

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ASSOCIAÇÃO ENTRE METABOLISMO DO FERRO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON

Aluno:
Márcio Schneider Medeiros

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Dissertação de Mestrado

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Associação entre Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com
Doença de Parkinson

Márcio Schneider Medeiros

Orientador: Carlos Roberto de Mello Rieder

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2014

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Schneider Medeiros, Márcio
ASSOCIAÇÃO ENTRE METABOLISMO DO FERRO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON /
Márcio Schneider Medeiros. -- 2014.
93 f.

Orientador: Carlos Roberto de Mello Rieder.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Doença de Parkinson. 2. Estresse oxidativo. 3.
Estresse nitrosativo. 4. Ferro. 5. Biomarcadores. I.
de Mello Rieder, Carlos Roberto, orient. II. Título.

Dedicatória

Aos pacientes com doença de Parkinson
atendidos no Sistema Único de Saúde.

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Carlos Roberto de Mello Rieder, que tornou possível esse mestrado, um excelente neurologista e incentivador do trabalho científico. A todos os colegas da neurologia do HCPA, principalmente ao Artur Schumacher Schuh, grande amigo e colega de pesquisa. Agradeço, também, à Thaís Lampert Monte que sempre presente no ambulatório de distúrbios do movimento/HCPA e à Michele Fighera, importante colaboradora mesmo à distância.

Quero agradecer à Profa. Arlete Hilbig, minha professora de distúrbios do movimento durante os três anos da minha formação como neurologista.

Agradeço à minha esposa Fernanda Baeza que, apesar de achar que não contribuiu para esse mestrado, esteve comigo durante todo esse período e me ajudou sendo uma inspiração e um modelo de seriedade e trabalho. Além de tudo, foi imprescindível na estatística e na revisão rigorosa da dissertação.

Agradeço aos meus pais por terem transmitido a mim e aos meus irmãos o interesse pela busca de conhecimento e pela pesquisa acadêmica. Enfim, obrigado por despertarem em mim o prazer de estudar e aprender.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição pública que me proporcionou formação profissional e acadêmica gratuita. Especialmente, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da mesma Universidade, coordenado pelo Prof. Dr. Wolnei Caumo.

Resumo

Introdução: A fisiopatologia da doença de Parkinson está associada a lesões por estresse oxidativo/nitrosativo. O ferro encontra-se acumulado na substância negra (SN) de pacientes com DP e está relacionado com esse dano através das espécies reagentes de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) na reação de Fenton. EROs e ERNs são produzidas normalmente em processos celulares e inflamatórios, e controladas por sistemas antioxidantes.

Objetivo: Avaliar níveis periféricos de ferro em pacientes com DP para determinar se acúmulo na SN está relacionado com níveis elevados no sangue. Determinar biomarcadores periféricos confiáveis de estresse oxidativo/nitrosativo

Métodos: Selecionados 40 pacientes com DP e 46 indivíduos controles para comparar níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina, e de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo: superóxido dismutase (SOD), catalase, óxido nítrico (NOx), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis não-proteicos, “advanced oxidation protein products” (AOPP), “ferric reducing ability of plasma” (FRAP), NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, adenosina deaminase (ADA), mieloperoxidase, albumina modificada pela isquemia (IMA) e vitamina C.

Resultados: Níveis de ferro estavam diminuídos em pacientes com DP, enquanto ferritina e transferrina não mostraram diferença. Os biomarcadores de estresse oxidativo como TBARS, AOPP, NTPDases, IMA, mieloperoxidase, FRAP, vitamina C e tióis não-proteicos encontraram-se significativamente aumentados na DP. SOD, catalase, ecto-5'-nucleotidase não foram diferentes entre os grupos e os marcadores NOx e ADA foram significativamente aumentados nos controles. Nenhuma correlação foi encontrada entre os biomarcadores e dados sociodemográficos e de características da doença.

Conclusão: Níveis plasmáticos de ferro encontram-se diminuídos em pacientes com DP comparados com controles saudáveis. Os biomarcadores TBARS, AOPP, NTPDases, IMA e mieloperoxidase mostraram-se confiáveis para lesão oxidativa, enquanto tióis não-proteicos, FRAP e vitamina C demonstram diminuição da capacidade antioxidante na DP.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Parkinson, ferro, estresse oxidativo, estresse nitrosativo, AOPP, FRAP, IMA, mieloperoxidase, SOD, catalase, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, ADA, NO, tióis não-proteicos, vitamina C, TBARS, biomarcadores

Abstract

Background: Parkinson's disease (PD) pathophysiology is associated with oxidative/nitrosative stress damage. Iron accumulates in the substantia nigra (SN) of PD patients and is related to this damage along with oxygen and nitrogen reactive species (ROS, RNS) through Fenton reaction. ROS and RNS are normally produced in cell and inflammatory processes, controlled by antioxidant systems.

Objective: To determine peripheral levels of iron, ferritin and transferrin in PD patients to evaluate whether iron accumulation in the SN could be related to serum levels. To determine reliable peripheral biomarkers of oxidative/nitrate stress.

Methods: Forty PD patients and 46 controls were selected to compare serum levels of iron, ferritin, transferrin and oxidative/nitrate stress biomarkers: superoxide dismutase (SOD), catalase, nitric oxide (NO_x), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), non-protein thiols, advanced oxidation protein products (AOPP), ferric reducing ability of plasma (FRAP), NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA), myeloperoxidase, ischemic-modified albumin (IMA) and vitamin C.

Results: Iron levels were decreased in patients with PD, while ferritin and transferrin were not different. Oxidative stress biomarkers, TBARS, AOPP, NTPDases, IMA, myeloperoxidase, FRAP, vitamin C and non-protein thiols were significantly higher in PD. SOD, catalase, ecto-5'-nucleotidase were not different between the groups and biomarkers NO_x and ADA were significantly increased in the controls. No correlation was found between biomarkers and sociodemographic and disease data.

Conclusion: Plasmatic levels of iron are decreased in patients with PD compared to healthy controls. Biomarkers TBARS, AOPP, NTPDases, IMA and myeloperoxidase presented as reliable to measure oxidative/nitrate damage, while non-protein thiols, FRAP and vitamin C show a decrease in the antioxidant capacity in PD.

KEY WORDS: Parkinson's disease, iron, oxidative stress, nitrate stress, AOPP, FRAP, IMA, myeloperoxidase, SOD, catalase, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, ADA, NO, non-protein thiols, vitamin C, TBARS, biomarkers

Lista de Tabelas

Table 1. (artigo) Sociodemographic information of patients with Parkinson's disease and controls	38
Table 2. (artigo) Comparison of iron, ferritin and transferrin peripheral blood levels between patients with Parkinson's disease and controls.....	38
Table 3. (artigo) Comparison of oxidative stress and antioxidant peripheral biomarkers between patients with Parkinson's disease and controls.....	38

Lista de Figuras

Figura 1. Homeostasia do ferro	5
Figura 2. Redução do O ₂ à H ₂ O	8
Figura 3. Diferentes mecanismos de produção de radicais livres e ERO/ERN	9
Figura 4. Liberação de ferro por estresse oxidativo.	16
Figura 5. Ciclo de lesão oxidativa e produção de radicais livres na fisiopatologia da doença de Parkinson idiopática	17
Figure 1. (artigo) IMA levels in PD patients and controls.....	39
Figure 2. (artigo) AOPP levels in PD patients and controls	39
Figure 3. (artigo) FRAP levels in PD patients and controls	39
Figure 4. (artigo) SOD levels in PD patients and controls	39
Figure 5. (artigo) Catalase levels in PD patients and controls	40
Figure 6. (artigo) TBARS levels in PD patients and controls	40
Figure 7. (artigo) Vitamin C levels in PD patients and controls	40
Figure 8. (artigo) ADA levels in PD patients and controls.....	40
Figure 9. (artigo) Myeloperoxidase levels in PD patients and controls	41
Figure 10. (artigo) Group –SH levels in PD patients and controls	41
Figure 11. (artigo) NTPDase (ATPD and ADP) and ecto-5'-nucleotidase levels in PD patients and controls.....	41

Lista de abreviaturas

DP	Doença de Parkinson
SN	Substância negra
Fe	Ferro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
DMT1	Transpostador de metal divalente 1 (do inglês “divalent metal transporter 1”)
IRP	Proteínas reguladoras de ferro (do inglês “iron regulatory proteins”)
IRE	Elementos responsáveis ao ferro (do inglês “iron responsive elements”)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH ⁻	Radical hidroxila
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ATP	Adenosina trifosfato
O ₂ ^{•-}	Superóxido
MAO-B	Monoamina oxidase B
HOCl	Ácido hipocloroso
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NO	Óxido nítrico

NOS	NO sintetase
iNOS	NO sintetase induzida
nNOS	NO sintetase neuronal
eNOS	NO sintetase endotelial
ADP	Adenosina difosfato
NTPDase	Ecto-difosfoidrolase
ADA	Adenosina deaminase
SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
FRAP	do inglês “Ferric reducing ability of plasma”
ROO [•]	Radical peroxil
ROOH	Peróxido lipídico
ROH [•]	Radical alcoxil
MDA	Malondialdeído
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês – “thiobarbituric acid reactive substances”)
Grupos-SH	Grupos tióis
AOPP	do inglês “Advanced oxidation protein products”
8-OH-dG	8-hidroxi-20-deoxiguano

IMA	Albumina modificada pela isquemia (do inglês – “ischemic-modified albumin”)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
VMAT	Transportador de monoamina vesicular (do inglês – “vesicular monoamine transporter”)
VTA	Área tegmental ventral (do inglês – “ventral tegmental area”)
SNCA	Sinucleína
PINK1	“PTEN-induced putative kinase 1”
LRRK2	“Leucin-rich repeat kinase 2”
UPDRS	“Unified Parkinson’s Disease Rating Scale”
H&Y	Escala Hoehn & Yahr
IMC	Índice de massa corporal

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	2
2.1. Estratégia para localizar e selecionar as informações.....	2
2.2. Doença de Parkinson.....	2
2.3. Metabolismo do ferro	4
2.4. Estresse oxidativo.....	6
2.5. Produção de EROs, ERNs e radicais livres.....	7
2.6. Tipos de EROs e ERNs	8
2.7. Controle antioxidante	10
2.8. Dano oxidativo e sua medida.....	11
2.8.1. Lipoperoxidação.....	12
2.8.2. Oxidação de proteínas.....	13
2.8.3. Oxidação de DNA	14
2.8.4. IMA.....	14
2.9. Estresse oxidativo, ferro e doença de Parkinson	14
3. Objetivos.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. Referências bibliográficas.....	20
5. Artigo em inglês	25
6. Considerações finais	47
6.1. Ferro e doença de Parkinson.....	47
6.2. Marcadores de estresse oxidativo e doença de Parkinson	49
6.3. Limitações	55
6.4. Conclusão	55
6.5. Referências	57
7. Apêndices	61
7.1. Termo de consentimento	61
7.2. Ficha de avaliação pacientes/controles	65

8. Anexos	66
8.1. Avaliação nutricional	66
8.2. UPDRS.....	68
8.3. H&Y.....	78

1. Introdução

O ferro é um elemento abundante e fundamental para o organismo por estar envolvido em diversas funções vitais como síntese de DNA, neurotransmissão, mielinização, transporte e armazenamento de oxigênio, transporte de elétrons na mitocôndria, metabolismo e biossíntese de neurotransmissores (1). Além disso, tem participação importante na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (2). O ferro, através da reação de Fenton, reage com H_2O_2 formando o radical hidroxila que é um radical livre extremamente reagente que age rapidamente causando lesões por estresse oxidativo (2, 3). Dessa forma, há um controle rigoroso nos níveis séricos para que não haja acúmulo de ferro com possível efeito danoso aos tecidos. As espécies reagentes de oxigênio (H_2O_2 , OH^- , O_2^-) e de nitrogênio (NO, $ONOO^-$), produzidas naturalmente pelas células, são mantidas em níveis adequados/não-tóxicos por enzimas e sistemas antioxidantes, na tentativa de impedir o estresse oxidativo/nitrosativo(4).

O dano oxidativo está relacionado com o envelhecimento e com processos neurodegenerativos, como a doença de Parkinson, embora não se conheça exatamente como se desenvolve o processo patofisiológico. Há fatores genéticos e ambientais, envolvendo dano oxidativo e acúmulo de ferro e α -sinucleína em regiões específicas do cérebro. Ainda não está estabelecido se o ferro está na gênese da doença ou se é consequência do processo fisiopatológico da DP, mantendo o ciclo de lesão neuronal que leva a progressão da doença. Nesse contexto, o entendimento do metabolismo do ferro e das disfunções relacionadas ao estresse oxidativo, comparando com controles saudáveis, é fundamental para trazer novos conhecimentos com o objetivo de desvendar a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, como a DP. Assim, a definição de biomarcadores confiáveis de estresse oxidativo e nitrosativo é importante com o intuito de possibilitar descobertas futuras envolvendo os mecanismos da DP.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura foi focada na busca de artigos relacionados a homeostasia do ferro e sua relação com a doença de Parkinson. Estudos e revisões de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo associados a doença de Parkinson e a doenças com componente inflamatório crônico também foram revisados, assim como dados epidemiológicos e fisiopatológicos da doença de Parkinson. A base de dados usada foi PubMed/Medline e os termos pesquisados foram “Parkinson’s disease”; “epidemiology”; “risk factors”; “etiology”; “iron”; “homeostasis”; “oxidative stress”; “nitrate stress”; “biomarkers”; “inflammation” e suas combinações.

2.2 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda condição neurodegenerativa mais comum na população, após a doença de Alzheimer (5). É mais conhecida pelo quadro de tremor de repouso. No entanto, seu diagnóstico - definido pelo banco de cérebros de Londres - leva em consideração a presença de no mínimo dois dos principais sintomas, que incluem tremor de repouso, rigidez e bradicinesia. Esta última deve necessariamente estar presente (6). É necessário, ainda, que características como resposta marcada à levodopa, início assimétrico e evolução lenta estejam presentes, sendo indispensável descartar que os sintomas parkinsonianos sejam secundários a outras condições clínicas (6).

A prevalência estimada da DP é de 0,3% na população geral e cerca de 1% na população acima de 60 anos, com uma incidência de 8-18 por 100.000 (5). Em um estudo brasileiro, encontrou-se uma prevalência de 3,3% em uma população com 64 anos ou mais (7). Há predomínio discreto de homens, com uma proporção de 3:2 comparado às mulheres.

Em 90% dos casos, a DP é idiopática, sendo somente 10% dos casos explicados por mutações genéticas específicas com herança monogênica (5). Os genes LRRK2 e α -sinucleína (SNCA) são os principais responsáveis pela DP autossômica dominante, enquanto os genes da Parkina, PINK1 e DJ-1 causam a DP

autossômica recessiva. Entre os fatores de risco conhecidos para DP idiopática estão a idade e contato com pesticidas (8, 9).

