

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FGF20 COM A IDADE
DE INÍCIO DA DOENÇA DE PARKINSON

Leonardo Cordenonzi Pedroso de Albuquerque

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO FGF20 COM A IDADE
DE INÍCIO DA DOENÇA DE PARKINSON

Leonardo Cordenonzi Pedroso de Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Artur Francisco Schumacher
Schuh

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2017

*“...every one of us is a fiddler on the roof
trying to scratch out a pleasant, simple tune
without breaking his neck.*

It isn't easy.”

Joseph Stein, in “Fiddler on the Roof”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade da vida e do conhecimento.

Ao meu orientador, Artur Schuh, pelo suporte e presença constante ao longo da minha formação.

Aos meus pais, pelo que sou hoje.

À minha esposa Polyana, pelo companheirismo e paciência.

E a todos os meus familiares, pelo amor de sempre.

RESUMO

Introdução: A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente e está relacionada à perda de neurônios dopaminérgicos na porção ventrolateral da substância *nigra*. A fisiopatologia da doença é pouco conhecida, mas fatores de risco genéticos e ambientais parecem ter um papel. O FGF20 é um fator neurotrófico preferencialmente expresso na substância *nigra*, e está relacionado com maior sobrevivência de neurônios dopaminérgicos. O objetivo deste estudo é avaliar se polimorfismos genéticos do *FGF20* está associado com a idade de início da doença de Parkinson. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal. O polimorfismo rs1989754 foi genotipado em 224 pacientes ambulatoriais com doença de Parkinson idiopática. Uma entrevista estruturada foi realizada com os pacientes e seus familiares, e a idade de início da doença de Parkinson foi definida como a idade de início dos sintomas motores. **Resultados:** O polimorfismo rs1989754 do gene *FGF20* está associado com a idade de início da doença de Parkinson. Os portadores do alelo C tiveram uma idade de início mais precoce da doença tanto quando foi considerado um modelo dominante (56 ± 11.8 vs. 61.5 ± 11.6 anos, $p=0.001$), quando um modelo aditivo (55 ± 10.9 anos para o genótipo CC, 56.4 ± 11.2 anos para o genótipo CG e 61.5 ± 11.6 anos para o genótipo GG, $p=0.002$). **Conclusão:** Os achados do presente estudo sugerem que o polimorfismo rs1989754 do FGF20 está associado com idade de início mais precoce da doença de Parkinson, e dão apoio à hipótese de que a idade de início da doença de Parkinson é modulada por polimorfismos comuns de múltiplos genes, cada um com tamanho de efeito pequeno.

Palavras-chave: doença de Parkinson; idade de início; FGF20.

ABSTRACT

Background: Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disorder and is related to loss of dopaminergic neurons in the ventrolateral substantia nigra. The physiopathology of the disease is poorly understood, but both environmental and genetics risk factors are thought to play a role. FGF20 is a neurotrophic factor preferentially expressed in substantia nigra that enhances dopaminergic cells survival. The aim of this study is to evaluate if polymorphisms in *FGF20* are associated with age of onset of Parkinson's disease. **Methods:** This is a transversal study, in which the rs1989754 polymorphism was genotyped 224 outpatients with idiopathic PD. A structured interview was performed with patients and their relatives, and the age of onset of Parkinson's disease was defined as the age of onset of the motor symptoms, as reported by the patients and their caregivers. **Results:** We found an association of the rs1989754 single nucleotide polymorphism with the age of onset of Parkinson's disease. The carriers of the C allele had an earlier age of onset of the disease in both dominant (56 ± 11.8 vs. 61.5 ± 11.6 years, $p=0.001$) and additive models (55 ± 10.9 years for CC genotype, 56.4 ± 11.2 years for CG genotype and 61.5 ± 11.6 years for GG genotype, $p=0.002$). **Conclusion:** The findings of the present study suggest that FGF20 rs1989754 single nucleotide polymorphism is associated with younger age at onset of Parkinson's disease, and also support the hypothesis that the age of onset of Parkinson's disease is modulated by common polymorphisms of multiple risk genes with low effect size.

Keywords: Parkinson's disease; age at onset; FGF20.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: estratégia de busca de referências bibliográficas.....	11
Tabela 2: critérios diagnósticos do <i>UK Parkinson's Disease Society Brain Bank</i>	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COMT	Catecol O-Metiltransferase
DBS	Deep brain stimulator, estimulador cerebral profundo
DP	Doença de Parkinson
FGF	Fibroblast growth factor, fator de crescimento de fibroblastos
II	Idade de início
MAOB	Monoamina Oxidase do tipo B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
PET	Positron emission tomography
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> , polimorfismos de nucleotídeo único
SPECT	Single-photon emission computed tomography

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Revisão da literatura	11
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	11
2.2. Doença de Parkinson.....	11
2.2. Idade de início da doença de Parkinson	18
2.2. FGF20 e doença de Parkinson	20
3. Justificativa.....	23
4. Objetivos	24
5. Referências	25
6. Artigo.....	30
7. Considerações finais	41
8. Perspectivas futuras	42

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson foi descrita há 200 anos por James Parkinson, que caracterizou predominantemente os sintomas motores da doença. Com o passar do tempo e o avanço no conhecimento de todo o espectro clínico da doença, diversos sintomas não motores passaram a ser reconhecidos. Os aspectos fisiopatológicos da doença de Parkinson, por outro lado, são bem menos caracterizados. Por mais que as características patológicas típicas de formação de corpúsculos de Lewy e acometimento da substância *nigra* sejam conhecidas desde fins do século XIX, foi somente na última década do século XX que a α -sinucleína, a proteína patologicamente agregada nos corpúsculos de Lewy, foi identificada. Somente no início do século XXI que a forma como a doença progride foi mais bem esclarecida (Ohmachi *et al.*, 2000; Fahn, 2017; Poewe *et al.*, 2017).

No final do século passado houve identificação de formas genéticas da doença de Parkinson. A princípio foram reconhecidas formas Mendelianas de transmissão genética (Delamarre e Meissner, 2017), porém com o avanço do conhecimento alterações genéticas que conferem maior risco ou modulam o fenótipo da doença foram identificados, algumas delas frequentes na população (IPDGC e WTCCC2, 2011; Escott-Price *et al.*, 2015). Ainda, a partir dos anos 2000 diversas pesquisas tiveram como foco a identificação de polimorfismos genéticos associados a idade de início mais precoce da doença.

A identificação de tais fatores de risco genéticos é importante por diversos motivos. Do ponto de vista assistencial, a maior quantidade de informações disponíveis pode fornecer informações prognósticas para os pacientes e sobre o risco dos seus familiares. Porém, provavelmente o maior benefício de conhecer os fatores genéticos envolvidos com a doença de Parkinson seja o avanço no entendimento da sua fisiopatologia, e desta forma a possibilidade de propor, no futuro, terapêuticas que possam de fato alterar a história natural da doença. O objetivo deste estudo é avaliar se um polimorfismo do gene do fator de crescimento de fibroblastos 20, um peptídeo neurotrófico, está relacionado com a idade de início dos sintomas motores da Doença de Parkinson.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Foram realizadas pesquisas com descritores chaves no PubMed e no Embase. Os descritores escolhidos foram “Parkinson disease”, “age at onset” e “FGF20”. Somente artigos em inglês foram considerados para a revisão.

