF A NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISM
WITH LEVODOPA-INDUCED DYSKINESIA IN PARKINSON'S DISEASE**

Bruno Lopes Santos-Lobato^{a,b,*}, Vanderci Borges^c, Henrique Ballalai Ferraz^c, Ignacio Fernandez Mata^{d,e},
Cyrus P. Zabetian^{d,e}, Vitor Tumas^{a,b}

^aDepartment of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^bCenter for Research Support on Applied Neuroscience (NAPNA-USP), São Paulo, Brazil.

^cDepartment of Neurology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^dVeterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, USA.

^eDepartment of Neurology, University of Washington, Seattle, WA, USA.

*Corresponding Author:

Department of Neurosciences and Behavioral Sciences

Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

Av. Bandeirantes 3900, CEP: 14049-900 - Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Phone: + 55 16 3602-2557

E-mail: bruls4@usp.br

E-mail Addresses: bruls4@usp.br (B.L. Santos-Lobato), vanderci.borges@gmail.com (V.

Borges), henrique_ferraz@uol.com.br (H.B. Ferraz), nachofin@uw.edu (I.F. Mata),

zabetian@u.washington.edu (C.P. Zabetian), tumasv@rnp.fmrp.usp.br (V. Tumas).

Abstract: Background: Levodopa-induced dyskinesia (LID) is a common complication of advanced Parkinson's disease (PD). PD pathophysiology is associated with dopaminergic and non-dopaminergic pathways, including the nitric oxide system. The present study aims to examine the association of a neuronal nitric oxide synthase gene (*NOS1*) single nucleotide polymorphism (rs2682826) with LID in PD patients. Methods and results: We studied 186 PD patients using levodopa. The presence of LID was defined as a MDS-UPDRS Part IV score ≥ 1 on item 4.1. We tested for association between *NOS1* rs2682826 and the presence, daily frequency, and functional impact of LID using regression models, adjusting for important covariates. There was no significant association between genotype and any of the LID-related variables examined. Conclusions: Our results suggest that this *NOS1* polymorphism does not contribute to LID susceptibility or severity. However, additional studies that include a comprehensive set of *NOS1* variants will be needed to fully define the role of this gene in LID.

Highlights:

- Nitric oxide system has a role in levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease;
- We tested if a polymorphism of *NOS1* is a risk factor for levodopa-induced dyskinesia;
- The selected polymorphism was not a risk factor for levodopa-induced dyskinesia;

Keywords: Dyskinesia, Parkinson's disease, levodopa, nitric oxide, *NOS1* gene

Abbreviations: LID, levodopa-induced dyskinesia; PD, Parkinson's disease; MDS-UPDRS, International Parkinson and Movement Disorders Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale; SNP, single nucleotide polymorphism; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; 3'-UTR, 3'-untranslated region.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the world. Approximately 10 million people worldwide live with this condition [1], which causes disabilities and impairs quality of life [2]. Levodopa is the most widely used and most effective medication for the treatment of motor symptoms (bradykinesia, rigidity, and tremor) in PD [3]. Unfortunately, chronic levodopa treatment often results in motor complications, including dyskinesias.

Levodopa-induced dyskinesias (LID) are hyperkinetic involuntary movements which are commonly choreiform but can also be dystonic, ballistic, stereotypic or myoclonic [4, 5]. LID frequently affect facial, cervical, and limb muscles, and occasionally trunk, ocular, and respiratory muscles [5]. The movements can be associated with peak-level of levodopa action ("peak-dose LID"), when levels of levodopa are rising and falling ("biphasic LID"), during the whole on-period ("square wave LID") or only during the off-period ("off-period dystonia"). There are conflicting reports on the impact of LID on quality of life. Some studies observed that LID had no impact on global quality of life measure [6, 7, 8], but others have concluded that dyskinesias may increase health care costs, and worsen depression and subscores of quality of life measures [9, 10, 11].