Do ponto de vista patológico, a doença caracteriza-se principalmente pela perda irreversível de neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN) *pars compacta*, que faz projeções para neurônios no núcleo estriado. Essas vias dopaminérgicas atuam no sistema motor, facilitando ou inibindo o movimento. Estudos recentes estimam que seja necessária a perda de pelo menos 50% dos neurônios dopaminérgicos para que surjam os primeiros sintomas motores (10). Os corpúsculos de Lewy, agregados eosinofílicos compostos principalmente pela proteína α -sinucleína, formam-se nos neurônios sobreviventes e são o achado patológico característico da DP (2). Outra característica da DP é o acúmulo de ferro na substância negra. Estudos prévios em indivíduos com DP identificaram um aumento da concentração de ferro em exames *post mortem*, e modelos animais da doença induzem o acúmulo de ferro. Essas evidências indicam que há relação direta do ferro com a DP (11, 12).

A DP é uma doença crônica e multissistêmica. A degeneração não é restrita aos neurônios dopaminérgicos da substância negra, estendendo-se também a neurônios dopaminérgicos de outras áreas e a neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos. Tais déficits podem estar presentes também em outras estruturas do tronco cerebral, no córtex cerebral e até mesmo em neurônios periféricos, como o plexo mioentérico (13). Como consequência, sintomas não-motores também acometem os pacientes, incluindo constipação, distúrbio comportamental do sono REM, depressão, anosmia, alucinações, demência entre outros (14). A DP aumenta o risco de desenvolvimento de demência (5), condição que pode acometer até 80% dos pacientes após 20 anos de doença (15).

Há diversas hipóteses para o surgimento da degeneração dos neurônios dopaminérgicos e para a fisiopatologia da doença de Parkinson. O acúmulo de ferro na SN, associado com a produção de radicais livres, gera um ambiente propício para o dano celular e morte neuronal específica dessa região cerebral. Os detalhes da homeostasia do ferro e a formação de radicais livres, relacionados a falhas mitocondriais, processo inflamatório e características particulares desses neurônios, são de grande interesse para a melhor compreensão da DP.

2.3 Metabolismo do ferro

O ferro (Fe) é um elemento abundante e fundamental para o organismo por estar envolvido em diversas funções vitais, como síntese de DNA, neurotransmissão, mielinização, transporte e armazenamento de oxigênio, transporte de elétrons na mitocôndria, metabolismo, biossíntese de neurotransmissores e nas reações de oxidação e redução (1).

A absorção do ferro inicia no intestino delgado onde o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e levado até o sangue pela ferroportina. O Fe é liberado do anel porfirínico pela ação da enzima heme-oxigenase. A ceruloplasmina oxida novamente para Fe^{3+} permitindo a ligação com a transferrina (Tf) que ocorre firmemente e de forma reversível (2). A partir daí, o Fe é transportado até os sítios de absorção, armazenamento e utilização. A Tf é reconhecida por receptores de membrana celulares específicos (TfR), cruciais para a captação de Fe pelas células. Após a liberação intracelular do complexo Tf-TfR, o Fe entra em compartimentos funcionais ou é armazenado na ferritina (16).

Mais especificamente, os receptores de Tf na membrana endotelial se ligam ao ferro (Fe^{3+}), que o transportam para o endossomo intracelular onde é reduzido a Fe^{2+} , e então é levado ao citosol pelo canal transpostador de metal divalente (DMT1). Dentro da célula, esse Fe^{2+} pode seguir por diversas rotas: pode ser levado novamente para fora da célula pela ferroportina, onde é oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina; pode ser armazenado na ferritina, nas células gliais, e na neuromelanina nos neurônios dopaminérgicos; o Fe^{2+} pode ainda ser transportado para dentro da mitocôndria pela mitoferrina; noventa por cento do Fe, entretanto, permanece na forma Fe^{2+} livre intracelular, onde participa de reações redox (1, 2, 17, 18).

Os lisossomos estão envolvidos na regulação do ferro por apresentarem altas concentrações desse elemento, principalmente Fe^{2+} , resultante da liberação de ferro armazenado na ferritina através da degradação dessa enzima no interior dos lisossomos. Além da ferritina, os lisossomos degradam outras proteínas contendo ferro (17).

O controle da homeostasia celular do ferro ocorre de maneira pós-transcricional. As proteínas reguladoras de ferro (IRPs – do inglês “iron regulatory proteins”) detectam os níveis de ferro citoplasmáticos e se ligam a elementos responsáveis a ferro (IREs – do inglês “iron responsive elements”) nos mRNA que codificam as proteínas envolvidas na homeostase do ferro já descritas acima. Quando há deficiência de ferro, por exemplo, as IRPs se ligam aos IREs envolvidos na diminuição da produção de ferritina e ferroportina e no aumento a produção de TfR e DMT1, elevando os níveis de ferro intracelulares (1).

O próprio processo de envelhecimento favorece o acúmulo de ferro em certas regiões cerebrais, mais especificamente na substância negra. Apesar de este processo não estar totalmente compreendido, provavelmente estas regiões cerebrais são mais suscetíveis ao acúmulo de ferro pelo fato de as células do sistema nervoso central terem baixos níveis de divisão celular. Em outros tecidos, a divisão celular dilui o material de cada célula em duas novas células (1), diminuindo suas concentrações finais.

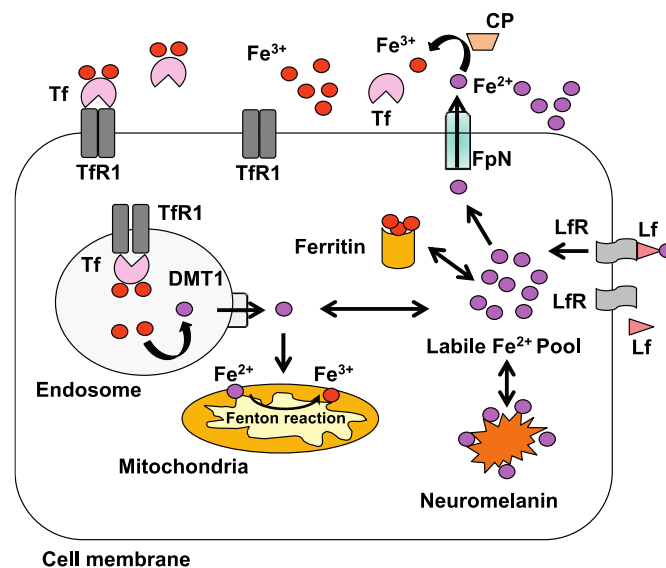
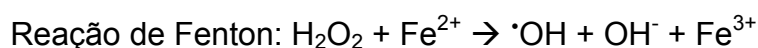


Figura 1. Homeostasia do ferro. (Tf – transferrina; TfR1 – receptor de transferrina; DMT1 – transportador de metal divalente 1; FpN – ferroportina; CP – ceruloplasmina; Lf – lactoferrina; LfR – receptor de lactoferrina). Retirado de *Weinreb et al. 2013*

O acúmulo de neuromelanina, ferritina e ferro lisossomal dentro dos neurônios e das células gliais (1), relacionado ao envelhecimento, pode fazer parte da

explicação do processo de neurodegeneração. No entanto, há a possibilidade de que o processo inverso também seja verdadeiro, em que a neurodegeneração aumenta o acúmulo de ferro nos neurônios (2). Diversos estudos de autopsias de pacientes com DP relataram acúmulo de ferro na SN (19, 20) e já foi identificado ferro elevado em estágios iniciais de DP e até em indivíduos com corpúsculos de Lewy acidentais (21). No entanto, alguns estudos contradizem esses achados, demonstrando ausência de diferença no acúmulo de ferro entre em indivíduos pré-sintomáticos e normais (22). Na DP, portanto, é controverso se o ferro na substância negra é um evento primário da doença ou apenas secundário à sua progressão. Lembrando que outras regiões cerebrais também acometidas na DP, como *locus coeruleus*, não apresentam tanto acúmulo de ferro como a SN (21).

O ferro tem participação importante também na produção de radicais livres, através de reações com espécies reativas de oxigênio. O Fe^{2+} livre no citoplasma participa da reação de Fenton, na qual reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando Fe^{3+} e o radical hidroxila (OH^\cdot) (2). O OH^\cdot é um radical livre extremamente reagente capaz de rapidamente causar dano a diferentes moléculas, o chamado estresse oxidativo (2, 3).



2.4 Estresse oxidativo

Um radical livre é um átomo ou molécula que tem um elétron não pareado, tornando-o reativo (3). Esses radicais, quando em excesso, podem reagir com moléculas como lipídios, proteínas e DNA, provocando a transferência de um elétron da molécula para o radical livre, o que pode acabar produzindo uma nova molécula instável. Este processo de oxidação danifica a molécula, ao alterar suas conformações e funções. Cria-se, assim, uma reação em cadeia prolongando o dano oxidativo (23). Todo este processo e as lesões ocasionadas são denominadas estresse oxidativo (4, 23).

O dano do estresse oxidativo pode ser causado fundamentalmente de duas maneiras: (1) através da modificação direta de macromoléculas intra/extracelulares que alteram a sua função, levando a efeitos patológicos; ou (2) alterando o estado redox dessas moléculas, modificando o seu efeito na transdução de sinais, o que leva a estados aumentados ou diminuídos de sinalização (4). Essas alterações são capazes de comprometer o funcionamento celular e levar a morte celular por necrose ou apoptose (23).

Os principais agentes de estresse oxidativo são as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (23). Espécies reativas de oxigênio são um grupo de derivados de oxigênio que podem estar tanto na forma radical como também não-radical (24). Essas substâncias são produzidas naturalmente e continuamente por células saudáveis, tendo funções importantes para o organismo, e são mantidas em níveis adequados/não-tóxicos por enzimas e sistemas antioxidantes (4). Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação e degradação das EROs e ERNs, e estas se tornam excessivas, são capazes de causar dano (4).

2.5 Produção de EROs, ERNs e radicais livres

O oxigênio é vital para a sobrevivência de organismos aeróbicos, sendo um dos responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP), substância essencial para a sobrevivência celular (3). Na cadeia respiratória, o oxigênio passa pelos complexos mitocondriais e vai sendo reduzido à água – redução de quatro elétrons (3). Se o processo fosse perfeito, a produção de ATP não teria nenhum produto secundário como os radicais livres. No entanto, falhas que produzem radicais livres ocorrem normalmente na cadeia respiratória e aumentam em situações em que há dano à mitocôndria (3). Esse processo é a principal fonte de EROs em células eucariontes, especialmente nos complexos I e III da mitocôndria, onde é mais comum o vazamento de elétrons da cadeia transportadora, levando a uma redução parcial do O_2 em superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (25). Uma mitocôndria lesada pode produzir um número maior de EROs, que ultrapassa a capacidade de degradação pela célula, levando a um possível dano oxidativo (3).

EROs como o $O_2^{\cdot-}$ também são produzidos durante processos inflamatórios, em mecanismos de defesa contra patógenos ou doenças crônicas e autoimunes. Quando a inflamação se torna crônica, a produção de EROs pode ser excessiva e contribuir para o estresse oxidativo (25).

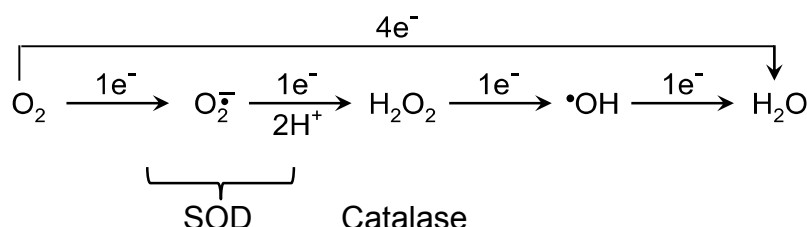


Figura 2. Redução do O_2 à H_2O . Adaptado de Kalyanaraman, 2013.

A dopamina, principal neurotransmissor dos neurônios acometidos na DP, contribui para o processo de produção de EROs de duas maneiras: (1) a degradação da dopamina nos neurônios é feita principalmente pela monoamina oxidase B (MAO-B), resultando na produção de H_2O_2 intracelular; e (2), a auto-oxidação da dopamina produz H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, além de quinonas que podem danificar diretamente proteínas intracelulares (26).

Há ainda a produção de espécies reativas através da excitotoxicidade. A hiperativação de neurônios por neurotransmissores excitatórios como o glutamato, provoca um fluxo maciço de cálcio para dentro do neurônio. Esse excesso de cálcio ativa diversas enzimas de degradação de proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos que podem gerar tanto EROs quanto ERNs (26).

Outra substância associada à produção de EROs e radicais livres é a mieloperoxidase (MPO). A MPO oxida ânions na presença de H_2O_2 , formando ácidos como o ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl é usado na defesa do organismo contra agentes infecciosos como bactérias e fungos (3), mas pode também reagir com EROs e levar a produção de radical hidroxila e peroxinitrito ($ONOO^-$) (27, 28).

2.6 Tipos de EROs e ERNs

Os principais EROs são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que associado aos metais de transição ferro e cobre, participam na formação de radicais livres a partir da reação de Fenton (3, 23). O

superóxido é um radical livre produzido principalmente na cadeia respiratória como um subproduto da redução de O_2 em água para formar ATP dentro da mitocôndria. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser indiretamente responsável por dano celular, pois após sofrer dismutação e ser transformado em H_2O_2 , que não é radical livre, mas pode produzir radicais hidroxila na reação de Fenton ou ainda reagir com óxido nítrico (NO) para formar o peroxinitrito, um potente radical livre (3, 23). O $O_2^{\cdot-}$ também é produzido em respostas inflamatórias por fagócitos, nessa situação o dano oxidativo é usado em favor do organismo como microbicida (3). Tem meia-vida relativamente longa o que permite difusão dentro da célula, aumentando a quantidade de possíveis alvos (23).

O peróxido de hidrogênio é formado em diversas reações biológicas, mas é importante no estresse oxidativo por ser produto da degradação do superóxido por sua enzima antioxidante, a superóxido dismutase. Resulta, também, da degradação da dopamina tanto pela auto-oxidação quanto pela MAO-B (23, 29). É uma molécula estável, servindo como precursor de radicais livres ao participar da reação de Fenton com ferro ou cobre, que produz radical hidroxila (OH^{\cdot}), tendo grande importância no dano oxidativo mesmo que indiretamente. Portanto, devido ao seu potencial de gerar dano oxidativo, é rapidamente degradado por enzimas antioxidantes como a catalase e a glutatona peroxidase (3).

