

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**INFLUÊNCIA DE VARIANTES DO GENE DO FATOR NEUROTROFICO
DERIVADO DO CÉREBRO E DA APOLIPOPROTEÍNA E NO DÉFICIT
COGNITIVO DA DOENÇA DE PARKINSON**

VIVIAN ALTMANN

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre, janeiro de 2014

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

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) possui prevalência de 3,3% na população brasileira. Essa doença é caracterizada por sintomas motores característicos. Os pacientes com DP apresentam também sintomas não motores como o déficit cognitivo. Esse sintoma prejudica a qualidade de vida dos pacientes e pode progredir ao longo do tempo. O déficit cognitivo não possui uma neuropatologia bem compreendida. Vários estudos sugerem que a etiologia desse sintoma seja devida pelo menos em parte ao perfil genético do paciente.

No presente trabalho, foram analisados dois genes envolvidos com a neuroplasticidade sináptica, o *BDNF* e a *APOE* e sua possível associação com a ocorrência de déficit cognitivo na Doença de Parkinson.

O *BDNF* é relacionado à sobrevivência, diferenciação e manutenção dos neurônios, e também com a formação de memória. Um polimorfismo na região codificante (Val66Met) nesse gene está relacionado a uma menor secreção de proteína. A *APOE* interage com neurônios, promovendo sinaptogênese, crescimento axonal, reparo de nervos e na prevenção de morte neuronal. Essa lipoproteína possui três isoformas codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. O alelo $\epsilon 4$ foi previamente associado a demência na DP em alguns estudos.

Um total de 163 pacientes com DP idiopática foram diagnosticados e recrutados no ambulatório de Distúrbios do Movimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos foram genotipados para os polimorfismos dos genes *BDNF* e *APOE* por técnicas baseadas em PCR. A escala do *Mini Mental Test Examination* (MMSE) foi utilizada para definir a ocorrência de déficit cognitivo

Pacientes portadores do alelo 66Met do gene do BDNF apresentaram maior prevalência de déficit cognitivo ($p=0,006$; PR=1,52; IC=95% [1,12-2,05]). Em relação a APOE, não foi encontrada associação do alelo $\epsilon 4$ com déficit cognitivo na DP ($p=0,393$; PR=1,15; IC=95% [0,84-1,58]).

Esses resultados corroboram trabalhos anteriores que descrevem associações genéticas com déficit cognitivo na DP e sugerem que o BDNF possa ter um importante papel na patogênese do déficit cognitivo na doença de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) has a prevalence of 3.3% in the Brazilian population. This disease is characterized by motor symptoms. However patients with this disease also present non-motor symptoms as cognitive impairment. This symptom greatly affects functioning and patient's quality of life. The Cognitive impairment neuropathology is still not elucidated. Several studies suggested that its etiology is due, at least in part, to patient's genetic profile.

In the present study, two genes related to neuroplasticity were investigated, *BDNF* and *APOE*. *BDNF* is related to survival, differentiation and neuron maintenance, as well as memory formation. A coding polymorphism in this gene (Val66Met) is related to impaired secretion of the *BDNF* protein. *APOE* interacts with neurons, promoting synaptogenesis stimulation, axonal growth, nerve repair and prevent neuronal death. This protein has three isoforms coded by the $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ alleles. Allele $\epsilon 4$ was previously associated with dementia in Parkinson's disease in studies.

A total of 163 patients were diagnosed and recruited at the Movement Disorders clinics at "Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All individuals were genotyped for polymorphisms in *BDNF* and *APOE* by PCR based methods. Cognitive impairment diagnosis was based on the *Mini Mental Test Examination* (MMSE).

Carriers of *BDNF* 66Met allele presented a higher prevalence of cognitive impairment ($p=0.006$, PR=1.52, 95% CI [1.12-2.05]). However, no association was observed for $\epsilon 4$ carriers with cognitive impairment ($p=0.393$, PR=1.15, 95% CI [0.84-1.58]).

These results extend previously described genetic associations with cognitive impairment in PD and suggest that BDNF might play a role in the pathogenesis of cognitive impairment in Parkinson's disease.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho não posso deixar de agradecer às seguintes pessoas:

À Mara, pelos ensinamentos e pela orientação. Por ter me proporcionado essa oportunidade de trabalhar com ela, desde a iniciação científica. Por me aceitar como última aluna no doutorado.

Ao Carlos Rieder, pelas discussões sobre o trabalho, pela ajuda constante e pelos ensinamentos.

Ao Artur e a Mari, por estarem sempre a disposição para me ajudarem em tudo.

Às colegas de laboratório, Angélica, Deise, Estela, Eve, Gláucia, Ju, Lu Lima, Lu Tovo, Mari Botton, pela companhia diária, pelas risadas e jantinhas divertidas.

Aos professores do PPGBM, pela minha formação, pelo auxílio em assuntos científicos, pelas discussões em aula.

Ao Elmo, pela dedicação ao programa e pelo auxílio em tudo.

Aos meus amigos, pelas festas, conversas, noites, pela amizade e por acreditarem em mim.

À minha família, pelo carinho, por acreditarem em mim e por estarem sempre presentes.

Aos meus avós, por serem meus segundos pais, por me mimarem e me amarem muito.

À Cintia, por me fazer rir, chorar, brigar, fazer as pazes. Pelo dia-a-dia. Por estar sempre junto comigo em todos os momentos. Por me fazer sempre ver o lado bom das coisas. Pelo amor, cumplicidade e amizade imensuráveis.

Aos meus pais por tudo. Por sempre colocarem minha educação como prioridade, se esforçando o máximo para isso. Por ter me dado todas as oportunidades para alcançar meus objetivos. Por acreditar sempre em mim. Pelo amor, carinho e dedicação. Sou eternamente grata.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	10
CAPÍTULO I - <i>INTRODUÇÃO</i>	11
I.1. A doença de Parkinson	12
I.2.1. Sintomas motores	12
I.2.2. Sintomas não-motores	15
I.3. O Fator neurotrófico derivado do cérebro.....	17
I.4. A apolipoproteína E.....	20
CAPÍTULO II - <i>JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</i>	24
II.1. Justificativa	25
II.2. Objetivo geral	25
CAPÍTULO III - Role of APOE and BDNF variants in Parkinson's disease cognitive impairment.	26
CAPÍTULO IV - <i>DISCUSSÃO</i>	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

APOE - Apolipoproteína E

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

DP - Doença de Parkinson

DYRK1A - *tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*

GDNF - Fator neurotrófico derivado de células gliais

HDL - *High Density Lipoprotein*

LTP - *Long term potentiation*

MAPT - *Microtubule-associated protein tau*

MMSE - *Mini Mental Test Examination* (Mini exame do estado mental)

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NGF - *Nerve growth factor*

NT-3 - *Neurotrophin-3* (neurotrofina-3)

NT-4 - *Neurotrophin-4* (neurotrofina-4)

Pro-BDNF - *pro-brain-derived neurotrophic factor*

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

SNpc - *Substantia nigra pars compacta*

Trk - Tirosina quinase

TrkB - Tirosina quinase B

VLDL - *Very Low Density Lipoprotein*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente na espécie humana, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (Lang e Lozano, 1998). Cerca de 5 milhões de pessoas no mundo convivem com essa doença, com uma prevalência de 0-3% (de Lau e Breteler, 2006). Essa doença é progressiva e acomete cerca de 1% da população acima de 65 anos (Lang e Lozano, 1998). Sua incidência e prevalência aumentam com o aumento da idade, de 20/10.000 na população em geral para 120/10.000 aos 70 anos. A idade de início dos sintomas é em média aos 55 anos de idade (Dauer e Przedborski, 2003). No Brasil, um estudo de base populacional identificou uma prevalência de 3,3% para a doença de Parkinson entre maiores de 60 anos (Barbosa *et al.*, 2006). A etiologia dessa doença não é totalmente conhecida, mas cada vez mais evidências sugerem que a DP seja multifatorial, determinada por fatores de risco ambientais e genéticos (Dauer e Przedborski, 2003). Aproximadamente 5-10% dos casos de DP são de causa familiar com um padrão autossômico dominante (Olanow e Tatton, 1999). O restante dos casos são esporádicos.