No PubMed, foram encontrados 2.663 artigos com a pesquisa “(Parkinson disease) AND (age at onset)” e 30 artigos com a pesquisa “(Parkinson disease) AND FGF20”. No Embase, foram encontrados 6.790 artigos com a pesquisa “Parkinson AND disease AND age AND onset” e 46 artigos com a pesquisa “Parkinson AND disease AND FGF20” (tabela 1).

Os artigos foram selecionados com foco em polimorfismos genéticos associados a menor idade de início da doença de Parkinson. A seleção foi feita pelo título em um primeiro momento, e após com a leitura do resumo dos artigos de interesse. Os artigos considerados relevantes ao tema em estudo foram lidos. Ainda, foram buscadas referências de interesse dentro dos artigos selecionados para o estudo.

Tabela 1: estratégia de busca de referências bibliográficas.

Descritores	PubMed	Embase
“Parkinson disease” e “age at onset”	2.663	6.790
“Parkinson disease” e “FGF20”	30	46

2.2 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, trata-se de uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo início insidioso e curso progressivo de bradicinesia, rigidez e tremor, além de múltiplos outros sintomas motores e não motores (Fahn, 2017; Poewe *et al.*, 2017). É a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, atrás apenas da doença de Alzheimer, e tem incidência e prevalência dependentes de idade. A DP é rara antes

dos 50 anos, com cerca de 41 casos por 100.000 pessoas entre os 40 e 49 anos de idade, e 1.903 casos por 100.000 pessoas acima dos 80 anos. Ainda, é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres (Delamarre e Meissner, 2017; Poewe *et al.*, 2017).

A DP tem uma grande variedade de manifestações clínicas, motoras e não motoras. Os sintomas motores principais são a bradicinesia, definida como alentecimento e/ou redução da amplitude dos movimentos, rigidez, tremor de repouso, instabilidade postural e *freezing* da marcha. O início dos sintomas é, via de regra, unilateral, e a tendência é que permaneçam assimétricos durante todo o curso da doença (Poewe *et al.*, 2017). Por mais que os sintomas motores sejam os mais evidentes clinicamente, em muitos casos os sintomas não motores podem dominar o quadro clínico e serem os principais responsáveis pela piora da qualidade de vida do paciente. Alguns deles, como depressão, distúrbios do sono, hiposmia e constipação, podem preceder o aparecimento dos sintomas motores em vários anos. Com a progressão da doença, outros sintomas podem surgir, tais como distúrbios urinários, disfunção autonômica, dor, apatia, alucinações, disfunção cognitiva e quadro demencial (Schapira *et al.*, 2017).

O diagnóstico da DP é feito com base nos achados clínicos. Os critérios mais utilizados são os do *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*, que define a bradicinesia como o sintoma cardinal da doença. Além desta, que obrigatoriamente deve estar presente, devem ser encontrados também rigidez ou tremor de repouso típico, além da ausência de critérios de exclusão, tais como história de traumatismos cranioencefálicos de repetição ou encefalite, uso de neurolépticos, disfunção autonômica precoce, paralisia do olhar supranuclear, quadro demencial precoce, doença estritamente unilateral após três anos de evolução e resposta pobre a altas doses de levodopa. Ainda, são critérios que suportam o diagnóstico o início unilateral da doença e a persistência de assimetria ao longo de toda a sua duração, curso progressivo da doença e resposta ótima à levodopa (Tabela 2). Tais critérios tem acurácia diagnóstica de cerca de 80% (Hughes *et al.*, 1992). Em relação a exames complementares, a ressonância magnética pode identificar causas secundárias para o parkinsonismo, ou mostrar alterações específicas nos núcleos da base e estruturas infratentoriais em casos de

Tabela 2: critérios diagnósticos do *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank*

Passo 1: diagnóstico de síndrome parkinsoniana

Bradicinesia

Pelo menos um dos seguintes:

Rigidez muscular

Tremor de repouso a 4-6 Hz

Instabilidade postural, não causada por disfunção visual, vestibular, cerebelar ou sensitiva

Passo 2: critérios de exclusão para DP

História de múltiplos acidentes vasculares cerebrais repetitivos, com evolução em degraus dos sintomas parkinsonianos

História de traumatismos crânio-encefálicos repetitivos

História prévia de encefalite

Crises oculogíricas

Uso de neurolépticos no início dos sintomas

Remissão sustentada

Doença estritamente unilateral após três anos de evolução

Paralisia do olhar supranuclear

Sinais cerebelares

Sinais autonômicos graves precoces

Demência precoce

Sinal de Babinski

Presença de tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante

Ausência de resposta a altas doses de levodopa

Exposição a MPTP

Passo 3: critérios de suporte ao diagnóstico de DP (necessários três ou mais)

Início unilateral

Presença de tremor de repouso

Doença progressiva

Persistência da assimetria dos sinais motores

Resposta excelente à levodopa

Presença de coréia induzida pela levodopa

Resposta à levodopa por 5 anos ou mais

Curso clínico de 10 anos ou mais

Adaptado de Hughes *et al.* (1992).

parkinsonismos atípicos. Outras opções incluem a realização de *positron emission tomography* (PET) ou *single-photon emission computed tomography* (SPECT) do encéfalo com marcadores dopaminérgicos, ou ainda PET ou SPECT cardíaco com marcadores noradrenérgicos, que mostram desnervação simpática em casos de DP (Poewe *et al.*, 2017).

A DP está relacionada a lesões de vias dopaminérgicas nigroestriatais, principalmente das áreas ventrolaterais da substância nigra (Dickson, 2017). A redução da transmissão dopaminérgica nas regiões motoras do corpo estriado levam ao aumento da transmissão inibitória talamocortical através do ácido gama-aminobutírico e, em última instância, aos sinais clínicos de parkinsonismo (Poewe *et al.*, 2017). Na avaliação histopatológica são observadas despigmentação, perda de neurônios e gliose na substância nigra (Fahn, 2017). Do ponto de vista microscópico, o marco da doença é a presença de corpúsculos de Lewy, que são agregados intraneuronais de uma proteína chamada α -sinucleína, e dos neuritos de Lewy, que são agregados de α -sinucleína nos processos celulares, além de perda neuronal. Tais alterações são encontradas principalmente na substância nigra, núcleos da rafe, *locus coeruleus*, núcleo basal de Meynert e núcleo motor dorsal do vago (Dickson, 2017).