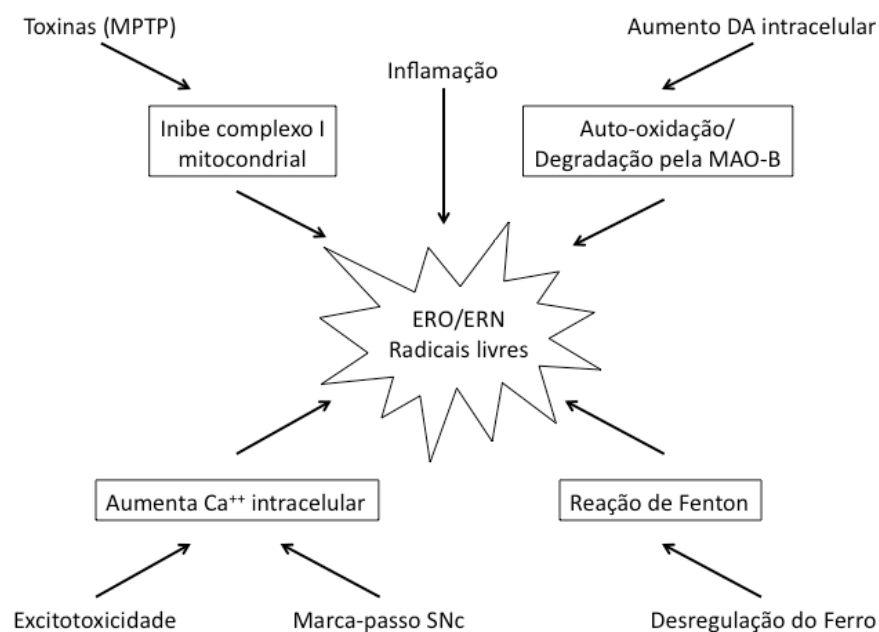


Figura 3. Diferentes mecanismos de produção de radicais livres e ERO/ERN (DA, dopamina; MAO-B, monoaminoxidase-B; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina; SNC, substância negra *pars compacta*).

O radical hidroxila é o radical livre mais reativo, com meia-vida muito curta, capaz de reagir com praticamente qualquer tipo de molécula e danificar qualquer tipo de substância (3). Sua produção ocorre principalmente pela reação de Fenton (23).

O NO é produzido naturalmente pelo organismo através das três isoformas da NO sintetase (NOS): induzida (iNOS), neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) (23). É muito importante por sua função de sinalização intracelular, na via que produz relaxamento do músculo liso e vasodilatação, (3) e como neurotransmissor (25). Possui um elétron não pareado e por isso é considerado um radical livre (23). Ao reagir com superóxido, produz peroxinitrito. Esse potente radical livre oxida rapidamente diversos grupos proteicos, lipídios e ácidos nucleicos provocando citotoxicidade (3).

Tanto ATP quanto ADP extracelulares estão ligados a processos pró-inflamatórios, como estimulação de linfócitos e citocinas, e são mantidos em níveis adequados através de enzimas NTPDase, convertidos em AMP. Esse, por sua vez, é convertido pela ecto-5'-nucleotidase em adenosina, uma substância com grande potencial anti-inflamatório e imunossupressor. Só então a adenosina deaminase (ADA) degrada a adenosina de maneira irreversível (30), sendo portanto, considerada uma enzima marcadora de estados pró-inflamatórios. Essa enzima catalisa a conversão de adenosina em inosina, que depois será convertida em ácido úrico (31). Essas substâncias passam a ter importância por possivelmente serem mais confiáveis que superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) como marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

2.7 Controle antioxidante

Organismos aeróbicos precisam conviver com as espécies reativas de oxigênio produzidas por eles mesmos. Para isto, apresentam maneiras de manter as concentrações de radicais livres abaixo de níveis tóxicos. Há o controle através de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e peroxidases) e agentes antioxidantes não-enzimáticos (vitamina C, vitamina E, glutathione, betacaroteno entre outros) (3).

Existem pelos menos dois tipos de superóxido dismutase: (1) com cobre e zinco (SOD-CuZn), situada no citoplasma, e (2) com o manganês no seu sítio ativo (SOD-Mn), encontrada na mitocôndria (4). Essa enzima é responsável pela dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (3).

A enzima catalase é responsável pela redução de peróxido de hidrogênio em O_2 e H_2O , principalmente quando os níveis de H_2O_2 estão baixos. Quando a concentração de H_2O_2 é alta, a glutathiona peroxidase age na detoxificação além de ser importante também na degradação de peróxidos de lipídios (3).

Os antioxidantes não-enzimáticos agem de outra forma, sem degradar diretamente os radicais livres. A vitamina E reage com radicais peroxil lipídicos que são produzidos durante o processo de peroxidação lipídica e que perpetuam a reação em cadeia de dano lipídico. Dessa maneira, são efetivos em bloquear o seguimento dessa reação e impedem o aumento do dano oxidativo. Já a vitamina C reage com o superóxido e o radical hidroxila, formando o radical ascorbato. Ao encontrar outro radical ascorbato, forma dehidroascorbato mais ascorbato, eliminando dessa forma o radical livre do ambiente intracelular (3).

Outro antioxidante não-enzimático importante pertence ao grupo dos tióis, substâncias que apresentam o grupamento $-SH$ que é responsável pela capacidade antioxidante dessas moléculas. A glutathiona é o principal tiol não-proteico pertencente ao grupo e, na sua forma reduzida (GSH), é oxidada em dissulfato de glutathiona (GSSG), sendo logo reduzida novamente para GSH pela glutathiona redutase que usa NADPH como co-fator. Nesse processo, a glutathiona neutraliza radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos (32, 33). Além disso, a GSH também atua como co-fator para a GPx e regenera os antioxidantes vitamina C e E para suas formas ativas (34).

2.8 Dano oxidativo e sua medida

O dano oxidativo ocorre de maneira muito rápida devido à meia-vida muito curta dessas substâncias e sua alta reatividade. Dessa maneira, torna-se muito difícil a medida direta dos radicais livres. É necessário, portanto, o uso de biomarcadores para que se possa quantificar a produção desses radicais e o dano oxidativo associado (35).

Um biomarcador é qualquer substância, ou seu derivado, estrutura ou processo, que possa ser medido no organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença (36). Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo são moléculas mais estáveis que os EROs e ERNs, geralmente metabólitos ou produtos finais das reações de oxidação. É necessário que essas substâncias sejam estáveis a ponto de se acumularem em quantidades possíveis de serem medidas (35). Para a avaliação da produção de radicais livres, usa-se as medidas de concentração das enzimas de degradação e dos sistemas antioxidantes não-enzimáticos. O estresse oxidativo é medido, portanto, de maneira indireta, através de seus metabólitos, produtos de degradação e sistemas antioxidantes.

A medida da atividade das enzimas SOD, catalase e GPx são indicativas da produção de radicais livres e fáceis de serem medidas através de sangue periférico. São usadas como marcadores de estresse oxidativo em diversas afecções, incluindo doenças neurodegenerativas (37). Os resultados são discordantes, alguns estudos mostram níveis elevados dessas enzimas em pacientes com doenças neurodegenerativas (38), enquanto outros tem dados divergentes, com possíveis níveis diminuídos em pacientes acima de 65 anos (35, 37). Há também estudos correlacionando esses marcadores com progressão de doença, como Kouti *et al.* que mostrou correlação entre altos níveis de NO e peroxinitrito séricos com um maior escore UPDRS (escore quantifica os sintomas que aumentam com a evolução da doença) em pacientes com doença de Parkinson (39).

Outra maneira de avaliar os sistemas antioxidantes é através da capacidade antioxidante total que pode ser medida pela “ferric reducing ability of plasma” (FRAP) por espectrometria UV. FRAP pode estimar o poder redutor dos antioxidantes do plasma, que incluem vitamina C, vitamina E, bilirrubina e ácido úrico (40). A glutatona, não é avaliada pelo FRAP.

Como já mencionado anteriormente, os radicais livres atuam principalmente causando lesão em lipídios, proteínas e DNA. Dessa maneira, a avaliação do estresse oxidativo se baseia também na medida de produtos dessas reações.

2.8.1 Lipoperoxidação

Lesão a lipídios ocorre em três etapas, iniciação, propagação e terminação. O processo se inicia com o ataque de um radical livre, subtraindo um hidrogênio e formando um radical carbono. O lipídio se reorganiza após esse ataque inicial e forma um radical peroxil (ROO^{\bullet}). A partir desse ponto, passa para a fase de propagação, porque o ROO^{\bullet} é altamente reagente e passa a retirar hidrogênio de outras moléculas. As novas moléculas lesadas passam pelo mesmo processo de reorganização, formando novos radicais ROO^{\bullet} , criando uma reação em cadeia e perpetuando a lesão (4). Outros radicais livres também podem ser formados a partir do dano lipídico, como o peróxido lipídico (ROOH) e o radical alcoxil (ROH^{\bullet}) (4). A fase de terminação ocorre com o final dessa reação em cadeia que pode acontecer por diversos motivos como a neutralização por antioxidantes, formação de produtos não-radicalares e consumo das moléculas reagentes (4). Um dos produtos finais da lipoperoxidação mais importantes para a quantificação do dano é o malondialdeído (MDA). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com o MDA e produz um produto estável que pode ser quantificado (35) através da técnica que mede substâncias reativas ao TBA (TBARS).

2.8.2 Oxidação de proteínas

As proteínas são os alvos mais comuns dos radicais livres, principalmente por serem muito abundantes e por serem responsáveis pelos processos funcionais das células (35). As proteínas podem ser danificadas de diversas maneiras como pelo ataque direto de uma ERO ou de outros radicais produzidos em reações oxidativas, como o MDA. Os processos oxidativos são muito variados devido a grande diferença na conformação de cada proteína e isso leva a diferentes produtos finais de dano oxidativo. Tanto EROs quanto ENRs podem atacar proteínas, sendo que o óxido nítrico, superóxido e peróxido de hidrogênio lesam frequentemente os grupos tióis (grupos-SH) (4). Produtos proteicos não reagem com moléculas antioxidantes, tornando sua degradação mais difícil pois necessitam de outros mecanismos mais complexos como o proteossoma-ubiquitina ou lisossomos. A quantificação de dano proteico é feita principalmente através da medida de grupos carbonila que se formam após a fragmentação proteica e a oxidação de resíduos de aminoácidos (4, 35). Outra maneira de avaliar o dano proteico é através da “advanced oxidation

protein products” (AOPP) que indica a extensão do dano oxidativo em proteínas, especialmente albumina (41).

2.8.3 Oxidação de DNA

Dentre os EROs, o radical hidroxila é o que mais causa danos ao DNA. Tem capacidade de lesar diretamente as bases e secundariamente provocar falhas no reparo, transcrição, replicação e descondensamento da cromatina (42). Para quantificar o dano, usa-se um dos produtos do estresse oxidativo, o 8-hidroxi-20-deoxiguano (8-OH-dG), uma molécula mutagênica e carcinogênica (4, 35).

2.8.4 IMA

A albumina modificada pela isquemia (IMA) é um marcador inicialmente identificado em eventos isquêmicos. Tecidos sujeitos à hipóxia sofrem dano por estresse oxidativo que acabam modificando a região N-terminal da albumina. A isquemia induz cascatas inflamatórias que produzem EROs. É observado, no entanto, que os níveis de IMA estão elevados em diversas outras condições que aumentam o estado inflamatório e o estresse oxidativo, como doenças reumatológicas, autoimunes e neoplásicas. Seus níveis dependem da albumina sérica e podem variar dependendo do estado nutricional do paciente (43).

2.9 Estresse oxidativo, ferro e doença de Parkinson

A fisiopatologia da doença de Parkinson não é compreendida em toda sua complexidade. No entanto, muito já se sabe sobre os mecanismos envolvidos na perda de neurônios, principalmente dos neurônios dopaminérgicos que causam os sintomas mais conhecidos da doença. Há envolvimento mitocondrial, dano por estresse oxidativo, excitotoxicidade e inflamação. Fatores genéticos e ambientais estão presentes na origem da doença, sendo o envelhecimento o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson.

Não se sabe qual o fator inicial do ciclo de dano na doença de Parkinson. Provavelmente, há uma interação genético-ambiental que serve de gatilho. Já foram descritos diversos genes que causam Parkinson tanto de maneira autossômica dominante quanto recessiva. Imagina-se que há um fator ambiental inicial que, aproveitando-se de uma predisposição genética, faz um primeiro dano celular e que,

a partir daí, se inicia o processo de desenvolvimento da DP. Já se conhecem toxinas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e o rotenone que desenvolvem parkinsonismo em modelos animais. Essas substâncias lesam diretamente o complexo I mitocondrial de neurônios dopaminérgicos, causando um mal funcionamento dessa organela. A partir desse ponto, com uma mitocôndria malfuncionante, aumenta-se a produção de EROs e conseqüentemente o dano oxidativo celular. O MPTP também danifica o transportador de monoamina vesicular (VMAT), aumentando a concentração de dopamina citoplasmática (26).

Esses radicais, quando afetam a proteína α -sinucleína, provocam uma alteração na sua conformação que a impede de ser degradada pelo sistema ubiquitina-proteossoma. A proteína se acumula e forma agregados sendo o principal componente dos corpúsculos de Lewy, principal marcador patológico da DP. Além disso, a α -sinucleína não degradada é exocitada possivelmente para impedir mais dano intracelular, mas acaba provocando uma reação inflamatória no ambiente extracelular, levando o organismo a produzir mais radicais livres (29). A α -sinucleína oxidada pode lesar diretamente a mitocôndria aumentando também dessa maneira a produção de EROs e a concentração de dopamina citoplasmática, ou pode ainda causar a fragmentação da mitocôndria levando a morte celular por diminuição do aporte energético feito pela cadeia respiratória (29). A dopamina, quando fora das vesículas intracelulares, é degradada tanto por auto-oxidação quanto pela enzima MAO-B. Das duas maneiras, há produção de peróxido de hidrogênio que na presença de ferro participa da reação de Fenton e produz mais radicais livres intracelulares.

O dano oxidativo na DP é seletivo para alguns grupos celulares no início da doença. Os neurônios dopaminérgicos são foco importante, embora não sejam os únicos a serem danificados. Os neurônios dopaminérgicos apresentam algumas características que os tornam alvos preferenciais do estresse oxidativo. Apresentam grande quantidade de dopamina que, além da produção de radicais livres na sua degradação também produz quinonas ou semiquinonas na sua auto-oxidação. Essas moléculas reagem com grupos proteicos nos sítios ativos que acabam modificando a estrutura da proteína, causando inativação e perda de função que podem resultar em morte celular (26). Há, ainda, acúmulo de ferro nesses neurônios

por alteração da homeostase do ferro, defeitos lisossomais ou pelo envelhecimento já que são células pós-mitóticas (26).