I.2.1. Sintomas motores

A doença foi descrita inicialmente por James Parkinson, em 1817, e até hoje é somente diagnosticada clinicamente, caracterizando-se por sintomas motores de bradicinesia, tremor de repouso, instabilidade postural e rigidez muscular (Dauer e Przedborski, 2003). Essas alterações costumam ser assimétricas e apresentam caráter progressivo, com tempo de evolução de 10 anos ou mais (Hughes *et al.*, 1992).

A doença de Parkinson caracteriza-se pela destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Os núcleos dos neurônios dopaminérgicos se localizam na SNpc, e projetam suas aferências para o estriado: putamen e caudado. A diminuição desses neurônios dopaminérgicos determina uma despigmentação do SNpc, devido a falta da produção de neuromelanina, normalmente produzida por esses neurônios. A destruição dos neurônios dopaminérgicos, conseqüentemente leva à diminuição da concentração de dopamina, que está fortemente relacionada aos sintomas motores da doença. O principal obstáculo no desenvolvimento de drogas neuroprotetoras para esses neurônios dopaminérgicos é não saber ainda os eventos moleculares envolvidos que provocam a neurodegeneração no local. O foco desses estudos concentra-se em três tipos de disfunção celular: estresse oxidativo, defeito na respiração mitocondrial e agregação proteica anormal. Outra característica clássica da DP é o acúmulo de inclusões citoplasmáticas protéicas eosinofílicas chamadas de “Corpúsculos de Lewy”. Essas inclusões são formadas por material protéico de diversas origens, predominando a alfa-sinucleína. A agregação anormal de proteínas e o seu depósito é também visto em outras doenças neurodegenerativas, variando em relação a composição e a localização da proteína. O diagnóstico definitivo da doença só ocorre após o exame do cérebro *post-mortem*, onde será encontrada degeneração da *pars compacta* da substância negra e os Corpúsculos de Lewy. Além do envolvimento notório do sistema dopaminérgico na doença, sabe-se que em estágios mais avançados, a neurodegeneração e os Corpúsculos de Lewy também são encontrados em outros locais não tão

característicos como nos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e o colinérgico, e no córtex cerebelar (Dauer e Przedborski, 2003).

Várias evidências sugerem que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos se inicia 6-8 anos antes dos sintomas clínicos. O início dos sintomas é tão gradual que torna difícil diagnosticar o início da doença. No momento do diagnóstico, a patologia da doença de Parkinson já se encontra estabelecida e os pacientes apresentam 50-60% de perda neuronal e 70-80% de depleção dopaminérgica. Essa latência entre o início da patologia e o da manifestação clínica possivelmente se deve a uma redundância das vias dopaminérgicas e mecanismos de compensação que mantêm a função dos núcleos da base estável por vários anos (Schapira e Obeso, 2006).

O tratamento da DP é feito pela reposição farmacológica do neurotransmissor dopamina, a partir de seu precursor, a levodopa. A levodopa é a principal medicação para o controle dos sintomas motores. Ela passa a barreira hematoencefálica e é convertida a dopamina nos neurônios da *substantia nigra*. Os efeitos adversos agudos da levodopa são náusea, vômitos e hipotensão postural, devidos a sua conversão periférica para dopamina, através da enzima dopa-decarboxilase. Por essa razão, a levodopa é administrada juntamente com inibidores dessa enzima, que inibem a degradação periférica da droga e reduzem a intolerância gastrointestinal, permitindo assim, a entrada da levodopa em maior concentração no cérebro (Kostrzewa *et al.*, 2005). A absorção da levodopa dá-se por transporte ativo no intestino delgado, pela mesma rota dos aminoácidos neutros, como leucina, valina e fenilalanina. Por esse motivo, a ingestão concomitante de alimentos

ricos nessas substâncias compete pelo mesmo transportador e pode diminuir a absorção da levodopa (Nutt *et al.*, 1984).

No início do tratamento essa medicação se mostra extremamente eficaz, reduzindo os sintomas da doença. Entretanto, o uso continuado da levodopa pode provocar o surgimento de fenômenos indesejados, como a flutuação motora, a discinesia e a alucinação. Esses efeitos colaterais surgem em torno de metade dos pacientes após cinco anos de uso de medicação. Eles dificultam o manejo terapêutico e prejudicam a qualidade de vida dos pacientes. A ocorrência desses efeitos adversos é um desafio ao médico assistente, uma vez que este deverá lançar mão do uso de doses maiores de levodopa, de esquemas posológicos com doses fracionadas e, eventualmente, do uso de outras medicações (Ferraz, 1999).

I.2.2. Sintomas não-motores

Com a progressão da DP, outras complicações não-motoras podem ocorrer, entre elas, as alterações neuropsiquiátricas. Essas alterações compreendem: alterações cognitivas, alucinações, mania, ansiedade, crises de pânico e depressão. As complicações não-motoras normalmente não são responsivas ao tratamento com levodopa ou terapias dopaminérgicas (Goldman e Litvan, 2011).

Dentre as complicações não motoras, o déficit cognitivo está ganhando importância clínica, uma vez que o tratamento da doença é cada vez mais satisfatório e eficaz. O déficit cognitivo prejudica a qualidade de vida dos pacientes, tornando mais complicado o atendimento regular a neurologistas ou médicos em geral. Essa complicação pode ser grave, como a demência, ou

consistir de sintomas mais leves. O déficit cognitivo pode progredir ao longo do tempo.

A demência associada à DP é muito comum. Um estudo de coorte verificou que 83% dos pacientes com DP idiopática desenvolveram demência em 20 anos (Hely *et al.*, 2008). De acordo com Aarsland *et al.* (2003, 2005), pacientes com DP possuem seis vezes mais risco de desenvolver demência quando comparados com indivíduos normais. O tempo médio de início de desenvolvimento desse sintoma é de 10 anos, porém, muitos pacientes o apresentam logo após o início da doença (Ezquerria *et al.*, 2008). O déficit cognitivo é considerado preditor do desenvolvimento da demência. Portanto, diagnóstico de déficit cognitivo tem sido o foco de um grande número de investigações para caracterizar a sua freqüência, fenótipo clínico e identificação de biomarcadores.

A neuropatologia do déficit cognitivo na DP não é bem compreendida até o momento. Alguns estudos sugeriram que a patologia difusa subcortical dos Corpúsculos de Lewy possa ser responsável por esse sintoma. Outras investigações demonstraram que os pacientes com déficit cognitivo possuem menor concentração de neurotransmissores como acetilcolina, dopamina e norepinefrina. Além disso, um dano nos circuitos neurais cortico-estriatais parece contribuir para as alterações cognitivas na DP. Déficit cognitivo foi também associado a uma neurodegeneração difusa da substância branca e cinzenta do cérebro (Weintraub e Burn, 2011). A patologia da doença de Alzheimer as vezes também se mostra presente na autopsia de pacientes com DP e déficit cognitivo (Jellinger *et al.*, 2002).