Association between the onset of LID with some genes, as *COMT*, *MAOB*, *DRD2*, *DRD3*, *DAT1*, *BDNF* and *ADORA2A*, have been explored in previous works. Polymorphisms as *COMT* single nucleotide polymorphism (SNP) rs4260 and CA(n) STR in intron 2 of the *DRD2* gene have been described as associated with LID by more than one study [12].

In the last decades, new data on the pathophysiology of LID has emerged which suggests the involvement of dopamine and non-dopaminergic neurotransmitters in the striatum [13]. Nitric oxide (NO), an instable and diffusible molecule, is an atypical neurotransmitter synthesized by nitric oxide synthase (NOS), and its role in LID has been explored in many studies: in rodents, LID are suppressed by different NOS inhibitors [14, 15, 16, 17], which are associated with decreases in dopamine turnover [18], increases in FosB/DeltaFosB [16] and DARPP-32 [19] expression, molecular markers of LID [20].

Based on cell expression, there are three NOS isoforms: endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) and neuronal NOS (nNOS). nNOS is the predominant source of NO in neurons and is encoded by the *NOS1* gene, mapped to chromosome 12q24.2-31, and comprised of 29 exons [21, 22]. SNPs in *NOS1* can modify NO production in neurons and can be associated with neurologic diseases [22].

The association of *NOS1* gene SNPs and PD had been explored, and a SNP in exon 29 of this gene (rs2682826) has been reported to associate with PD risk in some studies [23, 24], but not others [25, 26]. However, to our knowledge there have been no data published on the association of SNPs in the *NOS1* gene and development of LID. The aim of this study was to examine the association between a specific polymorphism in *NOS1* (rs2682826) and LID in PD patients, using a cross-sectional design.

2. Material and methods

2.1 Subjects

We conducted a cross-sectional study, recruiting Brazilian PD patients followed at the Movement Disorders Clinic at Ribeirão Preto Medical School and at Federal University of São Paulo between May 2007 and February 2014 as part of the Latin American Research Consortium on the Genetics of Parkinson's disease (LARGE-PD). We included patients who met UK Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria for PD [27]. Exclusion criteria were: (1) not taking levodopa at the time of the study evaluation, and (2) missing data about onset of LID. The study was approved by Ethics Committee of both medical schools and all participants provided written informed consent.

All patients were examined using a standardized assessment by movement disorders specialists, including the International Parkinson and Movement Disorders Society - Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) [28] and original Hoehn & Yahr stage [29]. These patients also underwent an interview based on a standardized structured questionnaire to record demographic and clinical data, including sex, age at onset of PD, age at time of study, PD duration (since time of symptom onset), levodopa therapy duration and current levodopa equivalent daily dose. Levodopa equivalent daily dose was calculated

according as previously described [30]. Medical charts were reviewed to confirm demographic and clinical data. Clinical motor phenotype (tremor dominant, postural instability with gait disorder, indeterminate) was defined following a method described previously [31].

The presence of LID was defined as a MDS-UPDRS Part IV score ≥ 1 on item 4.1 (time spent with dyskinesias), and severity of LID was assessed by MDS-UPDRS Part IV item 4.2 (functional impact of dyskinesias). Ten patients were assessed by a former version of the UPDRS [32]; for these patients, Part III (Motor Examination) of the former version of UPDRS was converted to MDS-UPDRS Part III by adding 7 points, as previously described [33], and scores of items 32 (LID frequency) and 33 (LID disability) of the former version of UPDRS were used as the same scores of items 4.1 and 4.2 of MDS-UPDRS, respectively, due to their equivalence.

2.2 Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard methods. All patients were genotyped for *NOS1* rs2682826 SNP (G/A substitution; G is the major allele). Genotyping was performed at LARGE-PD's coordinating site in Seattle, WA (University of Washington/VA Puget Sound Health Care System) using TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA) on a 7900HT Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, CA, USA).