A patologia e a progressão da DP foi mais bem compreendida com o trabalho de Braak *et al.* (2003), que realizaram estudo anatomopatológico em três grupos de indivíduos: um com diagnóstico de DP durante a vida; um segundo grupo com achados patológicos de DP, porém sem esse diagnóstico em vida; e um terceiro grupo de indivíduos sem histórico ou achados patológicos compatíveis com DP. Os autores encontraram acometimento do núcleo motor dorsal do vago, da zona reticular intermediária, do bulbo olfatório e do núcleo olfatório anterior nas fases iniciais da doença, além de evidências de progressão rostral da doença. A partir deste estudo foi proposto um esquema evolutivo da doença, dividido em seis estágios. No primeiro estágio, há acometimento restrito ao bulbo, com lesões do núcleo motor dorsal do vago e/ou da zona reticular intermediária, ou ainda do bulbo olfatório e núcleo olfatório anterior; no segundo estágio, há acometimento de estruturas pontinas, como os núcleos da rafe e complexo *coeruleus-subcoeruleus*; no terceiro estágio há o envolvimento do mesencéfalo, com lesões na substância nigra; o quarto

estágio é marcado pelo acometimento do mesocórtex temporal anteromedial; a partir do quinto estágio há progressão das lesões para estruturas neocorticais, em áreas de associação e pré-frontais; e, por fim, no sexto estágio, há o envolvimento de áreas de associação de primeira ordem, áreas pré-motoras e eventualmente nas áreas motoras e sensitivas primárias (Braak *et al.*, 2003). Tal esquema vai ao encontro de observações prévias de que os sintomas não motores se iniciam anos antes dos sintomas motores, que seriam iniciados apenas no terceiro estágio da doença, quando há envolvimento da substância nigra, enquanto que sintomas como constipação, depressão, hiposmia e distúrbios do sono podem ser explicados por lesões que ocorrem nos estágios um e dois da doença; ainda, a progressão da patologia para estruturas neocorticais explica a evolução frequente dos pacientes para um quadro demencial (Fahn, 2017). Com o reconhecimento do envolvimento precoce de estruturas do tronco encefálico relacionadas à olfação e sistema gastrointestinal, foi levantada a hipótese de que um agente ambiental poderia desencadear a doença, atualmente em avaliação por vários grupos de pesquisa (Braak e Del Tredici, 2017).

A etiologia da DP ainda é pouco conhecida, e atualmente é considerada como uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, resultando em disfunções mitocondriais, lisossomais, da homeostase do cálcio, neuroinflamação e estresse oxidativo (Nandipati e Litvan, 2016). O primeiro agente ambiental fortemente relacionado ao desenvolvimento da DP foi o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), associado ao desenvolvimento de parkinsonismo de início rápido e responsivo à levodopa, em usuários de heroína. Ainda, o uso ocupacional de múltiplos pesticidas, em especial da classe dos organoclorados, está bastante relacionado ao desenvolvimento da DP, inclusive com um efeito dose-resposta; a exposição ocupacional a metais também já foi associada à DP, porém com resultados conflitantes. Por outro lado, há também exposições ambientais associadas com proteção à DP. Destas, a mais clássica é o tabagismo, porém o consumo de café e chá, especialmente chá preto, também está associado com menor risco de DP (Nandipati e Litvan, 2016; Delamarre e Meissner, 2017).

Além de fatores de risco ambientais, houve um avanço significativo no conhecimento sobre a contribuição genética para o risco de DP nas últimas duas

décadas, inclusive com a descrição de várias formas da doença com transmissão mendeliana. Atualmente, são conhecidas diversas formas de DP com transmissão autossômica dominante ou recessiva, e esta lista não para de crescer (Poewe *et al.*, 2017). O primeiro gene associado a uma forma familiar, autossômica dominante, de DP foi o SNCA, que codifica a α -sinucleína, com descrições de mutações de ponto associadas a quadros típicos de DP e de duplicações ou triplicações do gene associadas a parkinsonismo de início precoce e quadro demencial importante. A forma de DP autossômica dominante mais frequente, no entanto, é causada por mutações no gene LRRK2, que está associada a quadro típico de DP de início tardio, e tem penetrância incompleta. Entre as formas recessivas, a forma mais frequente está relacionada a mutações no gene da Parkina, que clinicamente se manifesta como um parkinsonismo de início precoce (abaixo de 45 anos), complicado por distonia e manifestações psiquiátricas importantes. Também há diversas mutações genéticas que conferem maior risco de DP, sendo que a principal é a heterozigose para mutações no gene da Glicocerebrosidase; também já foram descritas mutações no gene MAPT e outras mutações nos genes SNCA e LRRK2, entre muitas outras, como fatores de risco para o desenvolvimento da DP (Delamarre e Meissner, 2017; Poewe *et al.*, 2017).

Além das formas genéticas com transmissão mendeliana ou de mutações genéticas associadas a maior risco de DP, houve interesse nos últimos anos, a partir do desenvolvimento de estudos de associação genômica, pela pesquisa de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) associados ao risco do desenvolvimento da DP. Tais estudos tem como vantagem a avaliação da contribuição de múltiplos polimorfismos genéticos para uma doença ou condição, mesmo quando cada polimorfismo tem uma associação fraca (Escott-Price *et al.*, 2015), e são interessantes principalmente para o estudo de doenças com potencial risco poligênico. Um desses estudos, além de confirmar SNPs em seis *loci* já identificados previamente nos genes MAPT, SNCA, HLA-DRB5, BST1, GAK e LRRK2, identificou cinco novos *loci*, nos genes ACMSD, STK39, MCCC1/LAMP3, SYT11 e CCDC62/H1P1R (IPDGC, 2011). Outro estudo, com metodologia semelhante, além de confirmar os *loci* já descritos, identificou cinco novos SNPs relacionados a maior risco de DP, nos genes PARK16, STBD1, GPNMB, FGF20 e STX1B (IPDGC e WTCCC2, 2011).

Por mais de 100 anos a DP não teve terapia efetiva, e o tratamento era realizado basicamente com fármacos com ação antimuscarínica. Apenas em fins da década de 60 do século passado que foi demonstrada a melhora importante dos sintomas motores da doença com o uso de levodopa, e desde então esta se tornou a principal droga no tratamento da doença (Fahn, 2017). Para evitar o metabolismo periférico da levodopa e aumentar a sua biodisponibilidade no sistema nervoso central, o fármaco é utilizado sempre em associação com um inibidor da aminoácido descarboxilase periférica, como a carbidopa e a benserazida (Kiss e Soares-Da-Silva, 2014). Atualmente, a levodopa é a droga de primeira linha no tratamento da DP e usualmente todos os pacientes irão utilizá-la em algum momento na evolução da doença.

Apesar de bastante efetiva para o controle dos sintomas motores, a terapia com levodopa não é isenta de complicações, e uma proporção significativa dos pacientes desenvolverá algum tipo de flutuação motora ao longo da terapia, principalmente discinesias e esgotamento da dose (necessidade de doses cada vez maiores, e em intervalos menores, para manter o benefício do tratamento). Uma opção à levodopa são os agonistas dopaminérgicos, como o pramipexol e a apomorfina, que podem ser usados em associação com a levodopa, ou ainda em monoterapia. Alguns autores sugerem o uso de fármacos desta classe em monoterapia para pacientes jovens em fase inicial da doença, para postergar o aparecimento de complicações motoras relacionadas ao uso de levodopa. Outras opções de tratamento incluem os inibidores da Monoamina Oxidase do tipo B (MAOB), como a selegilina e a rasagilina, que podem ser usadas em monoterapia nas fases iniciais da doença, ou em associação com outros medicamentos. Os inibidores da Catecol O-Metiltransferase (COMT), como o entacapone e o tolcapone, podem ser usados em associação com levodopa para o tratamento das complicações motoras. Ainda, a amantadina, um agente antiviral com efeito antiglutamatérgico e dopaminérgico, é utilizada para o tratamento das discinesias induzidas pela levodopa. Conforme haja o surgimento de complicações motoras relacionadas ao uso de levodopa, a tendência é que sejam realizados ajustes no tratamento, com redução e menor intervalo entre as doses dessa, e introdução de fármacos das outras classes citadas.