A apresentação dos sintomas é bem heterogênea em termos de domínios afetados, o paciente pode apresentar um ou mais domínios da cognição afetados. Essas diferenças podem estar refletindo a grande variação encontrada na sua patofisiologia (Barone *et al.*, 2011). Além disso, há muita diferença na definição de déficit cognitivo, na população de estudo e nos testes neuropsicológicos utilizados. A definição e escalas utilizadas para avaliar esse sintoma trazem problemas na interpretação das pesquisas (Goldman e Litvan, 2011). Devido a isso, a frequência do déficit cognitivo muda muito entre as populações e as metodologias (Barone *et al.*, 2011).

O déficit cognitivo também ocorre com avanço da idade e está associado a outras patologias como a doença de Alzheimer, Diabetes tipo 2, doenças cerebrovasculares e outras doenças inflamatórias (De Jager *et al.*, 2012). Como a expectativa de vida da população vem aumentando, o aumento da prevalência de déficit cognitivo também tem se elevado. Ainda não se tem um entendimento da base molecular do déficit cognitivo e da demência no processo de envelhecimento. Porém sabe-se que a idade é o maior fator de risco para o declínio na cognição (Bishop *et al.*, 2010).

I.3. O Fator neurotrófico derivado do cérebro

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi descoberto em 1982 (Barde *et al.*, 1982). Ele pertence a família das neurotrofinas, juntamente com o fator de crescimento neuronal (NGF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4). Essa família consiste de várias proteínas relacionadas estruturalmente e funcionalmente e possuem papel na diferenciação e sobrevivência de neurônios (Knusel *et al.*, 1991). As neurotrofinas, ao serem inicialmente

sintetizadas, são chamadas de pro-neurotrofinas e se ligam preferencialmente a receptores transmembrana p75^{NTR}. Uma vez passando pelo processo de clivagem, as pro-neurotrofinas são chamadas de neurotrofinas maduras, que se ligam aos receptores da família tirosina quinase (Trk) (Lu *et al.*, 2005). A pro-neurotrofina do BDNF (Pro-BDNF) tem efeito biológico diferente da proteína do BDNF maduro. A Pro-BDNF, ao se ligar ao receptor transmembrana p75^{NTR}, desencadeia vias de sinalização de apoptose (Roux e Barker, 2002; Greenberg *et al.*, 2009).

Em contrapartida, a proteína madura do BDNF interage com uma proteína de membrana tirosina quinase B (TrkB), ativando uma cascata de sinalização, que promove a sobrevivência, diferenciação e manutenção dos neurônios, inclusive os neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* (Altar *et al.*, 1992; Murer *et al.*, 2001; Baydyuk *et al.*, 2011). O BDNF é reconhecido pela função de modular a transmissão sináptica, regulando a sinaptogênese e a plasticidade sináptica (Foltynie *et al.*, 2009; Waterhouse e Xu, 2009). Além disso, é considerado indutor da formação de *long-term potentiation* (LTP), envolvido na formação de memória (Park e Poo, 2013).

A via de sinalização do BDNF é considerada crítica para o desenvolvimento de diversas doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Pruunsild *et al.*, 2007). Dentre essas doenças, encontram-se a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Lu *et al.*, 2013). Um estudo *in vivo* mostrou que camundongos com 18 meses possuíam menor expressão do RNAm do BDNF, menores níveis de sua proteína e de seus fatores de transcrição em várias partes do cérebro, comparado a camundongos de três e

doze meses. Assim, a expressão dessa neurotrofina parece estar associada com a idade do indivíduo (Calabrese *et al.*, 2013).

Em um estudo em ratos tratados com MPTP, que é uma neurotoxina que causa sintomas da doença de Parkinson em modelos animais, destruindo neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*, se verificou uma maior proteção de neurônios dopaminérgicos em resposta a neurotoxina, quando em contato com fibroblastos que produziam BDNF em relação ao controle (Levivier *et al.*, 1995). O mesmo se verificou em neurônios de macacos modelo para DP (Tsukahara *et al.*, 1995). Esses achados sugerem que o BDNF poderia ser um bom alvo para o desenvolvimento de um novo medicamento para DP. Além disso, estudos *post-mortem* mostram uma reduzida expressão da proteína do BDNF e de seu RNAm na *substantia nigra* de pacientes com DP em relação a indivíduos não portadores da doença, sugerindo uma relação do BDNF com a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (Mogi *et al.*, 1999; Parain *et al.*, 1999).

Segundo Murer *et al.*, (2001) a possibilidade que a reduzida expressão de BDNF na doença de Parkinson seja uma consequência de uma terapia crônica com levodopa não é descartada, mas também não é confirmada. A levodopa, por outro lado, foi relacionada com um maior aumento da expressão de RNAm no estriado de ratos em outros estudos (Okazawa *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2006).

O gene do BDNF possui aproximadamente 70kb, consiste de 11 éxons, e está localizado no cromossomo 11p14 (Pruunsild *et al.*, 2007). O BDNF é altamente expresso no sistema nervoso central (Murer *et al.*, 2001). Sua

secreção é feita tanto de maneira constitutiva quanto atividade-dependente (Allen *et al.*, 2013).

Um polimorfismo (G196A) na região codificadora do gene do BDNF, determina a substituição uma valina (Val) por uma metionina (Met) no códon 66 da proteína. Esse polimorfismo Val66Met (rs6265) foi previamente associado à secreção atividade-dependente e ao transporte intracelular e extracelular da proteína (Egan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). O alelo Met parece estar relacionado a uma menor distribuição da variante nos dendritos neurais e uma menor secreção de sua proteína (Egan *et al.*, 2003).

O BDNF Val66Met tem sido o foco de vários estudos de associação com funções cognitivas de diversas doenças neuropsiquiátricas. Esse polimorfismo já foi associado a uma memória episódica comprometida, transtornos de humor e esquizofrenia (Nagahara e Tuszynski, 2011).

Poucos estudos investigaram a influência do polimorfismo Val66Met (rs6265) na doença de Parkinson. Embora esse polimorfismo não esteja associado com a patogênese dessa doença (Hadjigeorgiou e Zintzaras, 2005), sabe-se que essa variante foi relacionada com déficit cognitivo em amostra de pacientes italianos com doença de Parkinson (Guerini *et al.*, 2009) e com a habilidade cognitiva de planejamento da função motora nesses indivíduos (Foltynie *et al.*, 2005).

I.4. A apolipoproteína E

A apolipoproteína E (APOE) é uma glicoproteína extracelular de 34 kDa, formada por 299 aminoácidos. Ela é altamente expressa no fígado e no cérebro (Pulkes *et al.*, 2011). Sua função mais conhecida é de homeostase lipídica. Ela

se associa a lipídeos no organismo formando lipoproteínas. Essas proteínas são responsáveis pelo transporte de lipídeos no plasma. A APOE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de quilomícrons (Mahley, 1988). Essas lipoproteínas têm função de redistribuição de lipídeos entre diferentes órgãos, redistribuição de lipídeos entre células no mesmo tecido ou órgão, e funções relacionadas ao desenvolvimento, remodelamento e regeneração do sistema nervoso central (Mahley, 1988; Masliah *et al.*, 1995). A APOE é essencialmente sintetizada e secretada por astrócitos e macrófagos. Após a secreção, essa proteína fica localizada nas junções sinápticas e é captada por neurônios. Vários estudos mostraram que a APOE mantém a integridade da junção sináptica a partir de quatro mecanismos: estabilização do citoesqueleto neuronal, transporte de colesterol para neurônios em processo de reinervação, regulação da interação entre neurônios e sua matriz extracelular e regulação dos níveis de cálcio no neurônio (Masliah *et al.*, 1996).