2.3 Statistical analysis

We assessed Hardy-Weinberg equilibrium for rs2682826 using an exact test. Association between *NOS1* rs2682826 and presence of LID was tested using multivariate logistic regression under an additive model adjusting for sex, age at onset of PD, and levodopa therapy duration. Association between genotype and time spent with LID (measured by MDS-UPDRS item 4.1), or between genotype and functional impact of LID (measured by MDS-UPDRS item 4.2) was tested using ordinal regression adjusting for sex, age at onset of PD and levodopa therapy duration. All analyses were performed using Stata version 14.0 (StataCorp, College Station, TX).

3. Results

A total of 268 Brazilian PD patients were recruited for this study. Of these, 186 patients fulfilled inclusion and exclusion criteria (Figure 1). General demographic and clinical characteristics of patients according to presence of LID and rs2682826 genotype are shown in Table 1 and Table 2, respectively. Patients with LID had earlier onset of PD, longer disease and levodopa therapy duration, higher levodopa equivalent daily doses, increased scores in motor symptoms and severity, and a higher proportion of postural instability and gait disorder clinical phenotype.

Figure 1 Flow chart for the patient selection process.

General characteristics	Overall (n=186)	With Dyskinesia (n=91)	Without Dyskinesia (n=95)	p-value
Male sex, % (n)	58.6 (109)	54.9 (50)	62.1 (59)	0.32 ^b
Age at onset of PD ^a	51 (42-61)	46 (39-55)	56 (48-66)	<0.0001 ^c
Age at time of study ^a	60 (53-70)	59 (52-68)	64 (54-71)	0.54 ^c
Disease duration (years) ^a	8 (5-13)	12 (8-16)	6 (4-9)	<0.0001 ^c
Levodopa therapy duration (years) ^{a*}	5 (2-10)	9 (5-13)	3 (1-6)	<0.0001 ^c
Levodopa equivalent daily dose (mg/day) ^a	650 (400-1000)	900 (616-1150)	550 (300-700)	<0.0001 ^c
MDS-UPDRS Part III ^a	30 (20-43)	34 (21-46)	28 (18-41)	0.04 ^c
NOS rs2682826 genotype, % (n)				0.99 ^b
GG	53.7 (100)	53.8 (49)	53.6 (51)	
GA	39.7 (74)	39.5 (36)	40 (38)	
AA	6.4 (12)	6.5 (6)	6.3 (6)	
Clinical motor phenotype, % (n)				<0.0001 ^b
Tremor dominant	54.3 (101)	32.9 (30)	74.7 (71)	
Postural instability with gait disorder	37.6 (70)	59.3 (54)	16.8 (16)	
Indeterminate	8 (15)	7.6 (7)	8.4 (8)	
Hoehn & Yahr stage, % (n)				0.004 ^b
1	4.3 (8)	2.1 (2)	6.3 (6)	
2	73.6 (137)	64.8 (59)	82.1 (78)	
3	16.1 (30)	24.1 (22)	8.4 (8)	
4	3.7 (7)	4.3 (4)	3.1 (3)	
5	2.1 (4)	4.3 (4)	0	

Table 1 General demographic and clinical characteristics of PD patients, according to presence of LID.

^aValues in median (interquartile range)

^bChi-square test comparing frequencies between patients with and without dyskinesia

^cMann-Whitney test comparing medians between patients with and without dyskinesia

*Seven patients were excluded due to missing data about levodopa therapy duration (n = 179; PD with Dyskinesia, n = 86; PD Without Dyskinesia, n = 93)

General characteristics	GG (n=100)	GA (n=74)	AA (n=12)	p-value
Male sex, % (n)	61 (61)	55.4 (22)	58.3 (7)	0.76 ^b
Age at onset of PD ^a	51 (43-60)	51 (41-61)	59.5 (37-66)	0.83 ^c
Age at time of study ^a	60 (53-69)	59.5 (54-69)	62.5 (49-76)	0.95 ^c
Disease duration (years) ^a	8 (5-13)	8 (5-13)	8.5 (4-12)	0.92 ^c
Levodopa therapy duration (years) ^{a*}	6 (2-10)	5 (2-10)	4.5 (2-8)	0.85 ^c
Levodopa equivalent daily dose (mg/day) ^a	637 (400-1000)	700 (500-1028)	600 (375-1175)	0.69 ^c
MDS-UPDRS Part III ^a	29 (18-43)	33 (24-44)	21.5 (14-32)	0.08 ^c
Clinical motor phenotype, % (n)				0.99 ^b
Tremor dominant	56 (56)	52.7 (39)	50 (6)	
Postural instability with gait disorder	36 (36)	39.2 (29)	41.7 (5)	
Indeterminate	8 (8)	8.1 (6)	8.3 (1)	
Hoehn & Yahr stage, % (n)				0.59 ^b
1	4 (4)	5.4 (4)	0	
2	73 (73)	71.6 (53)	91.7 (11)	
3	18 (18)	16.2 (12)	0	
4	4 (4)	2.7 (2)	8.3 (1)	
5	1 (1)	4.1 (3)	0	