Uma porção significativa dos pacientes, entretanto, acabará desenvolvendo complicações motoras incapacitantes a despeito de múltiplos ajustes da terapia. Uma alternativa, neste caso, é a implantação de um estimulador cerebral profundo (DBS, *deep brain stimulator*), que pode ter como alvos o núcleo subtalâmico ou o globo pálido interno. O implante do DBS está associado com a melhora das complicações motoras relacionadas à levodopa, e ainda à redução das doses dos medicamentos. Outra indicação para a implantação de um DBS é a presença de tremores incapacitantes, que podem ser refratários ao tratamento com levodopa (Oertel e Schulz, 2016; Fahn, 2017; Schapira *et al.*, 2017). Infelizmente, nenhum tipo de tratamento mostrou-se eficaz em alterar a história natural da doença, até o momento (Oertel e Schulz, 2016). Em relação aos sintomas não motores, o interesse no seu tratamento surgiu bem mais recentemente, de maneira que são muito menos estudados. Estudos controlados nessa área são raros e o desenvolvimento de terapias efetivas para os sintomas não motores é um dos desafios atuais do tratamento da DP (Oertel e Schulz, 2016; Schapira *et al.*, 2017).

2.2 Idade de início da DP

Outro tema de interesse, nos últimos anos, foi a pesquisa de como alterações genéticas podem modular o fenótipo da DP. A partir dos anos 2000, houve a publicação de diversos estudos que relacionaram mutações genéticas e SNPs ao início mais precoce da DP. Zarepari *et al.* (2002) estudaram a associação dos genótipos da apolipoproteína E (APOE) com a idade de início (II) da DP em 549 pacientes norte-americanos, e encontraram menor II naqueles portadores dos genótipos $\epsilon 3\epsilon 4/\epsilon 4\epsilon 4$ em relação aos portadores de $\epsilon 3\epsilon 3$. Pela mesma linha, Li *et al.* (2004) investigaram 972 pacientes, australianos e norte-americanos, com histórico de DP familiar e 873 controles, e encontraram II mais precoce nos portadores dos genótipos APOE $\epsilon 3\epsilon 4/\epsilon 4\epsilon 4$, além de maior risco de desenvolver DP; já Ghebremedhin *et al.* (2006), ao investigar a relação dos genótipos APOE em 108 pacientes e 108 controles holandeses, encontraram mais frequência do genótipo $\epsilon 4$ nos pacientes, porém não encontraram associação com II mais precoce. Li *et al.* (2003), após identificar a ligação de uma região do cromossomo 10q com menor II na DP e na Doença de Alzheimer, identificaram SNPs no gene Glutathione S-

transferase ômega 1 relacionados II mais precoce em ambas as doenças; Blomqvist *et al.* (2004), estudando a mesma região cromossômica em 306 portadores de DP e 321 controles da Austrália, identificaram polimorfismos na região do gene da Enzima Degradadora de Insulina associados a idade de início mais precoce da doença (definida neste estudo como menor do que 60 anos). Karamohamed *et al.* (2005) estudaram SNPs no gene BDNF de 597 pacientes com DP e histórico familiar, de vários centros dos Estados Unidos, Canadá, Europa e Austrália, e 130 controles, e encontraram evidência da associação dos SNPs G196A, C1751792 e rs2049045 com idade de início da DP. Klebe *et al.* (2013) pesquisaram a associação do polimorfismo Val158Met da COMT com a II da DP em 5.886 pacientes e 10.723 controles dos Estados Unidos e Europa. O genótipo Val/Val, que codifica uma enzima com alta atividade, se associou a menor II da DP em relação ao genótipo Met/Met, que codifica uma enzima com baixa atividade. Nielsen *et al.* (2013) investigaram a associação de 1.327 SNPs de 120 genes relacionados a funções do sistema nervoso central, particularmente que codificam neurotransmissores ou receptores, além de genes relacionados a estresse oxidativo, inflamação e transporte de metais, em 322 pacientes norte americanos, e encontraram associação de início mais precoce da DP com SNPs dos genes CYP2J2, GSTM5 e SLC11A2.

Também foi estudada a associação da II com genes já reconhecidos em formas familiares da DP. Sun *et al.* (2006) pesquisaram a associação da II da DP com a heterozigotidade para mutações no gene Parkina, que como previamente descrito é a principal causa de DP com transmissão recessiva e de início precoce, em pacientes de 183 famílias com histórico de DP familiar, e encontraram II mais precoce nos pacientes com homozigose para mutações na Parkina (36 anos, em média), mais tardia para aqueles que não tinham nenhuma mutação (61,3 anos, em média) e intermediária para os heterozigotos (49,6 anos, em média). Brockmann *et al.* (2013) investigaram a associação de 21 SNPs já previamente associados a maior risco de DP com a II da doença em 1.396 paciente com DP esporádica, e encontraram associação do SNP rs356219, no gene SNCA, com II mais precoce da DP.

De maneira semelhante à avaliação de genes e SNPs associados a maior risco de DP, também foram realizados estudos de associação genômica para investigar a II da doença. Nalls *et al.* (2015), em um destes estudos, fizeram um escore de risco genético, e identificaram uma associação pequena, porém consistente, de SNPs comuns e a II da DP. Escott-Price *et al.* (2015), da mesma forma, fizeram um escore de risco genético, e encontraram evidência da contribuição de múltiplos genes para o risco e para o início precoce da DP.

2.3 FGF20 e DP

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) fazem parte de uma família de fatores de crescimento composta por 22 membros estruturalmente relacionados, com mecanismos de ação endócrino, parácrino e autócrino, e diversas funções relacionadas ao desenvolvimento, metabólicas e neurais. Entre as funções de fatores de crescimento da família do FGF no sistema nervoso central estão a indução de diferenciação neural de células embrionárias e formação do tubo neural, diferenciação de células tronco neurais em neurônios dopaminérgicos, diferenciação das diversas estruturas do sistema nervoso central, desenvolvimento do neocórtex e da medula espinal. Ainda, parece haver relação desses fatores de crescimento com alterações patológicas do sistema nervoso central, como maior da expressão do FGF2 em casos de lesões isquêmicas e crises epilépticas, e indução de ataxia e discinesias em ratos com mutação no FGF14 (Dono, 2003; Itoh e Ohta, 2013).

Em 2000 houve a identificação do FGF20, e foi demonstrada maior expressão deste em células dopaminérgicas da substância nigra de ratos, na pars compacta. Ainda, foi demonstrado que o FGF20 está relacionado a maior sobrevivência de células dopaminérgicas *in vitro* (Ohmachi *et al.*, 2000). Mais recentemente, foi demonstrado que a infusão supranigral de FGF20 protege as vias nigroestriatais da toxicidade pela 6-hidroxi-dopamina em um modelo animal de DP, além de reduzir a ocorrência de sintomas parkinsonianos, sugerindo um potencial efeito neuroprotetor do FGF20 na DP (Sleeman *et al.*, 2012). Além das ações já descritas, o FGF20 parece ter um

papel na estrutura e função do hipocampo (Lemaitre *et al.*, 2010), desenvolvimento da cóclea (Hayashi *et al.*, 2008) e formação de células renais (Barak *et al.*, 2012).