Lisossomos são responsáveis pela liberação do ferro ligado à ferritina e neuromelanina, principais locais de armazenamento em células gliais e neurônios respectivamente (1). Sendo assim, lisossomos tem grande quantidade de ferro que aumentam com a idade devido à incapacidade dessas células de eliminar esse elemento. Alto conteúdo de ferro na organela a torna mais suscetível a dano oxidativo. Peróxido de hidrogênio produzido na mitocôndria pode se difundir até o lisossomo e reagir com o ferro via reação de Fenton, danificando a membrana da organela. Isso causa liberação de enzimas lisossomais e de ferro no citosol, levando a morte celular e consequente reação inflamatória. A perda de função lisossomal - seja por dano oxidativo direto, seja por ação de α -sinucleína oxidada - diminui a autofagia e renovação de organelas defeituosas como mitocôndrias com alteração de membrana. O acúmulo de mitocôndrias defeituosas leva a um déficit energético e consequente morte celular (17).

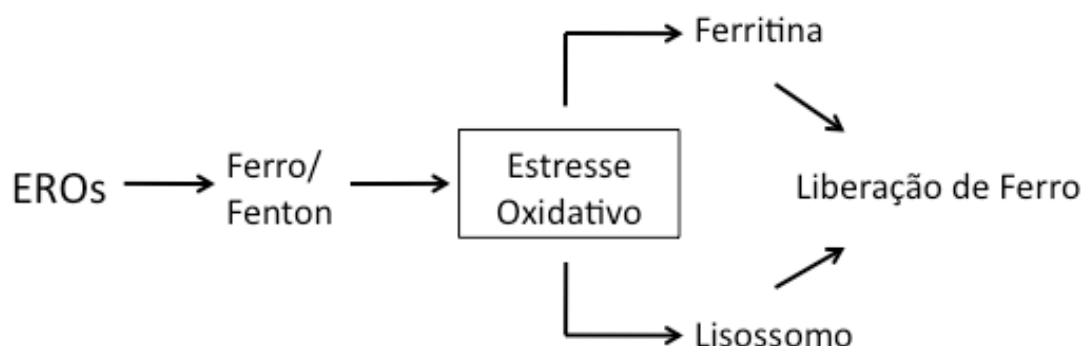


Figura 4. Liberação de ferro por estresse oxidativo. Ferro participa da produção de radicais livres através da reação de Fenton e, devido ao seu armazenamento na ferritina e lisossomos, tem como resultado seu nível intracelular aumentado pelo dano oxidativo.

Neurônios dopaminérgicos têm outra característica que os torna alvos preferenciais do estresse oxidativo. Essas células apresentam uma atividade marca-passo em que há influxo de cálcio. O excesso de cálcio ativa vias envolvidas em degradação de proteínas, fosfolipídios e DNA que ainda podem gerar EROs (26).

A entrada de cálcio nesse processo de marca-passo tem um custo metabólico para a célula dependente da produção de ATP. Com isso, há um aumento na demanda mitocondrial que pode elevar o número de EROs e o estresse oxidativo (44). Os canais de cálcio tipo L que controlam a entrada via marca-passo são encontrados em grande número nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, diferentemente dos neurônios da área tegmental ventral (VTA), por exemplo, que também são afetadas na DP, mas em menor grau (44). Além disso, a entrada de cálcio leva à ativação das enzimas nNOS que produzem NO e podem não apenas causar dano diretamente, como reagir com outras EROs e formar peroxinitrito (25, 45).

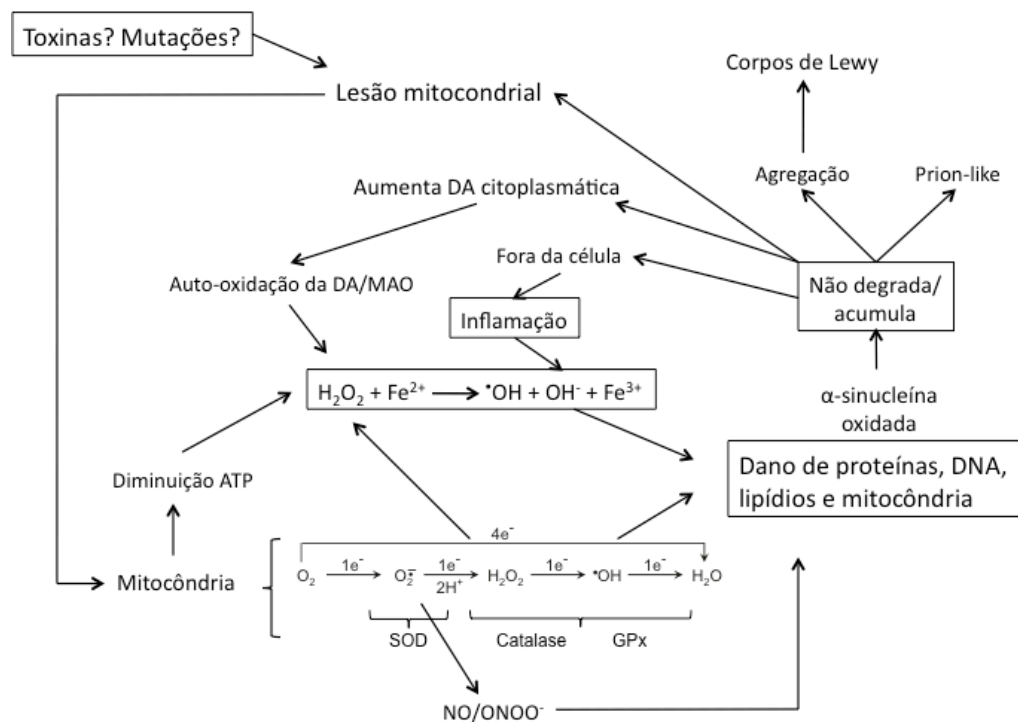


Figura 5. Ciclo de lesão oxidativa e produção de radicais livres na fisiopatologia da doença de Parkinson idiopática. Provável início com exposição toxinas ambientais associadas a predisposição genética.

Os genes causadores de DP familiar incluem SNCA, Parkina, PINK1, LRRK2 e DJ-1. Os genes Parkina e PINK1 estão diretamente ligados a marcação de mitocôndrias danificadas que devem ser transportadas para lisossomos onde iniciarão processo de mitofagia. Mutações nesses genes causam a permanência dessas mitocôndrias levando a déficit energético e possível maior produção de

EROs (46). Parkina ainda tem ação no sistema ubiquitina-proteossoma e sua deficiência impede a degradação adequada de α -sinucleína, colaborando com sua agregação (14). O gene DJ-1 está ligado ao “turnover” da mitocôndria, mas também apresenta uma função antioxidante, protegendo proteínas em resposta ao estresse (47). Gene SNCA está diretamente ligado a proteína α -sinucleína e as diversas mutações encontradas causam seu acúmulo, principal achado da DP. Está envolvida na patogênese por causar inflamação, lesão mitocondrial e aumento de dopamina citoplasmática (29) e propagando-se, possivelmente, de forma priônica. (48). Gene LRRK2 pode estar também envolvido no *turnover* mitocondrial além de diminuir capacidade de resistência ao estresse oxidativo de neurônios dopaminérgicos (49).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Analisar a associação entre os níveis séricos de ferro, ferritina, transferrina e medidas de estresse oxidativo em pacientes com DP comparado com indivíduos sem DP.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever as características da população em estudo com relação à idade, sexo, tabagismo, índice de massa corporal (IMC) e estado nutricional;

- Determinar o estado nutricional de pacientes com DP e associá-lo aos níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina, comparando com pacientes sem DP;

- Verificar as médias dos níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina nos pacientes com DP, comparando com pacientes sem DP;

- Verificar a associação entre os níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina e as manifestações clínicas de pacientes com DP.

- Verificar a associação dos níveis séricos da atividade das enzimas envolvidas na remoção de radicais livres, como Mn- e Cu/Zn-SOD, catalase, ecto-5'-nucleotidase e ADA, assim como, a atividade das enzimas em indivíduos saudáveis e pacientes com DP. Avaliar a associação entre os níveis séricos de marcadores não-enzimáticos de estresse oxidativo, como a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), AOPP, NO, NTPDase (ATP), NTPDase (ADP), mieloperoxidase e dosagem de vitamina C e FRAP entre pacientes saudáveis e com DP.

4. Referências bibliográficas

1. Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Amit T. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:52-64.
2. Batista-Nascimento L, Pimentel C, Menezes RA, Rodrigues-Pousada C. Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:128647.
3. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013;1(1):244-57.
4. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:93-136.
5. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(6):525-35.
6. Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(1):75-86.
7. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MC, Guerra HL, Lima-Costa MF, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). *Mov Disord.* 2006;21(6):800-8.
8. Kieburtz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord.* 2013;28(1):8-13.
9. Kamel F. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science.* 2013;341(6147):722-3.
10. Agarwal PA, Stoessl AJ. Biomarkers for trials of neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(1):71-85.
11. Mochizuki H, Yasuda T. Iron accumulation in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2012;119(12):1511-4.
12. He Y, Thong PS, Lee T, Leong SK, Mao BY, Dong F, et al. Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(5):540-7.

13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
14. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:132-44.
15. Reid WG, Hely MA, Morris JG, Loy C, Halliday GM. Dementia in Parkinson's disease: a 20-year neuropsychological study (Sydney Multicentre Study). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(9):1033-7.
16. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:41-58.
17. Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(8):888-98.
18. Hider RC, Kong X. Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton Trans*. 2013;42(9):3220-9.
19. Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*. 1994;35(1):38-44.
20. Berg D. In vivo detection of iron and neuromelanin by transcranial sonography--a new approach for early detection of substantia nigra damage. *J Neural Transm*. 2006;113(6):775-80.
21. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):863-73.
22. Gałazka-Friedman J, Bauminger ER, Friedman A, Barcikowska M, Hechel D, Nowik I. Iron in parkinsonian and control substantia nigra--a Mössbauer spectroscopy study. *Mov Disord*. 1996;11(1):8-16.
23. Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(1):1-16.
24. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(3):125-30.
25. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(7):643-50.
26. Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease--resemblance to

the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(9):1791-806.

27. Nakazato T, Sagawa M, Yamato K, Xian M, Yamamoto T, Suematsu M, et al. Myeloperoxidase is a key regulator of oxidative stress mediated apoptosis in myeloid leukemic cells. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5436-45.

28. Anatoliotakis N, Deffereos S, Bouras G, Giannopoulos G, Tsounis D, Angelidis C, et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(2):115-38.

29. Schildknecht S, Gerding HR, Karreman C, Drescher M, Lashuel HA, Outeiro TF, et al. Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies. *J Neurochem.* 2013;125(4):491-511.

30. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol.* 2010;257(1):24-30.

31. Mahajan M, Tiwari N, Sharma R, Kaur S, Singh N. Oxidative stress and its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28(1):51-4.

32. Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G, et al. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: Relation with clinical and demographic characteristics. *Clin Biochem.* 2014.

33. Medina-Navarro R, Durán-Reyes G, Díaz-Flores M, Vilar-Rojas C. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. *PLoS One.* 2010;5(1):e8971.

34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

35. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006;52(4):601-23.

36. Chemicals WHOTGoEHCoPfMD-RftRAo. Principles for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.

37. Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, et al. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis.* 2013;59:100-10.
38. Vinish M, Anand A, Prabhakar S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(2):165-9.
39. Kouti L, Noroozian M, Akhondzadeh S, Abdollahi M, Javadi MR, Faramarzi MA, et al. Nitric oxide and peroxynitrite serum levels in Parkinson's disease: correlation of oxidative stress and the severity of the disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(7):964-70.
40. Desai V, Prasad NR, Manohar SM, Sachan A, Narasimha SR, Bitla AR. Oxidative stress in non-obese women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(7):CC01-3.
41. Sreeja S, Geetha R, Priyadarshini E, Bhavani K, Anuradha CV. Substitution of soy protein for casein prevents oxidative modification and inflammatory response induced in rats fed high fructose diet. *ISRN Inflamm.* 2014;2014:641096.
42. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1102-15.
43. Ellidag HY, Bulbuller N, Eren E, Abusoglu S, Akgol E, Cetiner M, et al. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? *Gut Liver.* 2013;7(6):675-80.
44. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature.* 2010;468(7324):696-700.
45. Trippier PC, Jansen Labby K, Hawker DD, Mataka JJ, Silverman RB. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers. *J Med Chem.* 2013;56(8):3121-47.
46. Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(1):24-30.
47. Raman AV, Chou VP, Atienza-Duyanen J, Di Monte DA, Bellinger FP, Manning-Boğ AB. Evidence of oxidative stress in young and aged DJ-1-deficient mice. *FEBS Lett.* 2013;587(10):1562-70.

48. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord.* 2013;28(1):31-40.
49. Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord.* 2013;28(1):14-23.

5. Manuscrito – versão preliminar

IRON AND OXIDATIVE STRESS IN PARKINSON'S DISEASE: IN SEARCH OF INJURY BIOMARKERS

Márcio Medeiros¹, Michele Fighera², Artur Schuh³, Carlos Roberto de Mello Rieder^{1,3}

1- Post Graduation Programe in Medicine: Medical Sciences – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2- Neurology Department – Hospital Universitário de Santa Maria

3- Neurology Department - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Abstract

Background: Parkinson's disease (PD) pathophysiology is associated with oxidative/nitrosative stress damage. Iron accumulates in the substantia nigra (SN) of PD patients and is related to this damage along with oxygen and nitrogen reactive species (ROS, RNS) through Fenton reaction. ROS and RNS are normally produced in cell and inflammatory processes, controlled by antioxidant systems.

Objective: To determine peripheral levels of iron, ferritin and transferrin in PD patients to evaluate whether iron accumulation in the SN could be related to serum levels. To determine reliable peripheral biomarkers of oxidative/nitrative stress.

Methods: Forty PD patients and 46 controls were selected to compared serum levels of iron, ferritin, transferrin and oxidative/nitrative stress biomarkers: superoxide dismutase (SOD), catalase, nitric oxide (NOx), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), non-protein thiols, advanced oxidation protein products (AOPP), ferric reducing ability of plasma (FRAP), NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA), myeloperoxidase, ischemic-modified albumin (IMA) and vitamin C.

Results: Iron levels were decreased in patients with PD, while ferritin and transferrin were not different. Oxidative stress biomarkers, TBARS, AOPP, NTPDases, IMA, myeloperoxidase, FRAP, vitamin C and non-protein thiols were significantly higher in PD. SOD, catalase, ecto-5'-nucleotidase were not different between the groups and biomarkers NOx and ADA were significantly increased in the controls. No correlation was found between biomarkers and sociodemographic and disease data.

Conclusion: Plasmatic levels of iron are decreased in patients with PD compared to healthy controls. Biomarkers TBARS, AOPP, NTPDases, IMA and myeloperoxidase presented as reliable to measure oxidative/nitrative damage, while non-protein thiols, FRAP and vitamin C show a decrease in the antioxidant capacity in PD.