Table 2 General demographic and clinical characteristics of PD patients, according to NOS1 rs2682826 genotype.

^aValues in median (interquartile range)

^bChi-square test comparing frequencies between patients with distinct NOS1 rs2682826 genotypes

^cKruskal-Wallis test comparing medians between patients with distinct NOS1 rs2682826 genotypes

*Seven patients were excluded due to missing data about levodopa therapy duration (n = 179; PD with Dyskinesia, n = 86; PD Without Dyskinesia, n = 93)

Genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium, and genotype frequencies were similar to those described in a previous study of Brazilian PD patients [34]. There were no significant differences in population characteristics across genotypes (Table 2).

Multivariate models included 179 patients (7 patients were excluded due to missing data about levodopa therapy duration). No association was found between NOS1 rs2682826 genotypes and presence of LID (G allele, p = 0.85), but age at onset of PD and levodopa therapy duration were strong predictors of LID (Table 3). Also, there was no association between NOS1 rs2682826 genotypes and time spent with LID (G allele, p = 0.64) or functional impact of LID (G allele, p = 0.17).

	Adjusted OR	95% CI	p-value
NOS1 rs2682826 genotype	1.05	0.58-1.92	0.85
Age at onset of PD	0.95	0.92-.098	0.007
Levodopa therapy duration	1.38	1.24-1.54	<0.0001
Sex	0.72	0.34-1.55	0.41

Table 3 Association between NOS1 rs2682826 polymorphism (major allele G) and development of LID in PD patients. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

4. Discussion

We examined the association between a *NOS1* gene polymorphism and the presence, frequency, and impact of LID in PD patients. Our results suggest there is no association between *NOS1* rs2682826 genotype and risk of LID, or frequency and functional impact of LID.

Our data also confirmed the role of specific clinical risk factors on the onset of LID, as described before [12]. Age at onset of PD and levodopa therapy duration are well-known risk factors to LID: younger patients may have stronger compensatory dopaminergic mechanisms and higher vulnerability to LID, and chronic levodopa therapy induces physiological changes which cause dyskinesias [12, 35]. A higher frequency of postural instability and gait disorder clinical motor phenotype in patients with LID was also described in a recent study [36], suggesting this subtype of PD may represent an unfavorable distinct phenotype.

Two previous studies reported an association between *NOS1* rs2682826 and development of PD, and both observed that the A allele was correlated with increased risk [23, 24]. The association was stronger in male patients [23] and in patients with earlier onset of PD [24]. However, this result was not confirmed by two recent studies [25, 26]. Besides PD, there are positive studies associating *NOS1* polymorphisms with other neuropsychiatric conditions, such as schizophrenia [37], frontotemporal lobar dementia [38], Alzheimer's disease [39] and suicidal behavior [40, 41].

NOS1 rs2682826 is located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of exon 29 and does not result in amino acid substitution, but this gene region is critical for regulation of splicing, efficiency of translation, and mRNA stability/processing [23, 34, 42]. The *NOS1* gene shows a large diversity of mRNA transcripts

obtained by alternative splicing or promoter usage, and part of this is regulated by 3'-UTR of exon 29, which affects the size of *NOS1* mRNA and its function [35, 43, 44].