Diante das evidências de que o FGF20 desempenha um papel na sobrevivência das células dopaminérgicas da substância nigra, diversos estudos investigaram a associação entre SNPs do FGF20 e DP, com dados conflitantes. Van Der Walt *et al.* (2004) descreveram associação de maior risco de DP à presença do alelo C no SNP rs1989754, alelo T no rs20399075 e do alelo C no SNP rs1721100, ao estudar pacientes de 644 famílias norte americanas. No ano seguinte, no entanto, outro estudo falhou ao tentar replicar tais achados em uma população de 279 pacientes portadores de DP esporádica e 321 controles, da Grécia e Finlândia. Neste estudo houve maior frequência do alelo G no SNP rs1989754 entre os portadores de DP, porém tal achado não foi significativo após ajuste para múltiplos testes (Clarimon *et al.*, 2005). Wang *et al.* (2008) realizaram um interessante trabalho mostrando maior risco de DP em portadores do alelo T do SNP rs12720208, ao estudar 1089 pacientes e 1165 controles de 729 famílias independentes. Ainda, foi sugerido que esse polimorfismo pode aumentar a expressão do FGF20, por alterar o sítio de ligação do microRNA-433, e em última análise aumentar a expressão da α -sinucleína. Posteriormente foi tentada a replicação de tais achados em quatro séries de casos-controles com pacientes norte-americanos e europeus, entretanto não foi encontrado maior risco de DP associado aos SNP rs12720208, e nem maior expressão de FGF20 ou α -sinucleína associadas a esse polimorfismo (Wider *et al.*, 2009). Da mesma forma, De Mena *et al.* (2010) também não mostraram maior risco de DP associado ao SNP rs12720208, ao estudar 512 pacientes 258 controles, da Espanha. Em 2011, um estudo de associação genômica identificou que o polimorfismo rs591323 do FGF20 estava associado a maior risco de DP (IPDGC e WTCCC2, 2011), achado que foi confirmado por Jing *et al.* (2015) ao estudar 313 pacientes e 318 controles chineses, com o genótipo GG desse SNP associado a maior risco de DP; e por Sun *et al.* (2017), que também encontraram maior risco em portadores do genótipo GG do SNP rs591323 ao estudar 1051 portadores de DP e 1169 controles chineses.

Também foram realizadas revisões da literatura e meta-análises sobre a associação de SNPs do FGF20 e risco de DP. Uma delas revisou cinco estudos

relacionados ao SNP rs1721100, e encontrou risco discretamente maior, com OR de 1,15, quando considerado um modelo recessivo, porém não encontrou diferenças quando considerado um modelo dominante (Zhu *et al.*, 2014). Outra revisou sete estudos que relacionavam o SNP rs12720208 com a DP, e encontrou maior risco em caucasianos, mas não em asiáticos, quando considerado um modelo dominante. Como no estudo anterior, o aumento do risco foi discreto, com OR de 1,15 (Wang *et al.*, 2017). Não há estudos correlacionando polimorfismos do FGF20 com a II da DP.

3. JUSTIFICATIVA

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, com maior risco quanto mais idosa for a população. Com o aumento da expectativa de vida que ocorreu nas últimas décadas e estimativa de envelhecimento populacional progressiva nos próximos anos, espera-se um aumento significativo tanto na incidência quanto na prevalência dessa doença na população, e o consequente aumento da morbimortalidade associada a ela. Uma vez que se trata de doença crônica, sem tratamento curativo até o momento, também haverá aumento dos custos pessoais e sociais associados ao tratamento da DP e de suas complicações.

O estudo e melhor entendimento dos fatores que se associam a maior risco ou que determinem diferenças na apresentação clínica da DP são importantes para o avanço no conhecimento da fisiopatologia da doença, e consequentemente para o estudo de novas modalidades de tratamento. A pesquisa de polimorfismos genéticos que possam modular a idade de início da DP, desta forma, pode contribuir tanto para o conhecimento da doença em si quanto para o desenvolvimento de novas terapias que possam modificar o curso natural da doença, no futuro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a associação do polimorfismo rs1989754 do FGF20 com a II da DP, em pacientes acompanhados no ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar a genotipagem do polimorfismo rs1989754 do FGF20 na população em estudo;
2. Avaliar a II da DP na população em estudo;
3. Avaliar a associação dos polimorfismos citados com a II da DP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAK, H. et al. FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man. **Developmental cell**, v. 22, n. 6, p. 1191-1207, 2012. ISSN 1534-5807.

BLOMQVIST, M. E.-L. et al. Sequence variation in the proximity of IDE may impact age at onset of both Parkinson disease and Alzheimer disease. **Neurogenetics**, v. 5, n. 2, p. 115-119, 2004. ISSN 1364-6745.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuropathological staging of brain pathology in sporadic Parkinson's disease: separating the wheat from the chaff. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, n. s1, p. S73-S87, 2017. ISSN 1877-7171.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003. ISSN 0197-4580.

BROCKMANN, K. et al. SNCA: major genetic modifier of age at onset of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 9, p. 1217-1221, 2013. ISSN 1531-8257.

CLARIMON, J. et al. Lack of evidence for a genetic association between FGF20 and Parkinson's disease in Finnish and Greek patients. **BMC neurology**, v. 5, n. 1, p. 11, 2005. ISSN 1471-2377.

DE MENA, L. et al. FGF20 rs12720208 SNP and microRNA-433 variation: no association with Parkinson's disease in Spanish patients. **Neuroscience letters**, v. 479, n. 1, p. 22-25, 2010. ISSN 0304-3940.

DELAMARRE, A.; MEISSNER, W. G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. **La Presse Médicale**, v. 46, n. 2, p. 175-181, 2017. ISSN 0755-4982.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2017 ISSN 1353-8020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.07.033>>. Acesso em: 2017/09/05.

DONO, R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 4, p. R867-R881, 2003. ISSN 0363-6119.

ESCOTT-PRICE, V. et al. Polygenic risk of Parkinson disease is correlated with disease age at onset. **Annals of neurology**, v. 77, n. 4, p. 582-591, 2015. ISSN 1531-8249.

FAHN, S. The 200-year journey of Parkinson disease: Reflecting on the past and looking towards the future. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2017. ISSN 1353-8020.

GHEBREMEDHIN, E. et al. Relationship of apolipoprotein E and age at onset to Parkinson disease neuropathology. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 65, n. 2, p. 116-123, 2006. ISSN 1554-6578.

HAYASHI, T.; RAY, C. A.; BERMINGHAM-MCDONOGH, O. Fgf20 is required for sensory epithelial specification in the developing cochlea. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 23, p. 5991-5999, 2008. ISSN 0270-6474.

HUGHES, A. J. et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 181-184, 1992. ISSN 0022-3050.

INTERNATIONAL PARKINSON'S DISEASE GENOMICS CONSORTIUM (IPDGC). Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. **The Lancet**, v. 377, n. 9766, p. 641-649, 2011. ISSN 0140-6736.

INTERNATIONAL PARKINSON'S DISEASE GENOMICS CONSORTIUM (IPDGC); WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM 2 (WTCC2). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. **PLoS genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002142, 2011. ISSN 1553-7404

ITOH, N.; OHTA, H. Roles of FGF20 in dopaminergic neurons and Parkinson's disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 6, 2013.