O gene da APOE está localizado no cromossomo 19q13. Sua proteína possui três isoformas, a APOE2, APOE3 e APOE4 codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ respectivamente. Diferenças nos códonos 112 (rs429358) e 158 (rs7412) da sua sequência de aminoácidos, determinadas pela troca de uma timina por uma citosina, geram a troca de aminoácidos arginina (Arg) por uma cisteína (Cys). Essa troca é a base para a formação dos três alelos $\epsilon 2$ (Cys112, Cys158), $\epsilon 3$ (Cys112, Arg158) e $\epsilon 4$ (Arg112, Arg158) (de-Andrade *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2010). Dentre os alelos, o alelo $\epsilon 3$ é o mais freqüente na população brasileira (de-Andrade *et al.*, 2000) assim como em todas populações do mundo, até hoje descritas (Corbo e Scacchi, 1999).

A comparação das estruturas moleculares das isoformas da APOE ainda não foi descrita. Isso porque, a proteína do alelo $\epsilon 4$ se agrega facilmente, até em baixas concentrações, não permitindo a análise de sua estrutura. Porém, a estrutura do alelo $\epsilon 3$ foi obtida em 2011 pela técnica de NMR (Chen *et al.*, 2011). Foi observado que o códon 112, o único que difere entre a APOE3 e a APOE4, se encontra numa região próxima a C-terminal da proteína, o que parece resultar em mudanças estruturais no seu domínio C-terminal (Frieden e Garai, 2013).

As isoformas da APOE já foram associadas como fator de risco para doenças cardiovasculares, esquizofrenia, esclerose múltipla, além de influenciar os níveis séricos de lipídeos. O alelo $\epsilon 4$ é um alelo de risco para a doença de Alzheimer esporádica e familiar. Esse alelo está associado a uma menor idade de início da doença. Atualmente, a APOE é considerada um gene de susceptibilidade para essa patologia (Huang e Mucke, 2012).

Em estudos caso-controle que avaliam a susceptibilidade desse gene a doença de Parkinson, Kurz *et al.*, (2009) descreveram a associação do genótipo homozigoto para o alelo $\epsilon 4$ com a doença. Porém muitas investigações não observaram essa associação (Ezquerria *et al.*, 2008; Williams-Gray *et al.*, 2009; Pulkes *et al.*, 2011).

A doença de Alzheimer assim como a doença de Parkinson apresenta declínio cognitivo, além de bases clínicas e neuroquímicas similares. Em razão da semelhança dessas duas doenças neurodegenerativas a relação do alelo $\epsilon 4$ com o declínio cognitivo da DP foi investigada (Huang *et al.*, 2006). Evidências sobre o papel desse polimorfismo no declínio cognitivo na DP até o momento se mostram controversas. A associação do alelo $\epsilon 4$ com a demência na DP foi

encontrada em alguns estudos (Pankratz *et al.*, 2006; Papapetropoulos *et al.*, 2007), assim como um desenvolvimento mais rápido de demência nos pacientes portadores desse alelo (Morley *et al.*, 2012). No entanto muitos estudos não mostraram essa associação temporal (Kurz *et al.*, 2009; Williams-Gray *et al.*, 2009). Uma meta-análise revelou associação do alelo $\epsilon 4$ em pacientes com doença de Parkinson que apresentam demência com um *odds ratio* de 1,74 (Williams-Gray *et al.*, 2009). No entanto, as populações estudadas até o momento são pequenas e diferem muito quanto aos seus resultados.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

II.1. Justificativa

A doença de Parkinson exerce um grande impacto nos pacientes e na sociedade. Devido a sua alta prevalência e ao maior envelhecimento da população, ela tende a atingir maior importância médica. O déficit cognitivo nos pacientes com essa doença é muito prevalente e tão importante quanto os sintomas motores.

Estudos sugerem que a etiologia desse sintoma seja devida pelo menos em parte ao perfil genético do paciente. Conseqüentemente a identificação de genes envolvidos na ocorrência do déficit cognitivo na DP adquire um papel fundamental para que se possa estabelecer estratégias de prevenção e tratamento desse sintoma.

O gene da APOE e do BDNF estão ligados à neuroplasticidade sináptica e são importantes alvos de estudos de cognição em diversas doenças bem como no processo normal de envelhecimento. No entanto, a influência dos mesmos no déficit cognitivo da doença de Parkinson ainda foi pouco explorada sendo portanto o objetivo desse estudo.

II.2. Objetivo geral

Verificar se o polimorfismo no gene BDNF, o Val66Met e as isoformas da APOE estão associados ao déficit cognitivo nos pacientes com a doença de Parkinson.

CAPÍTULO III

Role of APOE and BDNF variants in Parkinson's disease cognitive impairment.

Manuscrito em preparação

Role of APOE and BDNF variants in Parkinson's disease cognitive impairment.

Vivian Altmann¹, Artur F Schumacher-Schuh^{1,2}, Mariana Rieck¹, Sidia M Callegari-Jacques³, Carlos R M Rieder², Mara H Hutz^{1,*}.

¹Departamento de Genetica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Servico de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

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

Keywords: Parkinson's disease, APOE, BDNF, cognitive impairment

Short title: APOE and BDNF in Parkinson's disease.

***Correspondence to:**

Mara H. Hutz

Departamento de Genetica, Instituto
de Biociencias, UFRGS.

Caixa postal 15053

Porto Alegre, RS,. 91501-970

Brazil.

Phone: +55 51 3308 6720

Fax: +55 51 3308 7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Abstract

Background: The role of genetic factors in cognitive impairment associated with Parkinson's disease (PD) is unclear. In this study, two variants in genes involved with neuroplasticity were investigated. We examined whether BDNF Val66Met or APOE variants APOE*E2, APOE*E3 and APOE*E4 were associated with impaired cognition in Parkinson's disease.

Methods: One hundred and sixty three patients with a clinical diagnosis of Parkinson's disease were investigated. The global cognitive abilities of the patients were measured by the Mini-Mental State Examination (MMSE). Poisson Regression models were used to test for associations between genotypes and cognitive impairment controlling for covariates.

Results: Carriers of at least one BDNF Met allele presented a higher prevalence of cognitive impairment ($p=0.006$ PR=1.52 CI=95% [1.12-2.05]). Non-significant results were observed for APOE isoforms.

Conclusions: BDNF 66Met allele was associated with cognitive impairment in a sample of PD patients, whereas no effect of APOE alleles was observed. These results extend previously described genetic associations with cognitive impairment in PD.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) affects 1% to 3% of people older than 65 years [1] and is characterized by motor and non-motor symptoms. Cognitive impairment is an important non-motor aspect of PD, and greatly affects functioning and quality of life [2] with up to 80% of patients developing dementia in the course of disease [3].

The pathophysiology of PD-related cognitive impairment and dementia is still unknown. It is believed that environmental and genetic factors contribute for the development of this symptom [4]. Among environmental factors, aging seems to be an essential contributor to cognition performances [5]. The role of dopaminergic deficiency as the main factor in cognitive dysfunction remains controversial whereas genes involved in neuroplasticity have been receiving more attention in cognitive function and present interesting findings.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein involved in neuroplasticity. It promotes survival, differentiation and maintenance of neuronal cells. BDNF appears to be a mediator in long-term potentiation (LTP), which is involved with memory formation in the hippocampus [6]. A functional polymorphism, Val66Met, seems to impair secretion of its protein in hippocampal mice cells [7]. Val66Met has already been linked to smaller volumes of multiple brain regions and impaired episodic memory function [6]. Although BDNF is not associated with PD susceptibility [8] it has been associated with cognitive impairment [9] and planning function in PD [10].

Apolipoprotein E (APOE) is an extracellular glycoprotein of 299 amino acids that is highly expressed in the liver and brain. Its functions include the transport of lipoproteins, fat-soluble vitamins and cholesterol [11,10]. APOE interacts with neurons, promoting synaptogenesis stimulation, axonal growth,

nerve repair and preventing neuronal death [12,11]. APOE has three common alleles: APOE*E2, APOE*E3 and APOE*E4. Inheritance of one or two copies of APOE*E4 was associated with increased risk and an earlier age at onset of late Alzheimer's disease. Carrying at least one APOE*E4 allele was also associated with more rapid cognitive decline in PD, supporting the idea of a component of shared etiology between PD dementia and Alzheimer's disease [13,14].