This study had several limitations. An important issue is our small sample size, because smaller effects in genetic association studies require larger sample sizes for adequate power. As a cross-sectional study, we cannot determine that presence of a genetic risk factor precede LID, since both groups (with and without LID) were evaluated at the same time. Presence of LID was based on a one-time assessment, which may cause failures in detection of dyskinesias, considering these involuntary movements can vary according many factors, as medication dosage and meal time. Furthermore, the measurement of daily frequency and severity of LID based on items 4.1 and 4.2 of MDS-UPDRS is directly dependent on patient and caregiver's recall. Our genotype analysis was restricted to one SNP and did not explore other regions of this large gene.

5. Conclusions

Our findings suggest *NOS1* rs2682826 SNP is not a genetic risk factor for development of LID in PD. Further and more comprehensive studies must be conducted to confirm this genetic association in larger samples, and to analyze possible interactions with other SNPs.

Acknowledgments

We are grateful to all patients for their participation in this study. We thank Dr. Elaine Del Bel for reviewing the manuscript. We thank Manuelina Macruz Capelari, Ângela Pimentel Vieira, Nathália Novaretti for support to acquisition and storing of data. We also thank Larissa Serveli, Jennifer Tran and Dora Yearout for technical assistance.

Funding

This work was supported by the Parkinson's Disease Foundation. One author (B.L.S.L.) received a MDS-PAS Visiting Trainee Grant from the International Parkinson and Movement Disorder Society for

personal costs support. This material is the result of work supported with resources and the use of facilities at the VA Puget Sound Health Care System.

References

- [1] Statistics on Parkinson's Disease. In: Parkinson's Disease Foundation [online]. Available at: http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics. Accessed November 27, 2016.
- [2] L.V. Kalia, A.E. Lang, Parkinson's disease, *Lancet* 386 (2015) 896-912.
- [3] C.W. Olanow, Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease, *Mov Disord* 30 (2015) 37-44.
- [4] J. Jankovic, Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: Clinical manifestations, *Mov Disord* 20 (2005) S11-S16.
- [5] C.C. Aquino, S.H. Fox, Clinical spectrum of levodopa-induced complications, *Mov Disord* 30 (2015) 80-89.
- [6] A. Schrag, C. Selai, M. Jahanshahi, N.P. Quinn, The EQ-5D – a generic quality of life measure – is a useful instrument to measure quality of life in patients with Parkinson's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69 (2000) 67-73.
- [7] C. Marras, A. Lang, M. Kohn, G. Tomlinson, G. Naglie, Quality of life in early Parkinson's disease: Impact of dyskinesias and motor fluctuations, *Mov Disord* 19 (2004) 22-28.
- [8] A. Manson, P. Stirpe, A. Schrag, Levodopa-induced dyskinesias – Clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life, *J Parkinsons Dis* 2 (2012) 189-198.
- [9] M. Péchevis, C.E. Clarke, P. Vieregge, B. Khoshnood, C. Deschaseaux-Voinet, G. Berdeaux, M. Ziegler. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective European study, *Eur J Neurol* 12 (2005) 956-963.
- [10] S. Chapuis, L. Ouchchane, O. Metz, L. Gerbaud, F. Durif, Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life, *Mov Disord* 20 (2005) 224-230.
- [11] M.C. Hechtner, T. Vogt, Y. Zöllner, S. Schröder, J.B. Sauer, H. Binder, S. Singer, R. Mikolajczyk, Quality of life in Parkinson's disease patients with motor fluctuations and dyskinesias in five European countries, *Parkinsonism Relat Disord* 20 (2014) 969-974.