JING, C. et al. Screening of polymorphisms located in the FGF20 and TMEM175 genes in North Chinese Parkinson's disease patients. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 13679-13687, 2015.

KARAMOHAMED, S. et al. BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. **Neurology**, v. 65, n. 11, p. 1823-1825, 2005. ISSN 0028-3878.

KISS, L. S. E.; SOARES-DA-SILVA, P. Medicinal chemistry of catechol O-methyltransferase (COMT) inhibitors and their therapeutic utility. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 21, p. 8692-8717, 2014. ISSN 0022-2623.

KLEBE, S. et al. The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 84, n. 6, p. 666-673, 2013. ISSN 0022-3050.

LEMAITRE, H. et al. Genetic variation in FGF20 modulates hippocampal biology. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 17, p. 5992-5997, 2010. ISSN 0270-6474.

LI, Y.-J. et al. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 24, p. 3259-3267, 2003. ISSN 1460-2083.

LI, Y. et al. Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease. **Neurology**, v. 62, n. 11, p. 2005-2009, 2004. ISSN 0028-3878.

NALLS, M. A. et al. Genetic risk and age in Parkinson's disease: continuum not stratum. **Movement Disorders**, v. 30, n. 6, p. 850-854, 2015. ISSN 1531-8257.

NANDIPATI, S.; LITVAN, I. Environmental exposures and Parkinson's disease. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 9, p. 881, 2016.

NIELSEN, S. S. et al. Genotype and age at Parkinson disease diagnosis. **International journal of molecular epidemiology and genetics**, v. 4, n. 1, p. 61, 2013.

OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of neurochemistry**, 2016. ISSN 1471-4159.

OHMACHI, S. et al. Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c. **Journal of neuroscience research**, v. 72, n. 4, p. 436-443, 2003. ISSN 1097-4547.

OHMACHI, S. et al. FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 277, n. 2, p. 355-360, 2000. ISSN 0006-291X.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17013, 2017. ISSN 2056-676X.

REIDER, C. R. et al. Reliability of reported age at onset for Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 18, n. 3, p. 275-279, 2003. ISSN 1531-8257.

SCHAPIRA, A. H.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 2017. ISSN 1471-003X.

SLEEMAN, I. J.; BOSHOFF, E. L.; DUTY, S. Fibroblast growth factor-20 protects against dopamine neuron loss in vitro and provides functional protection in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1268-1277, 2012. ISSN 0028-3908.

SUN, M. et al. Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. **Archives of neurology**, v. 63, n. 6, p. 826-832, 2006. ISSN 0003-9942.

SUN, X.-Y. et al. Genetic analysis of FGF20 in Chinese patients with Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 5, p. 887-891, 2017. ISSN 1590-1874.

VAN DER WALT, J. M. et al. Fibroblast growth factor 20 polymorphisms and haplotypes strongly influence risk of Parkinson disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 6, p. 1121-1127, 2004. ISSN 0002-9297.

WANG, G. et al. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of α -synuclein. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 2, p. 283-289, 2008. ISSN 0002-9297.

WANG, X. et al. Quantitative assessment of the effect of FGF20 rs12720208 variant on the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. **Neurological Research**, v. 39, n. 4, p. 374-380, 2017. ISSN 0161-6412.

WIDER, C. et al. FGF20 and Parkinson's disease: No evidence of association or pathogenicity via α -synuclein expression. **Movement disorders**, v. 24, n. 3, p. 455-459, 2009. ISSN 1531-8257.

ZAREPARSI, S. et al. Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 107, n. 2, p. 156-161, 2002. ISSN 1096-8628.

ZHU, R. et al. Fibroblast growth factor 20 (FGF20) gene polymorphism and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 12, p. 1889-1894, 2014. ISSN 1590-1874.

6. ARTIGO

Fibroblast growth factor 20 (FGF20) rs1989754 polymorphism is strongly associated with Parkinson's disease age at onset: a cross-sectional study

Leonardo Cordenonzi Pedroso de Albuquerque^{1,2}, Márcio Schneider Medeiros¹,
Thais Lampert Monte², Carlos Roberto de Mello Rieder^{1,2}, Artur Francisco
Schumacher Schuh^{1,2}

1 Post-Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2 Neurology department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: Artur Francisco Schumacher Schuh MD, Ph.D., Neurology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2.350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

schuh.afs@gmail.com

Abstract

Parkinson's disease (PD) is related to loss of dopaminergic neurons in the ventrolateral substantia nigra. The physiopathology of the disease is poor understood, but both environmental and genetics risk factors are thought to play a role. FGF20 is a neurotrophic factor preferentially expressed in substantia nigra that enhances dopaminergic cells survival.

We genotyped the FGF20 rs1989754 single nucleotide polymorphism in 224 patients with idiopathic PD, and found an earlier age at onset of the disease in the carriers of the C allele in both dominant (56 ± 11.8 vs. 61.5 ± 11.6 years, $p=0.001$) and additive models (55 ± 10.9 years for CC genotype, 56.4 ± 11.2 years for CG genotype and 61.5 ± 11.6 years for GG genotype, $p=0.002$). The findings of the present study strongly suggest that FGF20 rs1989754 single nucleotide polymorphism is associated with younger age at onset of PD and that the age of onset of Parkinson's disease is modulated by common polymorphisms of multiple risk genes with low effect size.

Keywords: Parkinson's disease; age at onset; FGF20.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder, with an age-dependent incidence, and associated with loss of dopaminergic neurons in the ventrolateral substantia nigra. The physiopathology of the disease is not yet well understood, but both environmental and genetic risk factors are thought to play a role. Among genetic factors, several forms of monogenic PD are known [1, 2]. In the last few years, genome-wide association studies (GWAS) have identified several new loci of possible susceptibility genes [3, 4].

In the last two decades, there was a growing interest in genetic polymorphisms that, apart from increasing the risk of PD, can influence its phenotype. Several studies showed the influence of genetic polymorphisms in the age at onset (AAO) of PD. Among them, the Apolipoprotein E $\epsilon 3\epsilon 4$ and $\epsilon 4\epsilon 4$ genotypes [5, 6], as well single nucleotide polymorphisms (SNPs) in glutathione S-transferase, omega-1 (GSTO1) gene [7], insulin-degrading enzyme (IDE) gene [8], brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene [9] and catechol-O-methyl transferase (COMT) gene [10] were associated with the AAO of PD. Recently, GWAS supported the contribution of multiple common genetic alleles in earlier AAO of PD, each one with low effect size [11, 12].

Fibroblast growth factor 20 (FGF20) belongs to the FGF family of a group of polypeptides with several developmental and metabolic functions in the nervous system. They were first described by Ohmachi and colleagues in 2000 [13, 14]. FGF20, which is preferentially expressed in substantia nigra pars compacta of rats, protects dopaminergic neurons *in vitro* and *in vivo* [15]. The aim of the present study is to evaluate if rs1989754 FGF20 polymorphism might modulate PD expression, specifically the AAO.

Methods

Patients

A total of 224 outpatients with idiopathic PD of the Movement Disorders Clinics at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were evaluated from 2006 to

2014. The patients were diagnosed according to the UK Parkinson Disease Society Brain Bank criteria [16], and were excluded if they presented with atypical manifestations or secondary parkinsonism. The hospital Ethics Committee approved the study protocol, and all the participants provided a written informed consent to participate.