In the present study, our aim was to determine if APOE and BDNF genotypes are associated with cognitive performance in PD, as measured by the Mini-Mental State Examination (MMSE) [15].

2. Materials and Methods

2.1 Study Subjects

A total of 163 idiopathic PD patients with age at onset of motor symptoms after 45 years were included. Diagnostic processes and clinical evaluation were described elsewhere [16,17]. Briefly, patients were diagnosed and recruited at the Movement Disorders clinics at "Hospital de Clínicas de Porto Alegre" in Brazil. Diagnosis was based on UK Parkinson Disease Society Brain Bank criteria [18]. Patients with atypical manifestations or secondary parkinsonisms or with monogenic forms of the disease were excluded. Patients and their caregivers underwent a structured interview for collecting clinical and demographic data. Information was also obtained from medical records. A trained physician applied the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), Hoehn & Yahr and the Mini-Mental State Examination (MMSE) for global cognitive abilities. The hospital Ethics Committee approved the study and all participants gave written informed consent.

2.2 Genotyping

Peripheral blood samples were collected from all patients. DNA was extracted by standard procedures. The BDNF polymorphism (rs6265) was genotyped as previously described [19]. APOE was genotyped using TaqMan SNP Genotyping Assays by demand (Real Time PCR, Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, CA, USA).

2.3 Statistical analyses

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

The MMSE scale was analyzed as a continuous variable by Mann-Whitney and /or Kruskal-Wallis test because this scale does not have a normal distribution. Cognitive impairment was determined by cut-off scores validated in Brazil, according to educational level [20]. These cut-off scores were: 20 (illiterates); 25 (1- 4 years of schooling); 26 (5- 8 years of schooling); 28 (9-11 years of schooling) and 29 (12 or more).

APOE genotypes were grouped as: APOE*E2 carriers, APOE*E3/APOE*E3, and APOE*E4 carriers. Patients with APOE*E2/APOE*E4 ($n=3$) genotype were not included in the analyses because we choose not to assign these patients to either group. BDNF Met carriers were compared to Val/Val homozygotes. Clinical and demographic data between genotypes were assessed using Chi-square for categorical variables and Mann-Whitney, and

Kruskal-Wallis for continuous variables. Non-parametric bivariate correlations were performed using Spearman's correlation coefficient. Multiple Poisson regression with robust variance estimators was used to assess the effect of polymorphisms on risk of cognitive impairment. MMSE was the dependent variable and age, gender, disease duration and European ancestry were included as confounders. Statistical significance was defined as a two-tailed P -value < 0.05 .

3. Results

BDNF Val66Met and APOE genotype and allele frequencies are shown in Table 1. The genotype distributions of both polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Based on MMSE cut-offs about 49% of the patients presented cognitive impairment. Table 2 shows demographic and clinical variables by cognitive impairment. Patients with cognitive impairment had higher disease severity (as measured by H&Y). Cognitive impairment is somewhat more frequent in patients with African ancestry (66.7%) than in subjects with European ancestry (46.4%). The mean age between those with and without cognitive impairment did not differ but a high correlation between age and MMSE score ($r_s = -0.181$; $p = 0.02$) was observed. Overall mean MMSE was 24.6 ± 3.9 . BDNF Met carriers presented mean lower MMSE scores (~ 1.8 points) compared to Val/Val homozygous subjects ($p = 0.005$). No associations were observed for APOE genotypes (Table 3).

Multiple Poisson regression analyses were performed to estimate the effect of BDNF and APOE polymorphisms on cognitive impairment, after controlling for age, gender, European ancestry and disease duration (Table 4).

The BDNF Val66Met Met allele was associated with cognitive impairment in PD (PR 1.52, 95% CI 1.12-2.05, $p=0.006$). No association was observed for APOE*E4 carriers or other genotypes with cognitive impairment (PR=1.15, 95% CI 0.84-1.58, $p=0.393$).

4. Discussion

In the present study, cognitive impairment was observed with a prevalence of 49% among PD patients. The major finding reported herein was the association of the BDNF Val66Met polymorphism with cognitive impairment. BDNF Met carriers showed a higher frequency of cognitive impairment than Val/Val homozygotes. This finding is supported by the evidence that this variant seems to modulate, in an activity-dependent manner, BDNF secretion [7]. Carriers of Met allele leads to decreased neuronal dendrites distribution and decreased targeting to secretory granules, lowering the extracellular BDNF levels [21].

Epidemiological studies disclosed that higher age, severity of motor symptoms, older age at onset, higher disease duration and male gender were likely to be risk factors of PD cognitive dysfunction [2,22]. In the present study only disease severity was associated with cognitive impairment.

Guerini et al. reported an association of the Met homozygous and cognitive impairment in PD [9] whereas Laing et al. [23] observed that BDNF Val66Met was not associated with cognitive impairment in normal ageing. In the present study we showed that the presence of just one Met allele would affect cognition. This finding is supported by a study that demonstrates that Val/Met heterozygous form protein heterodimers that affect the protein trafficking fate [24]. Another investigation observed that Met carriers performed better at the

test of Tower of London which measures the ability of planning. According to that study, the greater secretion of BDNF in Val/Val individuals may affect working memory. BDNF synthesized by dopaminergic neurons seems to increase receptor D3 expression [25], which inhibits working memory [10]. Notice, however that MMSE tool does not evaluate working memory, therefore these results are not strictly comparable with those presented herein.

No association with cognition performance in PD was observed with APOE variants in the present study. The frequency of APOE*4 allele observed in PD patients (13%) was similar to that previously described for the southern Brazilian population (11.5%) whereas Alzheimer's disease patients from the same population showed a significantly higher frequency (39%) [26]. Since the last meta-analysis reported by Williams-gray et al., which described an association of APOE*4 allele and dementia in PD [14], four more studies have been published. Three of these studies did not observe an association between APOE and dementia [27-29], whereas one presented positive results [13]. This positive investigation was a longitudinal study and it demonstrated a faster cognitive decline in APOE*4 carriers [13]. These conflicting findings among studies might be due to the use of different scales to assess cognitive impairment, small samples of PD with dementia and odds ratios heterogeneity [14]. Overlap of neurodegenerative diseases such as AD and PD might also contribute to bias the association.

APOE functions have been widely studied. APOE*4 isoform seems to accumulate and aggregate more beta-amyloid (A β) protein than other isoforms, creating A β loads that are the hallmark of Alzheimer's disease pathology. APOE*2 and APOE*3 isoforms form dimers that contribute to regulation of A β

loads [12]. Whereas, Parkinson's disease dementia is linked to other kind of protein overloads [4,30], it therefore appears to have a different biologic basis from AD. APOE isoforms seems not to be determinant to the development of impaired cognition in PD.

The present results must be interpreted in the context of some limitations. The association observed might be attributed to other events such as age and ethnicity, but our results remained significant even after correcting for important factors such as age, education, ancestry, and disease duration, suggesting that this variant is independently associated with cognitive impairment in PD.

Our findings cannot definitively establish whether the association we observed between BDNF and cognitive decline is specific to PD or simply the effect of BDNF genotype on cognitive function that may be observed in otherwise healthy older individuals, therefore larger prospective studies with PD patients and healthy individuals are warranted to disclose the role of this important gene on cognitive impairment in PD.