KEY WORDS: Parkinson's disease, iron, oxidative stress, nitrative stress, AOPP, FRAP, IMA, myeloperoxidase, SOD, catalase, NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, ADA, NOx, non-protein thiols, vitamin C, TBARS, biomarkers

1 Introduction

Iron is an important element in the human organism for its multiple vital roles including DNA synthesis, neurotransmission, myelination, oxygen transportation and storage, neurotransmitter production and redox activity (1). Iron reacts with oxygen species through Fenton reaction and participates in the oxidative stress process (2). Iron reacts with hydrogen peroxide (H_2O_2), from the normal respiratory chain process, and forms the hydroxyl radical (OH^\cdot), a highly reactive substance (2, 3).

These reactive oxygen species (ROS), when exceeding the organism's antioxidative capacity, are responsible for harming different molecules such as lipids, proteins and DNA, altering their conformations, causing loss of function and aggregation (4, 5).

There is a complex antioxidative system with different enzymes – superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxide (GPx) – and non-enzymatic antioxidants – glutathione, vitamin C and vitamin E – that balance the oxygen and nitrogen reactive species (RNS) produced in the body (5). However, when ROS and RNS are excessive and/or the antioxidative capacity is low, oxidative stress takes place (6).

Oxidative stress is present in the normal aging process and is increased in different age-related diseases, like Parkinson's disease (PD). In PD, oxidative stress comes from mitochondrial defects and from a chronic inflammatory process both producing ROS and RNS. These substances meet the accumulated iron in the brain and harm structures that can lead to the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. This process creates a cycle of cell damage and ROS and RNS production. Previous studies suggest that altered iron homeostasis might be involved in the disease pathogenesis, finding lower levels of serum iron in individuals who develop the disease (7, 8). Also, the results on peripheral levels of SOD, catalase and GPx are controversial and are not reliable to measure oxidative stress on PD (9). Other oxidative stress markers are also being studied, like advanced oxidation protein products (AOPP), ferric reducing ability of plasma (FRAP), ATP and ADP NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA), myeloperoxidase,

ischemic-modified albumin (IMA), nitric oxide (NO), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), vitamin C and non-protein thiols.

These different biomarkers have not been tested in PD and might be useful in the study of its pathogenesis. Understanding iron homeostasis and its relation with oxidative stress and finding reliable oxidative stress markers that relate to the neurodegenerative process is of great importance when studying PD.

2 Methods

This study included 40 individuals with Parkinson's disease according to the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Research criteria (10). PD patients were selected from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) outpatient clinic and were invited as volunteers for the study. They were clinically diagnosed by a movement disorders specialist (MSM and AFSS) with the presence of at least two of the cardinal symptoms, i.e., tremors, muscular rigidity and bradykinesia. Atypical and secondary parkinsonisms were excluded from the study. Patients with chronic renal disease, liver disease, history of cancer, hematologic disease and possible chronic inflammatory diseases, after a laboratory screening with VSG and reactive protein C were excluded. Current smoking was also an exclusion criterion.

For the control group, 46 healthy individuals were selected from a group of volunteers in the city of Santa Maria so that age and sex were not different between the groups. The same criteria of chronic, inflammatory, neoplastic diseases and smoking were used. Written informed consent was obtained from all patients and controls according to the HCPA Ethics Committee.

Patients completed a form with sociodemographic information and a physical examination including weight and height to calculate body mass index (BMI) was performed. Blood samples were taken from all patients and control individuals. All individuals with PD answered a mini-nutritional questionnaire to exclude a possible deficit in nutrient ingestion. For the PD patients, the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) and Hoehn & Yahr (H&Y) were also performed.

Biochemical analyses were done at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) laboratory for all biochemical analysis. These included measures of iron

metabolism (iron, ferritin and transferrin levels), oxidative stress markers (SOD, CAT, TBARS, AOPP, ADA), nitrosative stress (NOx), inflammatory response markers (NTPDase ATP, NTPDase ADP, ecto-5'-nucleotidase, myeloperoxidase, IMA) and antioxidative activity (FRAP, vitamin C, glutathione).

2.1 Biochemical analysis

AOPP was assessed as previously described by Hanasand *et al.*, (11). For IMA, we used the technique described by Kaefer *et al.* (12). NOx was estimated according to Tatsch *et al.* (13), and FRAP was measured as described by Benzie *et al.* (14).

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentzsch *et al.* (15) Briefly, 0.2 ml of serum was added to the reaction mixture containing 1 ml of 1% ortho-phosphoric acid, 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid -TBA (final volume 2.0 ml) followed by 45 min heating at 95°C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nanomole MDA per milliliter of plasma.

Non-protein thiols were assayed in plasma and erythrocytes by the method of Ellman (16). Aliquots (0.1 ml) of plasma were added to a phosphate buffer 0.3 mol/l (0.85 ml), pH 7.4 and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 ml). Results were expressed as $\mu\text{mol/ml}$ of plasma.

The determination of CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow (17). This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 ml) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 ml in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/l. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient ($0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mole}$) and the results were expressed as picomoles per milligram protein.

SOD activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Mc Cord & Fridovich (18). In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50 % the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM).

Renal vitamin C analysis was determined by the modified method described by Jacques-Silva *et al.* (19) Proteins of kidney were precipitated in a cold 10% trichloroacetic acid (TCA) solution at a proportion of 1:1 (v/v) and submitted to centrifugation again. This supernatant was then used for analysis. An 300 μ L aliquot of sample in a final volume of 575 μ L of solution was incubated for 3 h at 37°C then 500 μ L H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and CuSO₄ (0.075 mg/mL). Vitamin C levels are expressed as μ g ascorbic acid/g tissue.

Protein was measured by the method of Bradford (20) using bovine serum albumin as standard.

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes *et al.* (21) with the following minor modifications. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood–citrate system was centrifuged at 160 \times g during 15 min. The PRP was centrifuged at 1400 \times g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

As described by Lunkes *et al.* (21), the NTPDase measure was performed in a medium containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μ L. The ecto-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described by Lunkes *et al.* to measure AMP hydrolysis.

However, the 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂ to perform the assay. The enzyme activities were expressed as nmol Pi released/min/mg of protein. Briefly, 20 microliters of the enzyme preparation were added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and AMP at a concentration final of 2 mM. The time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [36] using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition.

ADA activity determination was performed as described by Guisti and Galanti, which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Myeloperoxidase activity was measured in plasma from blood collected with EDTA and followed by centrifugation at 1800 x g for 10 min. The activity was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and H₂O₂. Briefly, 390 µL of 2.5 mM AAP and 20 mM phenol were placed in each tube, followed by 450 µL of 1.7 mM H₂O₂. In the presence of H₂O₂ as oxidizing agent, MPO catalyzed the oxidative coupling of phenol and AAP yielding a colored product, quinoneimine, with a maximum absorbance at 500 nM. The millimolar absorbance coefficient for the quinoneimine was determined to be $\Sigma = 14 \pm 0.1/\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, close to the previously reported values (22). The results were expressed in micromolar of quinoneimine produced at 30 min.

Statistical analysis was done comparing PD patients and controls using t test for normal variables and Mann-Whitney for non-parametric data.

3 Results

3.1 Patients

A total of 40 patients with PD were included from January 2012 to December 2012. The control group had 46 healthy individuals from a group of volunteers to match age and sex. Among the cases, 45% were men and 55% were women; the median age of cases was 65.95 years and median BMI was 25.82; median disease duration was 8.57 years. The distribution by age, sex and BMI was similar in controls. Individuals in the PD group had mini-nutritional forms with normal scores. Table 1 shows the sociodemographic data of our case-control analyses.

3.2 Iron level

Data on iron, ferritin and transferrin levels were collected from all 40 cases and 46 controls, Table 2. Iron levels were lower among cases compared to controls (71.68 μ g/dL vs. 82.50 μ g/dL, $p = 0.023$, Mann Whitney U test), but levels of ferritin and transferrin were not significantly different, 174.25ng/mL and 176.90ng/mL ($p = 0.57$) and 273.20mg/L and 253.80mg/L ($p = 0.065$) respectively.

3.3 Biomarkers

Analyses concerning oxidative stress markers showed significant differences comparing cases and controls, even though some samples were lost and not all individuals were analyzed. All results are described in Table 3. Biomarkers of oxidative damage were increased in the Parkinson's disease group. IMA, a marker of oxidative stress and inflammation was higher in PD patients (0.58 vs. 0.55, $p = 0.008$). The marker of protein damage AOPP had higher levels in cases compared to controls (65.6 vs. 45.6, $p < 0,001$). The lipid peroxidation marker (TBARS) was also higher in the PD group (11.72 vs 8.89, $p = 0.001$). Markers of inflammation and oxidative stress related to ATP and ADP were different between groups. NTPDase (ATP) and NTPDase (ADP) were significantly higher in the patients group (20.10 vs. 15.07, $p = 0.013$ and 23.79 vs. 14.69, $p < 0.001$, respectively), and ecto-5'-nucleotidase had higher levels but didn't reach significance (19.01 vs 13.76, $p = 0.1$). ADA was significantly different between the groups; however, levels were higher in

the controls (1.61 vs 2.81, $p = 0.049$). The enzyme myeloperoxidase was found higher in the PD individuals with significance (2.14 vs. 1.31, $p = 0.02$).

Among the antioxidants, the tendency was to find decreased levels in patients with PD compared to controls. FRAP which indicates antioxidant activity and was lower in PD individuals (587.5 vs. 895.5, $p < 0.001$), vitamin C was also significantly lower in patients (17.81 vs. 34.92, $p < 0.001$). Group –SH, which includes glutathione with antioxidant properties, had lower levels in the patients group compared to controls (0.91 vs 0.97, $p < 0.001$)

The more common oxidative stress markers SOD and catalase were not significantly different between the groups ($p = 0.221$ and $p = 0.403$ respectively). NOx, used as an estimation of NO, had significant results, although, they were higher in the control group (112.8 vs 196.5, $p = 0.004$).

No correlations were found of iron or any of the oxidative and antioxidative markers with duration of disease, the UPDRS and the H&Y scores.

4 Discussion

Iron, oxidative stress and inflammatory activity are involved in the pathophysiology of PD. Once neurodegeneration has started, this process depends on the production of free radicals, the accumulation of iron in the brain and chronic inflammation associated with cell damage and protein aggregation. The search of reliable biomarkers that better describe this process is important for a more comprehensive understanding of the disease. In this study, we found significant results concerning biomarkers that haven't been used in PD so far, such as AOPP, FRAP, NTPDase, IMA and myeloperoxidase.

In this study, we found a significant difference in blood concentration of iron comparing PD and healthy individuals. Iron levels were lower in the PD group; levels of ferritin and transferrin were not different. Controversial results concerning iron blood levels in PD patients have been found (7, 8, 23). Berg *et al.* showed a negative correlation between substantia nigra (SN) echogenicity, which reflects high iron content, and serum levels of iron in PD patients (24). A case-control study suggested an increase in the risk of PD in men with a history of multiple blood donations, thus

having a low level of iron storage (25). Pichler *et al.* found a protective effect for PD of higher levels of iron with a 3% ($p=0.001$) reduction of relative risk for every increase of 10mg/dL of serum iron (8).

A lower level of peripheral iron in these patients may reflect a disturbance in the control of iron homeostasis (1) and a possible restriction of iron intake during life (7). Although iron accumulates in the SN and therefore is considered a risk factor for the development of PD, a low level in the peripheral blood is also associated with an increased risk possibly because it may reduce the functioning of neuronal enzymes, for it is a cofactor of tyrosine hydroxylase, and has a role in the synthesis of neurotransmitters. Besides, low peripheral iron may decrease its ferritin storage in neurons and, as consequence, decrease the pool of iron that is available for neuronal enzymes. This alteration may lead to accumulation of free iron in the SN (8).

We did not find a significant difference in the levels of ferritin and transferrin, and little is known about their possible role in neurodegeneration. If a dysregulation in iron metabolism is important to disease progression, these proteins may be involved in the process. Previous studies already addressed this question (26, 27).

We found lower activity of SOD and catalase, although none were significant, in accordance with all the conflicting data presented in previous studies. Activity of SOD and catalase has results showing high as well as low levels in different studies (9, 28, 29). These enzymes have been used as peripheral biomarkers of oxidative stress, because they are the enzymatic antioxidants involved in the degradation of H_2O_2 into water (30). If the levels SOD and catalase could be considered reliable to describe oxidative stress, a lower activity of these enzymes, although not significant, might show that the antioxidative function of the cells is not working properly and could be directly involved with oxidative stress.

On the other hand, biomarkers of damage to lipids (TBARS) and to proteins (AOPP) showed significant elevations in PD. TBARS is used as a measure of oxidative stress in PD since its identification in the SN of these patients by Dexter *et al.* in 1989 (31). TBARS is associated with the degradation of lipids that participate in the lipoperoxidation process. In this process, an initial damage to a lipid, either by oxidative stress or by nitrosative stress (5), creates a lipid radical that continues to

harm different structures until it becomes stable again and ends the oxidative stress cycle. More recent studies confirmed damage to α -sinucleine by lipids in PD individuals (32). TBARS indicates oxidative stress in other neurodegenerative disorders such as Alzheimer and amyotrophic lateral sclerosis (28, 30, 32).

AOPP has been used to measure damage to proteins by oxidative stress in different neurological pathologies, such as multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and mitochondrial myopathies (33); however, there is none describing its elevation in PD. To our knowledge, this is the first report of AOPP in PD. Data presented in this study confirms TBARS as a reliable biomarker of oxidative/nitrosative stress in patients with PD, although not exclusive of this pathology, and adds an interesting tool, AOPP, to measure protein damage related to oxidative stress in PD.

Our data shows that biomarkers of oxidative stress associated with inflammation are significantly increased in PD patients. The enzymes NTPDase (ATP) and NTPDase (ADP) were higher in the patients, confirming an important inflammatory activity in the disease. These enzymes degrade ATP and ADP, which are elevated in pro-inflammatory conditions where they stimulate lymphocytes and cytokines. Previous studies have shown elevations in systemic diseases and in multiple sclerosis (34-36), but there are no data in neurodegenerative disorders even though inflammation is a known process in these diseases.

As expected, ecto-5'-nucleotidase was higher in patients as were the NTPDase enzymes, but the difference did not reach significance. The enzyme follows the degradation of ADP and acts on AMP. A bigger sample might solve this problem in a future study.

Myeloperoxidase was significantly increased in PD patients. The enzyme is present in inflammatory states and is important in the combat of infectious agents. It may also react with ROS and form strong free radicals such as hydroxyl radical and peroxynitrite (37, 38). It has been described in cardiovascular diseases (37), but there is no data in neurodegenerative disorders.

IMA had significantly elevated levels in PD patients. It was first described in cardiac ischemic events, modifying the N-terminal region of albumin. Later, studies

found increased levels of IMA in rheumatologic, autoimmune and neoplastic diseases (39), confirming its inflammation effect in different conditions. However, no studies were conducted in neurodegenerative disorders. IMA levels, though, depend on albumin, which was not measured in this study. No difference in albumin between the studied groups may be presumed, since patients had normal mini-nutritional scores and BMI did not differ between the groups.