- [12] J.Y. Lee, B.S. Jeon, Risk factors for levodopa-induced dyskinesia, in: S.H. Fox, J.M. Brotchie (Eds.), *Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease*, Springer-Verlag, London, 2014, pp. 51-68.
- [13] P. Calabresi, M. Di Filippo, V. Ghiglieri, N. Tambasco, B. Picconi, Levodopa-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap, *Lancet Neurol* 9 (2010) 1106-1117.
- [14] F.E. Padovan-Neto, M.B. Echeverry, V. Tumas, E.A. Del-Bel, Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease, *Neuroscience* 159 (2009) 927-935.
- [15] F.E. Padovan-Neto, M.B. Echeverry, S. Chiavegatto, E. Del-Bel, Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and long-term L-DOPA-induced-dyskinesia in hemiparkinsonian rats, *Front Syst Neurosci* 5 (2011) 40.
- [16] F.E. Padovan-Neto, N.R. Ferreira, D. de Oliveira-Tavares, D. de Aguiar, C.A. da Silva, R. Raisman-Vozari, E. Del-Bel, Anti-dyskinetic effects of the neuronal nitric oxide inhibitor is linked to decrease of FosB/DeltaFosB expression, *Neurosci Lett* 541 (2013) 126-131.
- [17] N. Novaretti, F.E. Padovan-Neto, V. Tumas, C.A. da Silva, E.A. Del-Bel, Lack of tolerance for the anti-dyskinetic effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, in rats, *Braz J Med Biol Res* 43 (2010) 1047-1053.
- [18] E. Del-Bel, F.E. Padovan-Neto, R.E. Szawka, C.A. da Silva, R. Raisman-Vozari, J. Anselmo-Franci, A.C. Romano-Dutra, F.S. Guimarães, Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment, *Neurotox Res* 25 (2014) 33-44.
- [19] C.C. Ouimet, K.C. Langley-Gullion, P. Greengard, Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen, *Brain Res* 808 (1998) 8-12.
- [20] E. Del-Bel, F.E. Padovan-Neto, M. Bortolanza, V. Tumas, A.S. Aguiar Jr, R. Raisman-Vozari, R.D. Prediger, Nitric oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia?, *Front Biosci (Elite Ed)* 7 (2015) 168-192.
- [21] W. Xu, P. Gorman, D. Sheer, G. Bates, J. Kishimoto, L. Lizhi, P. Emson, Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 64 (1993) 62-63.
- [22] F. Freudenberg, A. Althoff, A. Reif, Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk for psychiatric disorders, *Genes Brain Behav* 14 (2015) 46-63.

- [23] C. Levecque, A. Elbaz, J. Clavel, F. Richard, J.S. Vidal, P. Amouyel, C. Tzourio, A. Alperovitch, M.C. Chartier-Harlin, Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study, *Hum Mol Genet* 12 (2003) 79-86.
- [24] D.B. Hancock, E.R. Martin, J.M. Vance, W.K. Scott, Nitric oxide synthase genes and their interactions with environmental factors in Parkinson's disease, *Neurogenetics* 9 (2008) 249-262.
- [25] C. Huerta, E. Sánchez-Ferrero, E. Coto, M. Blázquez, R. Ribacoba, L.M. Guisasola, C. Salvador, V. Alvarez, No association between Parkinson's disease and three polymorphisms in the eNOS, nNOS, and iNOS genes, *Neurosci Lett* 413 (2007) 202-205.
- [26] S.P. Gupta, R. Kamal, S.K. Mishra, M.K. Singh, R. Shukla, M.P. Singh, Association of Polymorphism of Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene with Risk to Parkinson's Disease, *Mol Neurobiol* 53 (2016) 3309-3314.
- [27] W.R. Gibb, A.J. Lees. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51 (1988) 745-752.
- [28] C.G. Goetz, B.C. Tilley, S.R. Shaftman, G.T. Stebbins, S. Fahn, P. Martinez-Martin, W. Poewe, C. Sampaio, M.B. Stern, R. Dodel, B. Dubois, R. Holloway, J. Jankovic, J. Kulisevsky, A.E. Lang, A. Lees, S. Leurgans, P.A. LeWitt, D. Nyenhuis, C.W. Olanow, O. Rascol, A. Schrag, J.A. Teresi, J.J. van Hilten, N. LaPelle. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 23 (2008) 2129-2170.
- [29] M.M. Hoehn, M.D. Yahr. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 17 (1967) 427-442.
- [30] C.L. Tomlinson, R. Stowe, S. Patel, C. Rick, R. Gray, C.E. Clarke, Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease, *Mov Disord* 25 (2010) 2649-2653.
- [31] G.T. Stebbins, C.G. Goetz, D.J. Burn, J. Jankovic, T.K. Khoo, B.C. Tilley, How to identify tremor dominant and postural instability/gait difficulty groups with the movement disorder society unified Parkinson's disease rating scale: comparison with the unified Parkinson's disease rating scale, *Mov Disord* 28 (2013) 668-670.
- [32] S. Fahn, R.L. Elton, UPDRS Development Committee, Unified Parkinson's Disease Rating Scale, in: S. Fahn, C.D. Marsden, M. Goldstein, D.B. Calne (Eds.), *Recent developments in Parkinson's disease II*, Macmillan Health Care Information, Florham Park, NJ, 1987, pp. 153-163.