Conflict of interests: The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 2003; 348:1356-64.
- [2] Williams-Gray CH, Foltynie T, Brayne CEG, Robbins TW, Barker RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain* 2007; 130:1787-98.
- [3] Hely MA, Reid WGJ, Adena MA, Halliday GM, Morris JGL. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord* 2008; 23:837-44.
- [4] Aarsland D, Beyerb MK, Kurz MW. Dementia in Parkinson's disease. *Current Opinion Neurology* 2008; 21(676-82).
- [5] Kempster PA, O'Sullivan SS, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain* 2010; 133:1755-62.
- [6] Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14:7-23.
- [7] Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112:257-69.
- [8] Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. The role of G196A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene in the cause of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2005; 50:560-6.
- [9] Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G, Zangaglia R, Pianezzola C, Bono G, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment

in Italian patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 2009; 16:1240-5.

- [10] Foltynie T, Lewis SGJ, Goldberg TE, Blackwell AD, Kolachana BS, Weinberger DR, et al. The BDNF Val(66)Met polymorphism has a gender specific influence on planning ability in Parkinson's disease. *J Neurol* 2005; 252:833-8.
- [11] Pulkes T, Papsing C, Mahasirimongkol S, Busabaratana M, Kulkantrakorn K, Tiamkao S. Association between apolipoprotein E genotypes and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 2011; 18:1333-5.
- [12] Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 2012; 5:746-55.
- [13] Morley JF, Xie SX, Hurtig HI, Stern MB, Colcher A, Horn S, et al. Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27:512-8.
- [14] Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, Foltynie T, Compston DAS, Sawcer SJ, et al. Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's Disease. *J Neurol* 2009; 256:493-8.
- [15] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research* 1975; 12:189-98.
- [16] Rieck M, Schumacher-Schuh AF, Altmann V, Francisconi CLM, Fagundes PTB, Monte TL, et al. DRD2 haplotype is associated with dyskinesia induced by levodopa therapy in Parkinson's disease patients. *Pharmacogenomics* 2012; 13:1701-10.

- [17] Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, Monte TL, Callegari-Jacques SM, Rieder CRM, et al. Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; 16:1251-8.
- [18] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical-diagnosis of idiopathic Parkinson's-disease - A clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:181-4.
- [19] Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: Evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 2002; 71:651-5.
- [20] Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2003; 61:777-81.
- [21] Teh CA, Lee TS, Kuchibhatla M, Ashley-Koch A, MacFall J, Krishnan R, et al. Bipolar Disorder, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Val66Met Polymorphism and Brain Morphology. *PLoS One* 2012; 7.
- [22] Hughes TA, Ross HF, Musa S, Bhattacharjee S, Nathan RN, Mindham RH, et al. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54:1596-602.
- [23] Laing KR, Mitchell D, Wersching H, Czira ME, Berger K, Baune BT. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene: a gender-specific role in cognitive function during normal cognitive aging of the MEMO-Study? *Age* 2012; 34:1011-22.

- [24] Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* 2004; 24:4401-11.
- [25] Guillin O, Griffon N, Bezard E, Leriche L, Diaz J, Gross C, et al. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 2003; 480:89-95.
- [26] de-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33:529-37.
- [27] Ezquerro M, Campdelacreu J, Gaig C, Compta Y, Munoz E, Marti MJ, et al. Lack of association of APOE and tau polymorphisms with dementia in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2008; 448:20-3.
- [28] Kurz MW, Dekomien G, Nilsen OB, Larsen JP, Aarsland D, Alves G. APOE Alleles in Parkinson Disease and Their Relationship to Cognitive Decline: A Population-based, Longitudinal Study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2009; 22:166-70.
- [29] Ryu HG, Kwon OD. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is not associated with age at onset or MMSE of Parkinson's disease in a Korean study. *Parkinsonism & Related Disorders* 2010; 16:615-7.
- [30] Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP, Ballard C. Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: A prospective, community-based study. *Ann Neurol* 2005; 58:773-6.

Table 1

Genotype and allele frequencies.

	Genotypes	Frequency	Alleles	Frequency
APOE	APOE*2/APOE*2	0.007	APOE*2	0.07
	APOE*2/APOE*3	0.117	APOE*3	0.80
	APOE*3/APOE*3	0.630	APOE*4	0.13
	APOE*2/APOE*4	0.012		
	APOE*3/APOE*4	0.222		
	APOE*4/APOE*4	0.012		
BDNF	Met/Met	0.04	Met	0.18
	Val/Met	0.27	Val	0.82
	Val/Val	0.69		

Abbreviations: APOE = Apolipoprotein E, BDNF = Brain-derived neurotrophic factor.

Table 2

Clinical and demographic data of patients by cognitive impairment.

	All (n=163)	PD with CI (n=81)	PD without CI (n=82)	<i>p</i>
Gender (male)	84(51.5%)	37(45.7%)	47(57.3%)	0.159
European ancestry	139(85.3%)	65(80.2%)	74(90.2%)	0.079
Age	68.82(9.3)	69.17(8.4)	68.45(10.1)	0.720
Age at onset	60.66(9.8)	60.25(8.9)	61.04(10.7)	0.731
Disease duration	8.16(5.1)	8.92(5.5)	7.40(4.5)	0.088
Levodopa diary dose(mg)	698.4(303.47)	728.8 (301.59)	673.9(306.4)	0.128
Education (years)	5.94(3.9)	6.44(4.0)	5.45(3.7)	0.162
Hoehn & Yahr	2.74(0.79)	2.99(0.79)	2.49(0.70)	<0.001*

Abbreviations: PD = Parkinson's disease, CI = Cognitive impairment. Tests performed in table were: Chi-square, Mann-Whitney *U*, Kruskal-Wallis.

*Difference is statistically significant ($p < 0.05$)

Table 3

Clinical and demographic data of patients according to genotypes.

	APOE (n=160)				BDNF (n=163)		
	APOE*2 carrier	APOE*3/APOE*3	APOE*4 carrier	<i>p</i>	Met carrier	Val/Val	<i>p</i>
Gender (male)	13(65.0%)	50(49.0%)	19(50.0%)	0.451	32(62.7%)	52(46.2%)	0.064
European ancestry	19(95.0%)	87(85.3%)	31(81.6%)	0.401	45(88.2%)	94(83.9%)	0.492
Age	68.15(11.1)	68.78(9.2)	69.13(8.9)	0.983	69.94(8.7)	68.31(9.6)	0.344
Age at onset	60.60(12.2)	60.41(9.7)	61.05(9.0)	0.958	61.76(10.3)	60.16(9.6)	0.379
Disease duration	7.55(4.2)	8.37(5.56)	8.07(4.29)	0.916	8.17(5.83)	8.15(4.74)	0.677
Levodopa diary dose(mg)	667.5(287.9)	695.6(321.9)	750.0(252.4)	0.230	734.1(371.9)	682.2(266.9)	0.745
Education (years)	4.95(4.0)	6.04(3.8)	6.39(3.9)	0.189	5.27(3.6)	6.25(3.9)	0.125
MMSE	23.85(4.2)	25.19(3.3)	23.71(5.2)	0.332	23.43(3.9)	25.20(3.8)	0.005
Impaired cognition	10(50.0%)	47(46.0%)	22(78.6%)	0.449	32(62.7%)	49(43.7%)	0.029
H & Y	2.5(0.76)	2.7(0.78)	2.9(0.79)	0.165	2.8(0.71)	2.7(0.82)	0.386

Data presented as *n* (%) or mean (\pm standard deviation) and compared by Chi-square, Mann-Whitney *U*-test, Kruskal-Wallis when appropriate. Abbreviations: APOE = Apolipoprotein E, BDNF = Brain derived neurotrophic factor, MMSE = Mini-Mental State Examination, H&Y = Hoehn and Yahr. Cognitive impaired patients according to Brucki et al. MMSE cut-off points for Brazilian patient

Table 4

Poisson regression analysis of risk factor for cognitive impairment in Parkinson's disease.