Adenosine deaminase was the exception in this group of biomarkers, since it had significantly increased levels in the control group. This enzyme has already been studied in diseases with pro-inflammatory states, such as cancer, and was elevated in the disease group (40). ADA decreases the levels of adenosine, a known anti-inflammatory agent and could be a biomarker for neurodegeneration. The possibility of individuals with unknown cancer in the control group cannot be excluded and could explain this finding.

Our data found a significantly decreased level of NO_x in the PD group compared to controls. Nitrosative stress is a known cause of damage and several studies have already linked it to PD (9, 32, 41). A possible explanation for this finding might be that NO, although structurally a simple molecule, is difficult to measure due to a very short half-life. Nitrite and nitrate, the major stable metabolites of endogenous NO that are accessible for quantitative analysis, are the substances measured. Also, NO plays important roles in almost every biological system: acts as a messenger molecule mediating diverse functions including vasodilatation, platelet aggregation inhibition, neurotransmission, learning and memory formation, antimicrobial and antitumoral activities. The multiple functions of NO plus the impossibility of measuring the molecule itself might explain this apparent contradictory result. Furthermore, the NO_x values produced by the Griess method used in this study are less reliable than results given by other methods according to Tastch *et al.* (13).

The antioxidants vitamin C, FRAP and glutathione were all significantly decreased in the PD group compared to controls. Several previous studies show this change in the antioxidant activity in different diseases, even neurodegenerative disorders such as ALS (42-44). Vitamin C is a known non-enzymatic antioxidant and has been associated to PD previously (42). Our data confirms this idea, showing that

patients have either insufficient or defective vitamin C activity. Glutathione (GSH) is also a non-enzymatic antioxidant that has been linked to PD and other neurodegenerative disorders in previous studies (45, 46), and pathologic data confirms the low levels of GSH in the SN of patients (47).

FRAP estimates total antioxidant activity of plasma, which contains vitamin C, vitamin E, bilirubin and uric acid (48). Although it has been described in different neurological diseases always presenting a low level of activity in the disease group (33), to our knowledge, this is the first report of FRAP in PD.

The low levels of different serum antioxidants indicate a deficiency in this mechanism, creating an imbalanced environment where oxidants prevail and damage cellular structures. Whether this decreased antioxidant activity is primary or secondary in the neurodegenerative process remains to be elucidated. FRAP, vitamin C and GSH are reliable biomarkers to be used in future studies.

5 Conclusion

Iron is considered a risk factor for PD because it accumulates in the SN of patients. However, peripheral blood concentrations are decreased, as it was found in our study, indicating that the high content is not dependent of an iron overload. Instead, it probably comes from a dysregulation in iron homeostasis.

The data presented in this study supports the role of oxidative stress in the pathophysiology of PD, associated with damage to lipids and proteins. Inflammation is also a part of the disease process and our data shows for the first time different biomarkers that can be used to measure it in PD. NTPDase, myeloperoxidase, IMA and possibly ecto-5'-nucleotidase seem to be reliable markers of inflammation in PD.

Our study also confirms that FRAP can be a useful biomarker of antioxidant activity in PD, along with vitamin C and glutathione. The results corroborate the idea of low levels of antioxidants in neurodegenerative disorders, incapable of controlling free radical and ROS/RNS production.

Table 1. Sociodemographic information of patients with Parkinson's disease and controls.

	Parkinson's disease N = 40 Mean (\pm SD) N (%)	Control N = 40 Mean (\pm SD)	P
Age (years)	65.95 (\pm 12.3)	62.30 (\pm 10.17)	0.136 ^a
Male	18 (45)	19 (41)	0.73 ^b
BMI	24.44 (\pm 4.19)	25.82 (\pm 3.98)	0.12 ^a
Disease duration (years)	8.57 (\pm 5.91)	-	-

^aStudent's *t* test^bChi-square test

Table 2. Comparison of iron, ferritin and transferrin peripheral blood levels between patients with Parkinson's disease and controls

	Parkinson's disease N = 40 Mean (\pm SD)	Control N = 46 Mean (\pm SD)	P
Iron	71.68 (\pm 24.3)	82.50 (\pm 27.7)	0.023*
Ferritin	174.25 (\pm 125.3)	176.90 (\pm 107.0)	0.57
Transferrin	273.20 (\pm 49.1)	253.80 (\pm 44.8)	0.065

* Significant in the Mann-Whitney *U* test

Table 3. Comparison of oxidative stress and antioxidant peripheral biomarkers between patients with Parkinson's disease and controls.

	Parkinson's disease Median (interquartile range)	Controls Median (interquartile range)	P
IMA	0.58 (0.51- 0.68)	0.55 (0.46-0.59)	0.008*
AOPP	65.6 (52.43-81.38)	45.6 (37.58-62.78)	< 0.001*
NOx	112.8 (77.55-160.93)	196.5 (99.9-256.0)	0.004*
FRAP	587.5 (516.5-696.8)	895.5 (825.3-989.3)	< 0.001*
SOD	6.25 (4.24-8.34)	6.63 (4.85-8.61)	0.221
Catalase	9.9 (8.73-13.60)	11.5 (8.8-13.9)	0.403
TBARS	11.72 (9.48-14.29)	8.89 (7.83-10.58)	0.001*
Group -SH	0.91 (0.60-0.95)	0.97 (0.94-1.04)	< 0.001*
Vitamin C	17.81 (8.70-35.52)	34.92 (24.75-52.43)	< 0.001*
NTPDase (ATP)	20.10 (13.58-25.18)	15.07 (9.80-18.97)	0.013*
NTPDase (ADP)	23.79 (18.33-33.73)	14.69 (10.11-18.75)	< 0.001*
Ecto-5'nucleotidase	19.01 (8.69-25.52)	13.76 (9.68-19.36)	0.1
ADA	1.61 (1.17-3.22)	2.81 (1.57-7.47)	0.049*
Myeloperoxidase	2.14 (1.28-3.05)	1.31 (1.07-2.50)	0.02*