A structured interview was performed with patients and their relatives for collecting clinical and demographical data. The AAO of PD was defined as the age of onset of the motor cardinal symptoms, as reported by the patients and confirmed by their caregivers. The AAO information gathered through patient and family reports is a reliable method, as demonstrated by Reider, et al. [17].

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures. The FGF20 rs1989754 polymorphism was determined by allelic discrimination using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. Agreement of genotype frequencies to Hardy–Weinberg equilibrium was tested using a goodness of fit X^2 test.

Student's t test and ANOVA were used to evaluate the association of rs1989754 polymorphism and the AAO of PD, in both dominant and additive models, as adequate. The X^2 test was used to analyze gender distribution, Kruskal-Wallis test to analyze mean disease duration, UPDRS and Hoehn and Yahr in the sample and the Kolmogorov-Smirnov test to assess the distribution of the AAO of PD. All analyses were performed using the SPSS version 18 software and a significance level of 5% with two-tailed tests was used.

Results

Demographic data are presented in Table 1. Patients ages varied from 28 to 84 years, with a mean AAO of 58 years. The AAO has a normal distribution in the sample. About half of the sample was male.

Frequencies of rs1989754 genotypes are shown in Table 1, and are similar to the finds of Van Der Walt, et al. [18]. The genotype distribution did not deviate significantly from Hardy–Weinberg equilibrium. The gender distribution and mean disease duration, UPDRS and Hoehn and Yahr were similar in each rs1989754 genotype.

An expressive association of the rs1989754 SNP and the AAO of PD was found. The presence of the C allele was associated with an earlier AAO of PD in both dominant and additive models. In the former, the carriers of the C allele had a mean AAO of 56 ± 11.8 years, against 61.5 ± 11.6 years in the non-carriers of the C allele ($p=0.001$). When an additive model is considered, the carriers of the genotype CC had a mean AAO of 55 ± 10.9 years, those with the CG genotype had a mean AAO of 56.4 ± 11.2 years and the GG genotype carriers has a mean AAO of 61.5 ± 11.6 years ($p=0.002$, Table 1).

Discussion

In the present study, which evaluated the association of the FGF20 rs1989754 SNP with the AAO of PD, a significantly earlier onset was found in the carriers of the C allele of this polymorphism. Furthermore, the C allele was moderately frequent in our sample.

FGF20 belongs to a family of growth factors with significant roles in the central nervous system, and recent data suggest a role in the pathogenesis of PD. It is preferentially expressed in substantia nigra's dopaminergic cells and is related to enhanced survival of midbrain dopaminergic neurons *in vitro* [13]. Moreover, FGF20 promotes the differentiation of neural stem cells into dopaminergic neurons [14] and exerts protection against damage in the nigrostriatal tract models of PD [15]. There are seven primary FGF receptors (FGFR), and it was shown that FGF20 binds specifically to FGFR-1c, which is also expressed preferentially in midbrain dopaminergic neurons, further reinforcing a link between FGF20 and dopaminergic neurons of substantia nigra [19].

Van Der Walt, et al. [18] were the first to explore the association of FGF20 SNPs with the risk of PD, and found an association with SNPs on rs1989754 (C allele), 3' UTR ss20399075 (T allele) and 3'UTR rs1721100 (C allele) with greater risk of PD. Wang, et al. [20] replicate these findings with the rs1989754 SNP, in addition to describing a more significant risk of PD associated with the rs12720208 SNP. However, these findings were put in doubt as other studies failed to replicate them [21, 22, 23]. Meta-analyses found an elevated risk of PD associated with rs1721100 SNP in a recessive model [24] and with rs12720208 SNP in Caucasians [25], but up to this date there is no definition concerning the risk of PD associated with the rs1989754 SNP. The association of FGF20 polymorphisms with the AAO of PD, on the other hand, was not explored in the literature.

The present study has some limitations. First, the sample is of moderate size, and thus studies with larger samples would be desirable to confirm our findings. Anyway, we found an expressive statistical significance, and the probability that the earlier AAO of PD in C allele carriers had occurred by chance is low. Besides, as only one SNP was evaluated we cannot reject the hypothesis that another polymorphism in linkage disequilibrium with the rs1989754 SNP is the responsible for the earlier AAO of PD.

This is the first study to our knowledge that evaluated the association of the FGF20 rs1989754 SNP with the AAO of PD. Our findings of earlier AAO in the carriers of the C allele of this polymorphism support the hypothesis that the AAO of PD is modulated by common polymorphisms of multiple risk genes with low effect size, instead of exclusively by higher risk Mendelian mutations [11, 12]. A hypothesis to explain our findings is that the C allele of the rs1989754 SNP defines a higher susceptibility to midbrain's dopaminergic neurons to death, and so an earlier AAO and possibly an increased risk of PD. Anyway, more studies are necessary to both confirm our findings and to improve our understanding of which way FGF20 polymorphisms changes dopaminergic neurons physiology and pathology.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest relevant to the manuscript.

Funding

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

References

- [1] A. Delamarre, W.G. Meissner, Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease, *La Presse Médicale* 46 (2017) 175-181.
- [2] W. Poewe, K. Seppi, C.M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkmann, A.-E. Schrag, A.E. Lang, Parkinson disease, *Nature Reviews Disease Primers* 3 (2017) 17013.
- [3] International Parkinson Disease Genomics Consortium, Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies, *The Lancet* 377 (2011) 641-649.
- [4] International Parkinson Disease Genomics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease, *PLoS genetics* 7 (2011) e1002142.
- [5] S. Zarepari, R. Camicioli, G. Sexton, T. Bird, P. Swanson, J. Kaye, J. Nutt, H. Payami, Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes, *American Journal of Medical Genetics Part A* 107 (2002) 156-161.
- [6] Y. Li, M. Hauser, W. Scott, E. Martin, M. Booze, X. Qin, J. Walter, M. Nance, J. Hubble, W. Koller, Apolipoprotein E controls the risk and age at onset of Parkinson disease, *Neurology* 62 (2004) 2005-2009.
- [7] Y.-J. Li, S.A. Oliveira, P. Xu, E.R. Martin, J.E. Stenger, C.R. Scherzer, M.A. Hauser, W.K. Scott, G.W. Small, M.A. Nance, Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease, *Human molecular genetics* 12 (2003) 3259-3267.