- [33] J.G. Hentz, S.H. Mehta, H.A. Shill, E. Driver-Dunkley, T.G. Beach, C.H. Adler, Simplified conversion method for unified Parkinson's disease rating scale motor examinations, *Mov Disord* 30 (2015) 1967-1970.
- [34] R. Lacchini, J.J. Muniz, Y.T. Nobre, A.J. Cologna, A.C. Martins, J.E. Tanus-Santos, nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction, *Pharmacogenomics* 15 (2014) 775-784.
- [35] Zhang YH, Tang BS, Song CY et al. The relationship between the phenotype of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia, *Neurosci Lett* 556 (2013) 109-12.
- [36] A. Nicoletti, G. Mostile, G. Nicoletti, G. Arabia, G. Iliceto, P. Lamberti, R. Marconi, L. Morgante, P. Barone, A. Quattrone, M. Zappia, Clinical phenotype and risk of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease, *J Neurol* 263 (2016) 888-894.
- [37] T. Shinkai, O. Ohmori, H. Hori, J. Nakamura, Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia, *Mol Psychiatry* 7 (2002) 560-563.
- [38] E. Venturelli, C. Villa, E. Scarpini, C. Fenoglio, I. Guidi, C. Lovati, A. Marcone, F. Cortini, D. Scalabrini, F. Clerici, N. Bresolin, C. Mariani, S. Cappa, D. Galimberti, Neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism increases the risk for frontotemporal lobar degeneration, *Eur J Neurol* 15 (2008) 77-81.
- [39] D. Galimberti, E. Venturelli, A. Gatti, C. Lovati, C. Fenoglio, C. Mariani, G. Forloni, N. Bresolin, E. Scarpini, Association of neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism with Alzheimer's disease, *J Neurol* 252 (2005) 985-986.
- [40] D. Rujescu, I. Giesling, I. Mandelli, B. Schneider, A.M. Hartmann, A. Schnabel, K. Maurer, H.J. Möller, A. Serretti, NOS-I and -III gene variants are differentially associated with facets of suicidal behavior and aggression-related traits, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B (2008) 42-48.
- [41] H. Cui, I. Supriyanto, M. Asano, Y. Ueno, Y. Nagasaki, N. Nishiguchi, O. Shirakawa, A. Hishimoto, A common polymorphism in the 3'-UTR of the NOS1 gene was associated with completed suicides in Japanese male population, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16 (2010) 992-996.
- [42] L.I. Hollá, M. Schüller, D. Bucková, J. Vácha, Neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and IgE-mediated allergy in the Central European population, *Allergy* 59 (2004) 548-552.

- [43] A.V. Hall, H. Antoniou, Y. Wang, A.H. Cheung, A.M. Arbus, S.L. Olson, W.C. Lu, C.L. Lau, P.A. Marsden, Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1), *J Biol Chem* 269 (1994) 33082-33090.
- [44] Y.C. Wang, Y.J. Liou, D.L. Liao, Y.M. Bai, S.C. Yu, J.Y. Chen, Association analysis of a neural nitric oxide synthase gene polymorphism and antipsychotics-induced tardive dyskinesia in Chinese schizophrenic patients, *J Neural Transm (Vienna)* 111 (2004) 623-629.