*significant in the Mann-Whitney *U* test

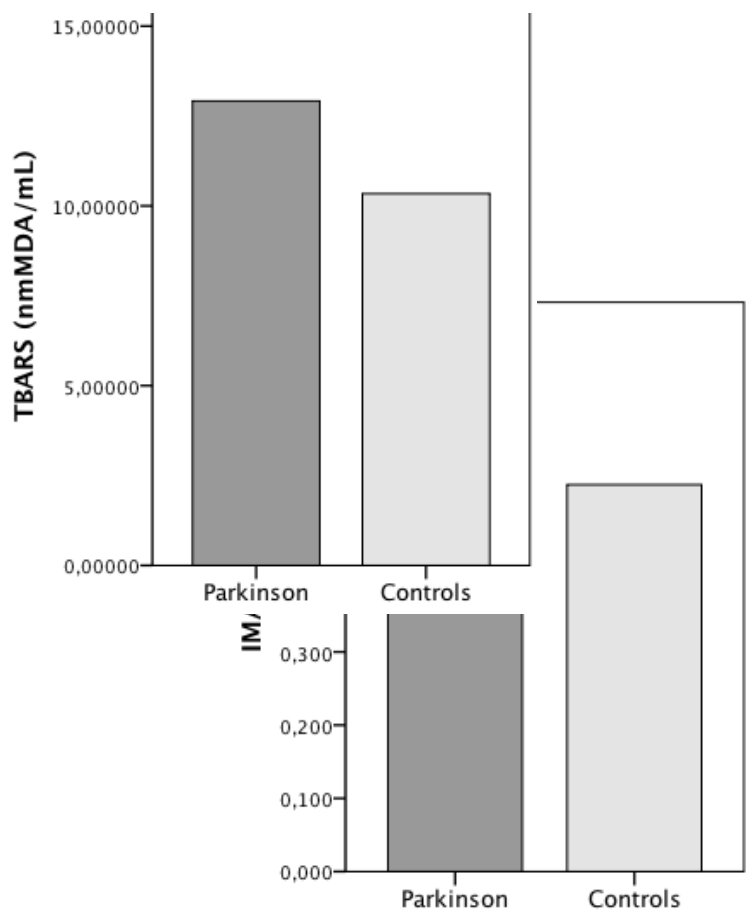


Figure 1. IMA levels in PD patients and controls

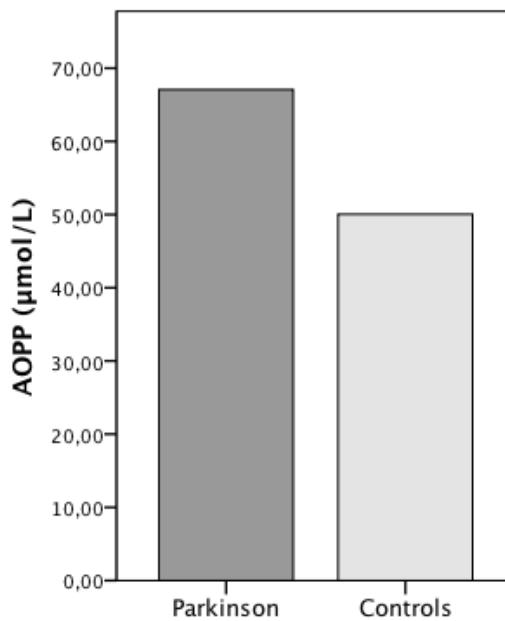


Figure 2. AOPP levels in PD patients and controls

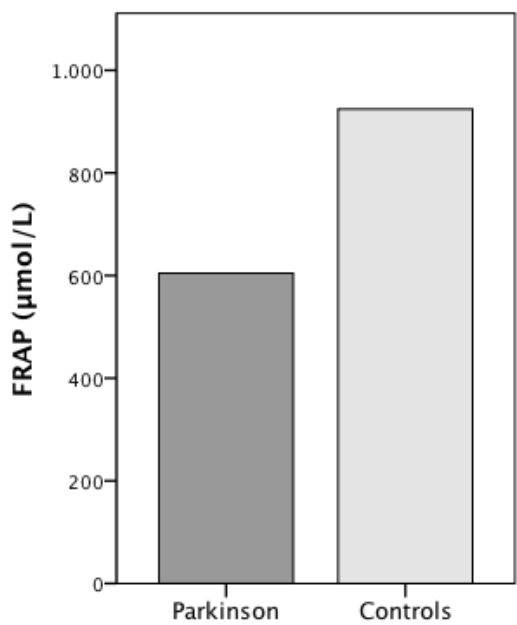


Figure 3. FRAP levels in PD patients and controls

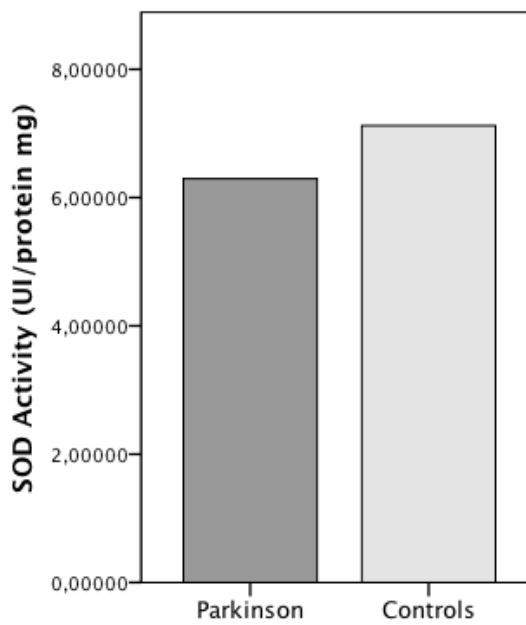


Figure 4. SOD levels in PD patients and controls

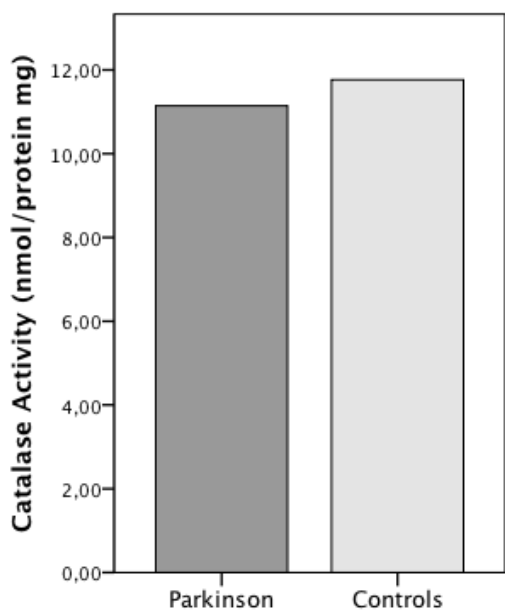


Figure 5. Catalase levels in PD patients and controls

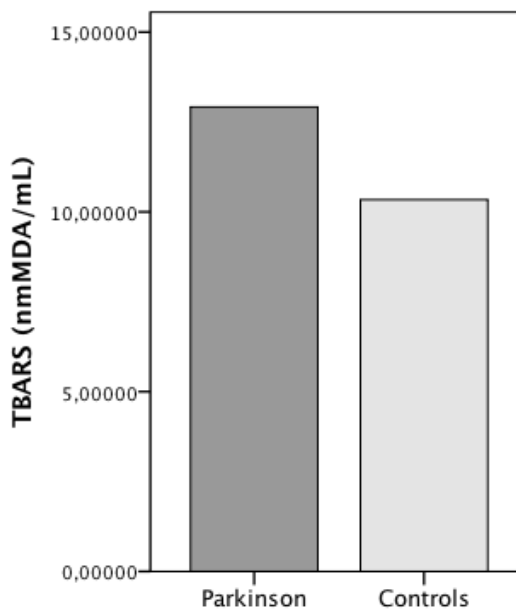


Figure 6. TBARS levels in PD patients and controls

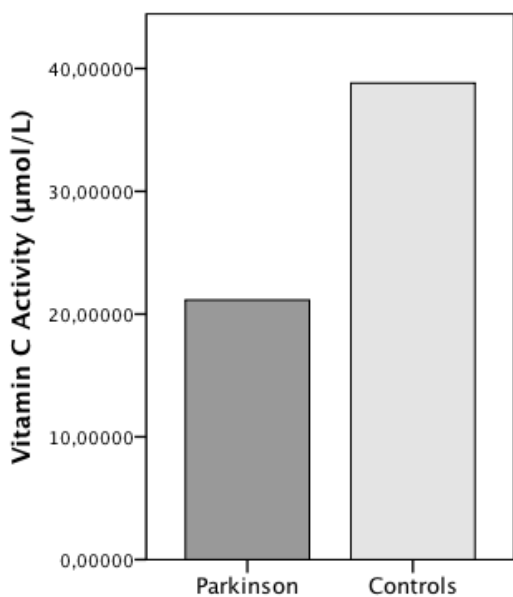


Figure 7. Vitamin C levels in PD patients and controls

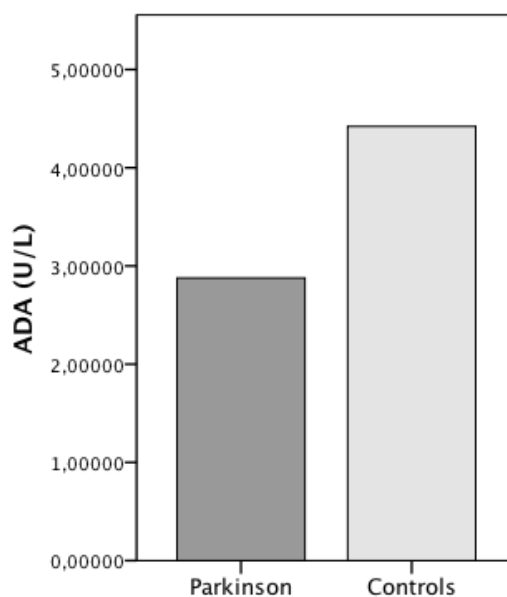


Figure 8. ADA levels in PD patients and controls

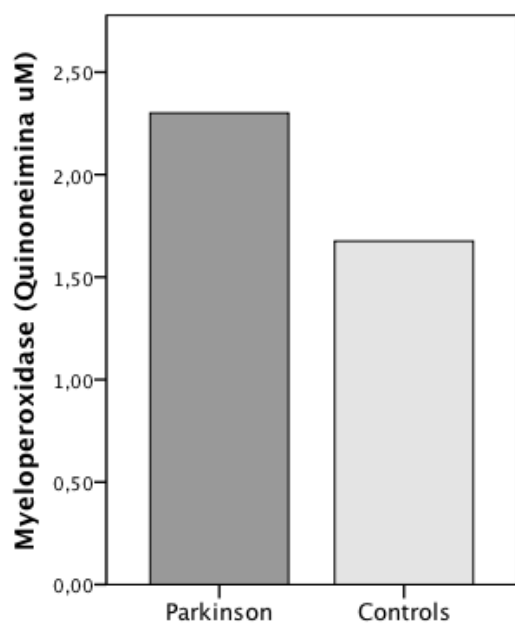


Figure 9. Myeloperoxidase levels in PD patients and controls

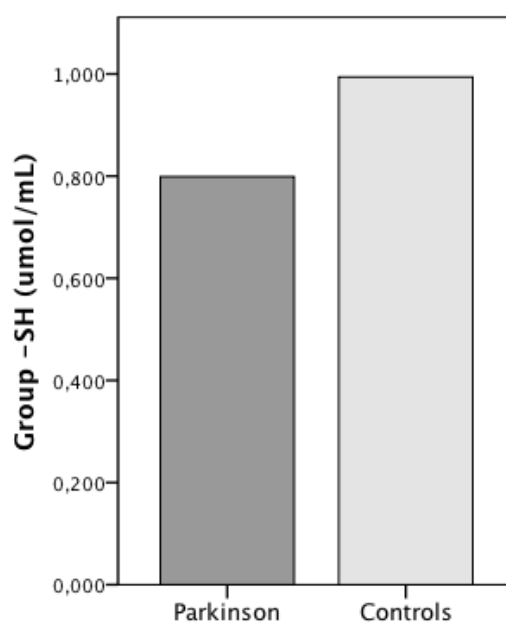


Figure 10. Group -SH levels in PD patients and controls

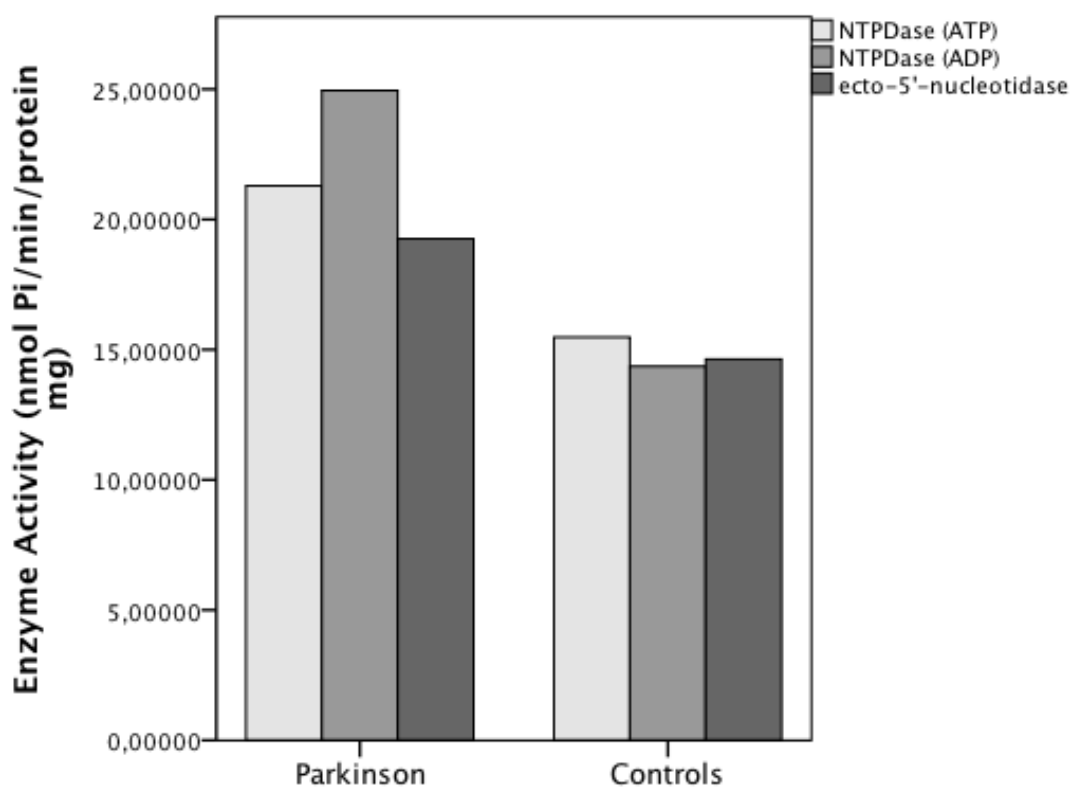


Figure 11. NTPDase (ATP and ADP) and ecto-5'-nucleotidase levels in PD patients and controls.

References

1. Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Amit T. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med.* 2013;62:52-64.
2. Batista-Nascimento L, Pimentel C, Menezes RA, Rodrigues-Pousada C. Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:128647.
3. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013;1(1):244-57.
4. Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(1):1-16.
5. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:93-136.
6. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):24438-75.
7. Savica R, Grossardt BR, Carlin JM, Icen M, Bower JH, Ahlskog JE, et al. Anemia or low hemoglobin levels preceding Parkinson disease: a case-control study. *Neurology.* 2009;73(17):1381-7.
8. Pichler I, Del Greco M F, Gögele M, Lill CM, Bertram L, Do CB, et al. Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: a Mendelian randomization study. *PLoS Med.* 2013;10(6):e1001462.
9. Vinish M, Anand A, Prabhakar S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(2):165-9.
10. Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology.* 1992;42(6):1142-6.
11. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta.* 2012;413(9-10):901-6.

12. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):450-4.
13. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RaS, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*. 2011;44(4):348-50.
14. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.
15. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):251-6.
16. ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
17. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*. 1972;49(2):474-8.
18. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.
19. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*. 2001;88(3):119-25.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
21. Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004;65(1):1-6.
22. Kayyali US, Moore TB, Randall JC, Richardson RJ. Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *J Anal Toxicol*. 1991;15(2):86-9.
23. Mariani S, Ventriglia M, Simonelli I, Donno S, Bucossi S, Vernieri F, et al. Fe and Cu do not differ in Parkinson's disease: a replication study plus meta-analysis. *Neurobiol Aging*. 2013;34(2):632-3.

24. Berg D, Roggendorf W, Schröder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol*. 2002;59(6):999-1005.
25. Logroscino G, Chen H, Wing A, Ascherio A. Blood donations, iron stores, and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21(6):835-8.
26. Madenci G, Bilen S, Arli B, Saka M, Ak F. Serum iron, vitamin B12 and folic acid levels in Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2012;37(7):1436-41.
27. Friedman A, Arosio P, Finazzi D, Kozirowski D, Galazka-Friedman J. Ferritin as an important player in neurodegeneration. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011;17(6):423-30.
28. Agarwal PA, Stoessl AJ. Biomarkers for trials of neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28(1):71-85.
29. Younes-Mhenni S, Frih-Ayed M, Kerkeni A, Bost M, Chazot G. Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2007;58(2):78-83.
30. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006;52(4):601-23.
31. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989;52(6):1830-6.
32. Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(10):1787-94.
33. Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G, et al. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: Relation with clinical and demographic characteristics. *Clin Biochem*. 2014.
34. Yoshida O, Kimura S, Jackson EK, Robson SC, Geller DA, Murase N, et al. CD39 expression by hepatic myeloid dendritic cells attenuates inflammation in liver transplant ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology*. 2013;58(6):2163-75.
35. Brisevac D, Bajic A, Bjelobaba I, Milosevic M, Stojiljkovic M, Beyer C, et al. Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro. *J Mol Neurosci*. 2013;51(3):871-9.

36. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol*. 2010;257(1):24-30.
37. Anatoliotakis N, Deftereos S, Bouras G, Giannopoulos G, Tsounis D, Angelidis C, et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(2):115-38.
38. Nakazato T, Sagawa M, Yamato K, Xian M, Yamamoto T, Suematsu M, et al. Myeloperoxidase is a key regulator of oxidative stress mediated apoptosis in myeloid leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18 Pt 1):5436-45.
39. Ellidag HY, Bulbuller N, Eren E, Abusoglu S, Akgol E, Cetiner M, et al. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? *Gut Liver*. 2013;7(6):675-80.
40. Mahajan M, Tiwari N, Sharma R, Kaur S, Singh N. Oxidative stress and its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(1):51-4.
41. Kouti L, Noroozian M, Akhondzadeh S, Abdollahi M, Javadi MR, Faramarzi MA, et al. Nitric oxide and peroxynitrite serum levels in Parkinson's disease: correlation of oxidative stress and the severity of the disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(7):964-70.
42. Sudha K, Rao AV, Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India*. 2003;51(1):60-2.
43. Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. *Biometals*. 2010;23(6):985-96.
44. Baser H, Can U, Baser S, Yerlikaya FH, Aslan U, Hidayetoglu BT. Assessment of oxidative status and its association with thyroid autoantibodies in patients with euthyroid autoimmune thyroiditis. *Endocrine*. 2014.
45. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000;62(6):649-71.
46. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*. 1994;36(3):348-55.

47. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
48. Desai V, Prasad NR, Manohar SM, Sachan A, Narasimha SR, Bitla AR. Oxidative stress in non-obese women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(7):CC01-3.

6. Considerações finais

O presente estudo de caso-controle dedicou-se a avaliação das relações do ferro e dos marcadores de estresse oxidativo com a doença de Parkinson. Ambos estão envolvidos de maneira interligada na fisiopatologia da doença, sendo de extrema importância para a compreensão do desenvolvimento da DP.

A coleta dos casos e dos controles foi realizada em diferentes locais, mas os grupos apresentaram médias de idade semelhantes e comparáveis. O controle dos resultados por idade é fundamental, visto que o envelhecimento pode estar diretamente relacionado com o estresse oxidativo (1). No entanto, é importante ressaltar, que essa teoria do envelhecimento através da ação de radicais livres é controversa e que diversos estudos em animais já demonstraram que há aumento de longevidade mesmo com níveis elevados de estresse oxidativo (2). Uma teoria mais recente sugere que os radicais livres tornam-se importantes no processo de envelhecimento somente quando em níveis suficientes para alterar a função sinalizadora dos EROs e ERNs, e não necessariamente por dano direto a estruturas celulares (3).

No presente estudo, não foi encontrada correlação entre a idade e nenhum dos marcadores de estresse oxidativo, tanto de dano, quanto de atividades enzimáticas.

6.1. Ferro e doença de Parkinson

Os resultados dos níveis séricos de ferro confirmam os achados dos estudos mais recentes, que encontraram níveis mais baixos de ferro em pacientes com DP (4-6). Apesar do acúmulo de ferro na substância negra, esses níveis séricos baixos podem indicar um erro na regulação da homeostasia do ferro, que resultam na sua má distribuição no organismo, e uma deficiência de adaptação às mudanças nos níveis de ferro. Essa alteração pode ocorrer de maneira precoce na vida do indivíduo como já foi sugerido por Savica *et al.* que identificou associação de anemia 20 a 29 anos antes do diagnóstico da doença em indivíduos com DP. Nesse estudo, o ferro sérico não medido e a anemia foi usada como marcador indireto de níveis diminuídos (4).

Outros estudos também corroboram a possibilidade de níveis séricos baixos de ferro serem um fator de risco para DP. Berg *et al.* mostraram correlação negativa entre ecogenicidade da SN, marcador de conteúdo elevado de ferro nos núcleos da base, e níveis séricos de ferro em pacientes com DP (7). Um estudo caso-controle sugeriu um aumento no risco de DP em homens com histórico de múltiplas doações de sangue e, portanto, com diminuição dos estoques de ferro (8). Pichler *et al.* mostrou um efeito protetor de níveis elevados de ferro para DP com 3% ($p=0,001$) de redução de risco relativo por aumento de 10mg/dl de ferro sérico (5).

Os mecanismos envolvidos no efeito protetor do ferro no risco para DP observado no estudo de Pichler não está claro, assim como o mecanismo que regula a relação entre ferro sérico e ferro cerebral. Níveis baixo de ferro periférico podem reduzir o funcionamento de enzimas neuronais ou receptores, já que o ferro é um co-fator crucial da tirosina hidroxilase (produção de dopamina), tem papel na síntese de neurotransmissores de monoamina e está envolvido no neurodesenvolvimento dopaminérgico. Além disso, baixos níveis de ferro sérico podem diminuir o armazenamento de ferro neuronal na forma de ferritina, que é inapropriadamente baixo na SN de pacientes com DP. Uma redução na ferritina poderia diminuir a utilização de ferro por diminuir o “pool” de ferro disponível para enzimas neuronais, levando ao acúmulo de ferro livre na SN (5).

A evidência da associação de níveis séricos de ferro com o risco de DP até o momento é controversa. O ferro é considerado um fator de risco para a doença de acordo com o fenômeno já estabelecido de acúmulo de ferro na SN de indivíduos com DP. Estudos epidemiológicos, no entanto, já mostraram efeitos do ferro em direções opostas. Uma metanálise recente de estudos epidemiológicos sugere um possível efeito protetor do ferro sérico no risco de desenvolver DP (9).