- [8] M.E.-L. Blomqvist, P.A. Silburn, D.D. Buchanan, N. Andreasen, K. Blennow, N.L. Pedersen, A.J. Brookes, G.D. Mellick, J.A. Prince, Sequence variation in the proximity of IDE may impact age at onset of both Parkinson disease and Alzheimer disease, *Neurogenetics* 5 (2004) 115-119.
- [9] S. Karamohamed, J. Latourelle, B. Racette, J. Perlmutter, G. Wooten, M. Lew, C. Klein, H. Shill, L. Golbe, M. Mark, BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study, *Neurology* 65 (2005) 1823-1825.
- [10] S. Klebe, J.-L. Golmard, M.A. Nalls, M. Saad, A.B. Singleton, J.M. Bras, J. Hardy, J. Simon-Sanchez, P. Heutink, G. Kuhlenbäumer, The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84 (2013) 666-673.
- [11] V. Escott-Price, M.A. Nalls, H.R. Morris, S. Lubbe, A. Brice, T. Gasser, P. Heutink, N.W. Wood, J. Hardy, A.B. Singleton, Polygenic risk of Parkinson disease is correlated with disease age at onset, *Annals of neurology* 77 (2015) 582-591.
- [12] M.A. Nalls, V. Escott-Price, N.M. Williams, S. Lubbe, M.F. Keller, H.R. Morris, A.B. Singleton, Genetic risk and age in Parkinson's disease: continuum not stratum, *Movement Disorders* 30 (2015) 850-854.
- [13] S. Ohmachi, Y. Watanabe, T. Mikami, N. Kusu, T. Ibi, A. Akaike, N. Itoh, FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain, *Biochemical and biophysical research communications* 277 (2000) 355-360.
- [14] N. Itoh, H. Ohta, Roles of FGF20 in dopaminergic neurons and Parkinson's disease, *Frontiers in molecular neuroscience* 6 (2013).
- [15] I.J. Sleeman, E.L. Boshoff, S. Duty, Fibroblast growth factor-20 protects against dopamine neuron loss in vitro and provides functional protection in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease, *Neuropharmacology* 63 (2012) 1268-1277.

- [16] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 55 (1992) 181-184.
- [17] C.R. Reider, C.A. Halter, P.F. Castelluccio, D. Oakes, W.C. Nichols, T. Foroud, Reliability of reported age at onset for Parkinson's disease, *Movement disorders* 18 (2003) 275-279.
- [18] J.M. Van Der Walt, M.A. Nouredine, R. Kittappa, M.A. Hauser, W.K. Scott, R. McKay, F. Zhang, J.M. Stajich, K. Fujiwara, B.L. Scott, Fibroblast growth factor 20 polymorphisms and haplotypes strongly influence risk of Parkinson disease, *The American Journal of Human Genetics* 74 (2004) 1121-1127.
- [19] S. Ohmachi, T. Mikami, M. Konishi, A. Miyake, N. Itoh, Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c, *Journal of neuroscience research* 72 (2003) 436-443.
- [20] G. Wang, J.M. van der Walt, G. Mayhew, Y.-J. Li, S. Züchner, W.K. Scott, E.R. Martin, J.M. Vance, Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of α -synuclein, *The American Journal of Human Genetics* 82 (2008) 283-289.
- [21] J. Clarimon, G. Xiromerisiou, J. Eerola, V. Gourbali, O. Hellström, E. Dardiotis, T. Peuralinna, A. Papadimitriou, G.M. Hadjigeorgiou, P.J. Tienari, Lack of evidence for a genetic association between FGF20 and Parkinson's disease in Finnish and Greek patients, *BMC neurology* 5 (2005) 11.
- [22] C. Wider, J.C. Dachsel, A.I. Soto, M.G. Heckman, N.N. Diehl, M. Yue, S. Lincoln, J.O. Aasly, K. Haugarvoll, J.Q. Trojanowski, FGF20 and Parkinson's disease: No evidence of association or pathogenicity via α -synuclein expression, *Movement disorders* 24 (2009) 455-459.
- [23] L. de Mena, L.F. Cardo, E. Coto, A. Miar, M. Díaz, A.I. Corao, B. Alonso, R. Ribacoba, C. Salvador, M. Menéndez, FGF20 rs12720208 SNP and microRNA-433 variation: no association with Parkinson's disease in Spanish patients, *Neuroscience letters* 479 (2010) 22-25.

[24] R. Zhu, Y. Zhu, X. Liu, Z. He, Fibroblast growth factor 20 (FGF20) gene polymorphism and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis, *Neurological Sciences* 35 (2014) 1889-1894.

[25] X. Wang, X. Sun, X. Zhang, H. Li, A. Xie, Quantitative assessment of the effect of FGF20 rs12720208 variant on the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis, *Neurological Research* 39 (2017) 374-380.

Table 1: characteristics of subjects according to FGF20 rs1989754 genotype

		CC	CG	GG	p value
Count (%)	224 (100%)	35 (15.6)	106 (47.3)	83 (37.1)	
Male (number, %)	123 (51.9)	16 (45.7)	54 (50.9)	47 (60.0)	0.7662
AAO (mean, SD)	58 (11.5)	55 (10.9)	56.4 (11.2)	61.5 (11.6)	0.002*
Disease duration (mean, SD)	8.69 (5.06)	8.49 (4.20)	8.97 (5.23)	8.33 (5.30)	0.3549
UPDRS part I (mean, SD)	3.63 (2.65)	3.85 (2.02)	3.49 (2.68)	3.71 (2.89)	0.5097
UPDRS part II (mean, SD)	17.25 (8.54)	15.0 (6.97)	17.93 (8.83)	17.09 (8.69)	0.418
UPDRS part III (mean, SD)	34.41 (17.71)	34.88 (15.98)	32.81 (17.35)	36.59 (18.86)	0.2828
UPDRS part IV (mean, SD)	4.38 (3.38)	5.11 (3.57)	4.65 (3.46)	3.67 (3.10)	0.5137
HY (median, IQR)	2.5 (2-3)	2.5 (2-3)	2.0 (2-3)	2.5 (2-3)	0.1729

AAO: age at onset; HY: Hoehn and Yahr scale; IQR: interquartile range; SD: standard deviation; UPDRS: unified Parkinson's disease rating scale.

*ANOVA (see more in methods).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos realizados nas últimas duas décadas tem explorado fatores de risco genéticos relacionados à DP. Dentre os genes possivelmente implicados, o estudo de alterações genéticas do FGF20 é bastante atrativo, pelas múltiplas funções no desenvolvimento, manutenção e proteção de neurônios dopaminérgicos que apresenta. Algumas pesquisas tentaram determinar se polimorfismos do FGF20 se relacionam a aumento do risco de desenvolver DP, com resultados algo contraditórios. A associação de polimorfismos desse gene com características fenotípicas da DP, por outro lado, não foi explorada na literatura.

Os achados deste estudo sugerem fortemente que o SNP rs1989754 se correlaciona com a idade de início da DP. Levando em consideração os achados contraditórios da relação de DP e polimorfismos do FGF20, uma hipótese a ser levada em consideração é de que tais polimorfismos tenham maior importância de definir características fenotípicas da doença, como a idade de início, do que definir aumento do risco de desenvolver DP. Ainda, os achados do presente estudo corroboram a hipótese de que polimorfismos genéticos comuns na população se correlacionam e modulam o fenótipo da DP, e que além das formas mendelianas da doença já bem descritas, a DP pode ter também padrões genéticos complexos na população.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo da relação do FGF20 com a fisiologia dos neurônios dopaminérgicos e com a DP é atrativo. Os indícios de que o FGF20 é um fator de proteção para as células dopaminérgicas, *in vitro* e em modelos animais, o torna interessante como alvo de tratamentos que visem modificar a história natural da doença.

Antes disso, contudo, é necessário que haja maior compreensão da relação do FGF 20 com a DP. Mais estudos são necessários para determinar se e quais polimorfismos do FGF20 são de fato fatores de risco para a DP, e como eles podem modular o fenótipo da DP além da II da doença. Ainda, são necessários estudos que elucidem os mecanismos bioquímicos pelos quais o FGF20 promove o desenvolvimento e proteção das células dopaminérgicas da substância nigra.