BDNF Genotypes	b	Standard Error	Prevalence Ratio	IC 95%	<i>P</i> -value
Val/Val	0		1		
Met carrier	0.421	0.1525	1.523	1.12-2.05	0.006

BDNF = Brain derived neurotrophic factor. Adjusted for sex, age, ancestry and disease duration

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

A discussão específica dos resultados obtidos no presente trabalho encontra-se no capítulo III dessa Dissertação. Neste capítulo, pretende-se discutir aspectos mais gerais sobre o declínio cognitivo e a DP.

Há várias ferramentas neuropsicológicas utilizadas para testar a função cognitiva na DP. O diagnóstico de demência possui critérios definidos como o uso do DSM IV e do NINCDS-ADRDA. Entretanto, um consenso no diagnóstico do déficit cognitivo ainda não foi estabelecido. Dentre os instrumentos utilizados nos hospitais e centros de pesquisa, as escalas globais de cognição (MMSE, MoCA, PD-CRS, SCOPA-COG e MDRS) e as destinadas a domínios específicos (WAIS-IV, Wisconsin Card Sorting Test, Tower of London Test, Hooper Visual Organization Test, entre outras) são as mais aplicadas (Litvan *et al.*, 2012). Os domínios cognitivos abrangidos nos testes específicos são atenção e memória de trabalho, executivo, memória, linguagem e o visuo-espacial. Esses testes específicos para cada domínio mostram-se vantajosos para o diagnóstico do paciente nesse sintoma tão heterogêneo. Porém, as diferentes escalas para cada domínio diferem em suas perguntas e em como são administradas, o que torna as comparações entre estudos muito difíceis. Novos instrumentos de medida não são necessários, contudo, mais estudos e validações dos instrumentos existentes devem ser realizados (Barone *et al.*, 2011).

Uma vez que os sinais não são aparentes no início da doença e os instrumentos não são validados, o déficit cognitivo é menos identificado e diagnosticado. Proporcionar pontos de corte de acordo com idade e escolaridade para as escalas para padronizar o diagnóstico de déficit cognitivo tem se mostrado

satisfatório. Contudo, internacionalizar os mesmos não é viável, pois as populações diferem muito quanto aos seus dados demográficos.

Estudos que caracterizem os estágios do déficit cognitivo durante o curso da doença de Parkinson nos pacientes estão em andamento e aumentam as perspectivas de uma melhor compreensão desse sintoma. A determinação desses estágios em pacientes recém-diagnosticados com DP forneceria o entendimento dos padrões do desenvolvimento do déficit cognitivo nos estágios iniciais da DP e como que ele progride. A melhor abordagem seria combinar vários instrumentos comparando-os tanto no diagnóstico quanto na investigação desse sintoma. Esses estudos poderiam auxiliar na capacidade de prevenção e tratamento do declínio cognitivo nos pacientes com DP.

Um importante fator de risco para o déficit cognitivo é a idade. O déficit cognitivo não está presente somente nos pacientes com DP e em outras doenças neurodegenerativas, mas é encontrado também no envelhecimento normal. O envelhecimento é um processo complexo e heterogêneo associado a uma grande variabilidade individual. Baseado em evidências, sugere-se que o processo de envelhecimento seja resultado de uma vulnerabilidade do neurônio, devido a redes de interações protéicas alteradas, danos oxidativos, desregulação da homeostase do cálcio intracelular, autofagia, mecanismos de resistência a stress celular, entre outros. O declínio na cognição ocorre também no envelhecimento "saudável" (Jellinger e Attems, 2013). Portanto, distinguir quanto do déficit cognitivo é devido a idade e quanto a DP é uma ponto-chave necessário.

O estudo da patofisiologia do déficit cognitivo é complexo, envolvendo múltiplos neurotransmissores, plasticidade sináptica diferenciada e uma neurodegeneração difusa. A associação de alterações cognitivas na DP ao desbalanço em vias colinérgicas, dopaminérgicas e possivelmente noradrenérgicas e glutamatérgicas levaram aos estudos de drogas como inibidores da colinesterase (rivastigmina) e antagonista de receptor glutamatérgico (memantina) (Svenningsson *et al.*, 2012). A rivastigmina foi eficaz, melhorando a cognição global dos pacientes para os quais o medicamento foi prescrito em relação àqueles que utilizaram placebo. Já a memantina apresentou resultados inconsistentes. O tratamento do déficit cognitivo ainda é incipiente, muitas investigações ainda serão necessárias para identificar e produzir medicamento eficazes para esse importante problema do envelhecimento normal e patológico.

Como mencionado no capítulo II, o componente genético é indispensável para compreender a etiologia e a patofisiologia do déficit cognitivo. Além dos genes investigados no presente trabalho, outros genes relacionados a neuroplasticidade são importantes e não foram estudados nesse trabalho. Dentre eles, estão os genes que codificam as neurotrofinas GDNF, NGF, NT-3 e NT-4. O GDNF exerce efeito protetor nos neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos, sugerindo que tenha potencial efeito terapêutico na DP. O NGF é importante na sobrevivência, crescimento e manutenção de neurônios específicos, sendo produzido no hipocampo e no córtex e tem como alvo neurônios do sistema colinérgico no prosencéfalo basal, neurônios estriatais e hipocampais (Allen *et al.*, 2013). Já as proteínas NT-3 e NT-4

foram menos estudadas até hoje, mas são expressas em vários locais no cérebro e possuem funções semelhantes as outras neurotrofinas (Siegel e Chauhan, 2000).

Genes que codificam proteínas que formam agregados também estão sendo estudados como componentes do desenvolvimento do déficit cognitivo. Haplótipos do gene da MAPT, que codifica a proteína tau e duplicações do gene *SNCA*, que codifica a alfa-sinucleína já foram associados a demência. Polimorfismos em *DYRK1A*, que codifica uma quinase que fosforila as proteínas alfa-sinucleína e a proteína precursora do amilóide também foram associados a alterações cognitivas (Svenningsson *et al.*, 2012). Provavelmente muitos outros genes relacionados ao déficit cognitivo ainda não foram identificados ou estudados. O reconhecimento desses genes bem como o aprofundamento dos estudos com os já identificados poderá certamente permitir um melhor entendimento da base molecular do déficit cognitivo e da demência no processo de envelhecimento normal e patológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A and Kragh-Sorensen P (2003) Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease - An 8-year prospective study. Arch Neurol 60: 387-392.

Aarsland D, Perry R, Brown A, Larsen JP and Ballard C (2005) Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: A prospective, community-based study. Ann Neurol 58: 773-776.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU and Patel NK (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. Pharmacology & Therapeutics 138: 155-175.

Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM and Hyman C (1992) BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AUGMENTS ROTATIONAL BEHAVIOR AND NIGROSTRIATAL DOPAMINE TURNOVER INVIVO. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 11347-11351.

Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF and Cardoso F (2006) Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambui study). Mov Disord 21: 800-808.

Barde YA, Edgar D and Thoenen H (1982) PURIFICATION OF A NEW NEUROTROPHIC FACTOR FROM MAMMALIAN BRAIN. *Embo Journal* 1: 549-553.

Barone P, Aarsland D, Burn D, Emre M, Kulisevsky J and Weintraub D (2011) Cognitive impairment in nondemented Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 2483-2495.

Baydyuk M, Nguyen MT and Xu B (2011) Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Experimental Neurology* 228: 118-125.

Bishop NA, Lu T and Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464: 529-535.

Calabrese F, Guidotti G, Racagni G and Riva MA (2013) Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 34: 2768-2776.

Chen J, Li Q and Wang J (2011) Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 14813-14818.

Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL and Lee FS (2004) Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci* 24: 4401-4411.

Corbo RM and Scacchi R (1999) Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 63: 301-310.

Dauer W and Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.

de-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G and Hutz MH (2000) Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 529-537.

De Jager PL, Shulman JM, Chibnik LB, Keenan BT, Raj T, Wilson RS, Yu L, Leurgans SE, Tran D, Aubin C, *et al.* (2012) A genome-wide scan for common variants affecting the rate of age-related cognitive decline. *Neurobiol Aging* 33.

de Lau LML and Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 525-535.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, *et al.* (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257-269.

Ezquerro M, Campdelacreu J, Gaig C, Compta Y, Munoz E, Marti MJ, Valldeoriola F and Tolosa E (2008) Lack of association of APOE and tau polymorphisms with dementia in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 448: 20-23.

Ferraz HB (1999) Tratamento da doença de Parkinson. *Revista Neurociências* 7: 06-12.

Foltynie T, Cheeran B, Williams-Gray CH, Edwards MJ, Schneider SA, Weinberger D, Rothwell JC, Barker RA and Bhatia KP (2009) BDNF val66met influences time to onset of levodopa induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 141-144.

Foltynie T, Lewis SGJ, Goldberg TE, Blackwell AD, Kolachana BS, Weinberger DR, Robbins TW and Barker RA (2005) The BDNF Val(66)Met polymorphism has a gender specific influence on planning ability in Parkinson's disease. *J Neurol* 252: 833-838.

Frieden C and Garai K (2013) Concerning the structure of apoE. *Protein Science* 22: 1850-1855.

Goldman JG and Litvan I (2011) Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Minerva Med* 102: 441-459.

Greenberg ME, Xu BJ, Lu B and Hempstead BL (2009) New Insights in the Biology of BDNF Synthesis and Release: Implications in CNS Function. *J Neurosci* 29: 12764-12767.

Guerini FR, Beghi E, Riboldazzi G, Zangaglia R, Pianezzola C, Bono G, Casali C, Di Lorenzo C, Agliardi C, Nappi G, *et al.* (2009) BDNF Val66Met polymorphism is associated with cognitive impairment in Italian patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 16: 1240-1245.

Hadjigeorgiou GM and Zintzaras E (2005) The role of G196A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in the cause of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences* 238: S357-S357.

Hely MA, Reid WGJ, Adena MA, Halliday GM and Morris JGL (2008) The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord* 23: 837-844.

Huang XM, Chen P, Kaufer DI, Troster AI and Poole C (2006) Apolipoprotein e and dementia in Parkinson disease - A meta-analysis. Arch Neurol 63: 189-193.

Huang Y and Mucke L (2012) Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. Cell 148: 1204-1222.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L and Lees AJ (1992) ACCURACY OF CLINICAL-DIAGNOSIS OF IDIOPATHIC PARKINSONS-DISEASE - A CLINICOPATHOLOGICAL STUDY OF 100 CASES. J Neurol Neurosurg Psychiatry 55: 181-184.

Jellinger KA and Attems J (2013) Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. Dialogues Clinical Neuroscience 15: 29-43.

Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK and Poewe W (2002) Impact of coexistent Alzheimer pathology on the natural history of Parkinson's disease. Journal of Neural Transmission 109: 329-339.

Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K and Hefti F (1991) PROMOTION OF CENTRAL CHOLINERGIC AND DOPAMINERGIC NEURON DIFFERENTIATION BY BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR BUT NOT NEUROTROPHIN 3. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 961-965.

Kostrzewa RM, Nowak P, Kostrzewa JP, Kostrzewa RA and Brus R (2005) Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids* 28: 157-164.

Kurz MW, Dekomien G, Nilsen OB, Larsen JP, Aarsland D and Alves G (2009) APOE Alleles in Parkinson Disease and Their Relationship to Cognitive Decline: A Population-based, Longitudinal Study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 22: 166-170.

Lang AE and Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339: 1044-1053.

Levivier M, Przedborski S, Bencsics C and Kang UJ (1995) Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 15: 7810-7820.

Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, Mollenhauer B, Adler CH, Marder K, Williams-Gray CH, *et al.* (2012) Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord* 27: 349-356.

Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ and Wren P (2013) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14: 401-416.

Lu B, Pang PT and Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-614.

Mahley RW (1988) Apolipoprotein-E - Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* 240: 622-630.

Masliah E, Mallory M, Ge NF, Alford M, Veinbergs I and Roses AD (1995) NEURODEGENERATION IN THE CENTRAL-NERVOUS-SYSTEM OF APOE-DEFICIENT MICE. *Experimental Neurology* 136: 107-122.

Masliah E, Mallory M, Veinbergs I, Miller A and Samuel W (1996) Alterations in apolipoprotein E expression during aging and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* 50: 493-&.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H and Nagatsu T (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 270: 45-48.

Morley JF, Xie SX, Hurtig HI, Stern MB, Colcher A, Horn S, Dahodwala N, Duda JE, Weintraub D, Chen-Plotkin AS, *et al.* (2012) Genetic influences on cognitive decline in Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 512-518.

Murer MG, Yan Q and Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 63: 71-124.

Nagahara AH and Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10: 209-219.

Nutt JG, Woodward WR, Hammerstad JP, Carter JH and Anderson JL (1984) THE ON OFF PHENOMENON IN PARKINSONS-DISEASE - RELATION TO LEVODOPA ABSORPTION AND TRANSPORT. *N Engl J Med* 310: 483-488.

Okazawa H, Murata M, Watanabe M, Kamei M and Kanazawa I (1992) DOPAMINERGIC STIMULATION UP-REGULATES THE INVIVO EXPRESSION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) IN THE STRIATUM. *Febs Letters* 313: 138-142.

Olanow CW and Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22: 123-144.

Pankratz N, Byder L, Halter C, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T, Nichols WC and Parkinson Study Grp P (2006) Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord* 21: 45-49.

Papapetropoulos S, Farrer MJ, Stone JT, MilkoviC NM, Ross OA, Calvo L, McQuorquodale D and Mash DC (2007) Phenotypic associations of tau and ApoE in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 414: 141-144.

Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E and Raisman-Vozari R (1999) Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* 10: 557-561.

Park H and Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7-23.

Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K and Timmusk T (2007) Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90: 397-406.

Pulkes T, Papsing C, Mahasirimongkol S, Busabaratana M, Kulkantrakorn K and Tiamkao S (2011) Association between apolipoprotein E genotypes and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 18: 1333-1335.

Roux PP and Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67: 203-233.

Schapira AHV and Obeso J (2006) Timing of treatment initiation in Parkinson's disease: A need for reappraisal? *Ann Neurol* 59: 559-562.

Siegel GJ and Chauhan NB (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews* 33: 199-227.

Svenningsson P, Westman E, Ballard C and Aarsland D (2012) Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment. *The Lancet Neurology* 11: 697-707.

Takeda M, Martinez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R and Cacabelos R (2010) Apolipoprotein E and central nervous system disorders: Reviews of clinical findings. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 64: 592-607.

Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O and Hashimoto N (1995) EFFECTS OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR ON 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE-INDUCED PARKINSONISM IN MONKEYS. *Neurosurgery* 37: 733-739.

Waterhouse EG and Xu B (2009) New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience* 42: 81-89.

Weintraub D and Burn DJ (2011) Parkinson's disease: The quintessential neuropsychiatric disorder. *Mov Disord* 26: 1022-1031.

Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, Foltynie T, Compston DAS, Sawcer SJ and Barker RA (2009) Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's Disease. *J Neurol* 256: 493-498.

Zhang X, Andren PE and Svenningsson P (2006) Repeated L-DOPA treatment increases c-fos and BDNF mRNAs in the subthalamic nucleus in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Brain Research* 1095: 207-210.