Interessante lembrar que o uso de tabaco, que já foi sugerido como fator protetor para DP, pode ser um confundidor na associação do ferro com a DP, visto que ambos podem ter um efeito sobre os níveis de ferro. A nicotina pode diminuir a disponibilidade de ferro livre reativo (5). Os dois grupos estudados aqui foram controlados para esse confundidor e, portanto, sem a interferência do tabagismo nos resultados. Da mesma maneira, os inibidores da MAO usados no tratamento da DP tem efeito quelante de ferro e podem, assim, reduzir os níveis de ferro, levando a

achados espúrios na comparação de indivíduos com DP e seus controles (5). No nosso grupo de casos de DP, não foram alocados pacientes em uso dessas medicações.

No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de liberação e regulação de ferro no SNC e o acúmulo de ferro dependente da idade e da região cerebral ainda devem ser esclarecidos. Estudo prévio sugere que este acúmulo possa ser resultado de alterações da vascularização cerebral que ocorre durante o processo de neurodegeneração (10). Enquanto outros sugerem uma alteração nos mecanismos de regulação do ferro podem levar a um aumento no “pool” de ferro livre reativo no cérebro (11, 12). A desregulação da homeostasia do ferro cerebral, por distúrbio das proteínas reguladoras de ferro (IRP), pode também induzir vulnerabilidade neuronal ao estresse oxidativo (10). Estudos anteriores demonstraram redução significativa ligação ferro-TfR e sítios de ligação Tf em pacientes com DP. Também foi mostrado que a inibição do sistema ubiquitina-proteossoma (U-P) endossa a desregulação do ferro por alterações no IRP2, TfR1 e ferritina; inversamente, a desregulação do ferro resultou em disfunção do sistema U-P, produção de EROs, agregação proteica e morte neuronal (10). Além disso, já foi observado aumento no níveis de DMT1 na SN de indivíduos com DP e em modelos animais da doença com MPTP e 6-OHDA, sugerindo, novamente, o envolvimento da homeostasia no acúmulo de ferro (10).

A partir do aumento da concentração de ferro na SN, ele participa no estresse oxidativo através da reação de Fenton. Além disso, há ligação direta do ferro com a própria α -sinucleína, levando ao dobramento anormal da proteína, possibilitando a agregação. Embora o sítio de ligação para o ferro ainda não tenha sido definido na α -sinucleína, estudos de espectroscopia determinaram a região C-terminal do Fe^{2+} como preferencial para a ligação (10). O ferro livre na SN, ao aumentar a agregação de α -sinucleína, promove a formação de corpúsculos de Lewy (5).

6.2. Marcadores de estresse oxidativo e doença de Parkinson

A comparação de marcadores de estresse oxidativo entre os grupos apresentou resultados interessantes de acordo com a literatura mais recente. Marcadores frequentemente utilizados em estudos similares, como a SOD e catalase não se mostraram significativamente diferentes entre casos e controles.

Estudos anteriores compararam esses marcadores com resultados diversos, ora mais elevados na DP, ora diminuídos (13, 14) ou sem alterações significativas (15). Resultados conflitantes podem ser atribuídos ao fato de os níveis de SOD e catalase serem vulneráveis a variáveis como envelhecimento, tabagismo, uso de medicações, exercício e câncer. Lembrando, ainda, que a própria SOD, ao oxidar Cu^{++} , produz a ERO H_2O_2 (16). Portanto, o fato de, neste estudo, não haver diferença estatisticamente significativa nas medidas dos marcadores SOD e catalase entre casos e controles, em convergência com os demais estudos, confirma que esses biomarcadores de estresse oxidativo podem não ser úteis como indicadores de atividade neurodegenerativa isoladamente.

As comparações envolvendo marcadores de estresse oxidativo alternativos trouxeram resultados significativos. A IMA está significativamente aumentada nos indivíduos com DP. Esse marcador, no entanto, para ser melhor avaliado, depende do nível sérico da albumina, que não foi coletado neste estudo. Entretanto, pode-se presumir albumina normal em ambos grupos, já que a avaliação nutricional não indicou alterações nutricionais no grupo DP e não houve diferença significativa no IMC entre os grupos. A IMA, usada inicialmente em casos de isquemia miocárdica, mostrou-se um marcador importante em doenças com componente inflamatório (17), evento presente na DP e gerador de dano por radicais livres.

Da mesma maneira, a AOPP também está significativamente aumentada nos casos de DP, em relação a controles. A AOPP, que indica dano oxidativo em proteínas, já foi testada como marcador de estresse oxidativo em doenças sistêmicas, estando aumentada em doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica dialítica e dislipidemia (18, 19). Não há relatos de AOPP em DP, embora já tenha sido usada como marcador de neurotoxicidade e em esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, miopatias mitocondriais e apneia obstrutiva do sono (20, 21). AOPP, ao avaliar a extensão das lesões por estresse oxidativo produzido a proteínas circulantes, parece ser um marcador confiável de dano a proteínas nas doenças degenerativas, incluindo a DP.

Níveis aumentados de do marcador de lesão de lipídios, TBARS, são encontrados em cérebros de pacientes com DP (22). O TBARS é usado como medida de estresse oxidativo na doença de Parkinson desde a sua identificação na

substância negra desses indivíduos no estudo de Dexter *et al.* em 1989 (23). Esse biomarcador indica a degradação de lipídios que contribuem para o ciclo de lipoperoxidação, estendendo o dano oxidativo através de uma reação em cadeia de radicais lipídicos (16). A lesão de lipídios pode ocorrer tanto por estresse oxidativo, iniciado por um radical hidroxila ou peróxido de hidrogênio, quanto por estresse nitrosativo (22), ambos presentes na DP.

Estudos anteriores confirmaram dano lipídico associado à α -sinucleína em exames *post mortem* de substância negra e lobo frontal de indivíduos com DP (15). Também há evidências de lipoperoxidação em pacientes com DP familiar relacionado ao gene da Parkina e PINK1 (15).

Os resultados encontrados no presente estudo mostram que o TBARS, como indicador de dano lipídico por estresse oxidativo/nitrosativo, parece ser um biomarcador periférico confiável na DP, apesar das limitações inerentes ao processo e a não especificidade do TBARS em indicar somente elevações relacionados com a lipoperoxidação (24).

A vitamina C teve seus níveis diminuídos nos casos de DP, da mesma maneira que o FRAP, indicando que a diminuição de antioxidantes seja importante no processo do estresse oxidativo. Os baixos níveis desses marcadores podem revelar uma deficiência no mecanismo antioxidante que possibilita o acúmulo de radicais livres e o dano oxidativo/nitrosativo na DP. Estudos anteriores, avaliando a resposta antioxidante em diversas doenças, mostram que há um déficit no controle do estresse oxidativo, e reforçam a ideia de que há uma alteração no equilíbrio de substâncias oxidantes e antioxidantes (20, 25, 26). Há evidências de alterações da vitamina C relacionada com a DP (25), no entanto, não existe na literatura dados sobre níveis de FRAP em DP. Níveis diminuídos de FRAP associados a estresse oxidativo já foram descritos em diversas doenças como neoplasias, hipertensão, ovários policísticos, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, miopatias e apneia obstrutiva do sono (21, 27, 28).

Ainda entre os antioxidantes analisados, os dados do grupamento -SH também foram significativamente diferentes, com níveis maiores nos controles. Esse grupo dos tióis não-proteicos com ação antioxidante tem como principal componente

a GSH. A atividade antioxidante da glutatona já foi estudada no sistema nervoso central (29), e já foi descrita nas doenças neurodegenerativas (30). Diversos estudos usam o grupo do tióis como marcador de atividade antioxidante juntamente com o FRAP (21, 31). A depleção de tióis intracelulares, principalmente a redução do níveis de glutatona na substância negra, foi descrita precocemente no curso da doença de Parkinson (32) que, juntamente com o acúmulo de ferro e deficiências mitocondriais, facilita a produção e o dano dos radicais livres.

Os dados da vitamina C, FRAP e grupamento –SH não-proteicos, juntos, fornecem uma medida confiável da resposta antioxidante na doença de Parkinson. Como o FRAP avalia antioxidantes plasmáticos que incluem a vitamina C, torna-se necessária somente a coleta do grupo tiol não-proteico associado ao FRAP para se ter dados suficientes para avaliar níveis antioxidantes na DP.

Os resultados das enzimas NTPDase que atuam sobre ATP e ADP foram significativos e mostraram aumento das suas concentrações nos casos de DP. São marcadores de estresse oxidativo relacionados com a via inflamatória e não haviam sido estudados em doenças neurodegenerativas. Estudos anteriores em doenças sistêmicas apresentam elevação de ATP e ADP e da atividade das NTPDase associados a estados pró-inflamatórios (33, 34). Um estudo anterior demonstrou esse mesmo aumento de atividade enzimática na esclerose múltipla (35). Independente de a inflamação ser o evento inicial ou somente surgir secundariamente na DP, é considerada parte importante da fisiopatologia da doença (36).

Até o momento, substâncias como as interleucinas não mostraram resultados significativos para serem considerados marcadores na DP (14) e as NTPDase surgem como possibilidade para preencher essa lacuna. Os resultados aqui apresentados sugerem que as NTPDases (ATP e ADP) possam ser usadas como biomarcadores de dano associado à inflamação na DP.

Ainda na via do ATP, a atividade da ecto-5'-nucleotidase, que atua na transformação de AMP em adenosina, apresentou elevação nos casos com DP, porém de forma não significativa. Essa tendência ao aumento vai de acordo com os resultados das NTPDases na via de degradação do ATP. Já os níveis de ADA foram

significativamente diferentes entre casos e controles, apresentando níveis maiores nos controles que nos casos. O ADA diminui os níveis de adenosina, que é conhecida como uma substância neuroprotetora. Esse dado vai contra os resultados encontrados na literatura, que mostram níveis elevados de ADA em doenças relacionadas ao estresse oxidativo (37). Deve-se levar em conta, ao avaliar a ADA, a impossibilidade de descartar doenças neoplásicas não diagnosticadas nos controles, que poderia modificar os resultados. Dessa maneira, sugere-se realizar novos estudos para avaliar os níveis de ADA em doenças neurodegenerativas.

A mieloperoxidase mostrou-se significativamente elevada e corrobora a hipótese inflamatória da fisiopatologia da DP. A MPO já foi sugerida como biomarcador de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares (38). Ainda não há relatos de MPO em doenças neurodegenerativas e, embora não seja específica para a DP, pode ser usada como marcador de estresse oxidativo associado a um estado inflamatório.

O estresse nitrosativo na doença de Parkinson já é conhecido e foi descrito por diversos autores (15, 22, 39, 40). Esses estudos mediram óxido nítrico e peroxinitrito, ambos envolvidos na teoria do estresse nitrosativo da DP. Kouti *et al.* identificou níveis elevados desses radicais livres e ainda correlacionou positivamente com a UPDRS, indicando que quanto maior o nível dos radicais, mais sintomas apresentavam os pacientes (39). Vinish *et al.* também estudou níveis de NO em pacientes com DP, porém, apesar de estar elevado nos indivíduos com DP, a diferença não foi significativa (13). O resultado dos níveis de óxido nítrico no presente estudo diferiram significativamente entre casos e controles. No entanto, os níveis mais elevados foram encontrados nos controles. Essa variação muito grande de resultados pode ocorrer devido ao número pequeno de indivíduos estudados ou devido a falta de especificidade do NO como marcador de estresse nitrosativo. O NO tem diversas funções no organismo: é vasodilatador, sinalizador, neurotransmissor e regulador imune (41). Essa gama de funções pode, também, ser uma explicação para essa inespecificidade do NO e para a variação dos resultados. Além disso, o NO foi medido a partir de seus dois metabólitos estáveis, nitrato e nitrito, pelo método de Griess. De acordo com Tastch *et al.*, apesar de ser de fácil execução, esse método apresenta resultados menos confiáveis que outros já conhecidos (42).

A teoria de que do estresse oxidativo e nitrosativo gera um ciclo de dano com produção de EROs e ERNs e agregação de α -sinucleína, independente do fator desencadeante, leva a suposição de que quanto mais tempo de doença, maior serão os níveis de marcadores de lesão e de estresse oxidativo. Na tentativa de testar essa hipótese, Kouti *et al.* correlacionou NO e ONOO⁻ com a pontuação da UPDRS e com tempo de doença, encontrando associações positivas nas duas situações (39). No estudo atual, tempo de doença e a escala da UPDRS foram testadas para correlação com todos os marcadores tanto de estresse oxidativo quanto nitrosativo e nenhuma associação significativa foi encontrada. Todos as substâncias estudadas são encontradas normalmente no organismo e nenhuma é específica como marcador de doenças. Mesmo a glutathiona, que já foi correlacionada com a progressão e a gravidade da DP em outro estudo (43), não apresentou significância. Dessa maneira, mesmo que em níveis elevados, não são capazes de descrever adequadamente o processo e a progressão de doenças neurodegenerativas, pelo menos se medidas apenas periféricamente.

Também é possível que essa falta de correlação dos marcadores de estresse oxidativo e, especialmente, da atividade dos antioxidantes com o tempo de doença e sua gravidade se deva ao fato de eles podem não só estar associados a fisiopatologia da DP, como também podem ser fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença.

O estresse oxidativo e nitrosativo está relacionado com a doença de Parkinson e, em um dado momento, participa da sua fisiopatologia. Está também envolvido no processo de envelhecimento, um fator de risco para a DP. Além disso, alguns resultados são contraditórios, ora mostrando níveis elevados, confirmando o papel do estresse oxidativo, ora sem alterações significativas. Uma possível explicação seria a existência de uma alteração mais ampla no organismo em que houvesse não apenas erros mitocondriais gerando radicais livres, mas também erros em outros processos celulares como transcrição e produção de proteínas, produzindo substâncias imperfeitas e causando dano. Dessa maneira, o estresse oxidativo segue sendo a principal fonte de dano celular, sem ser, no entanto, a única (44).

6.3. Limitações

O presente estudo apresenta algumas limitações. Os controles voluntários não responderam ao questionário nutricional e nenhum dos envolvidos na pesquisa foi avaliado devidamente quanto a quantidade de nutrientes e de ferro que foi ingerido no período das coletas de material sanguíneo. Acredito que se esses dados estivessem disponíveis no momento das análises, teríamos um controle melhor dos níveis de ferro, ferritina e transferrina séricas. A dosagem de albumina sérica traria um poder maior para a definição da IMA como marcador de estresse oxidativo na DP. Há, também, a impossibilidade de controle adequado para todos os fatores que influenciam os níveis de estresse oxidativo e que podem alterar os resultados. Uma triagem para doenças neoplásicas, por exemplo, seria importante. No entanto, podemos considerar que esse viés está diminuído pela possibilidade de haver indivíduos com neoplasias tanto no grupo controle, quanto no grupo DP. Talvez um número maior de coletas resolva esse viés de maneira mais adequada.

6.4. Conclusão

O ferro tem participação ativa na doença de Parkinson e encontra-se acumulado na substância negra desses indivíduos. Os resultados apresentados aqui confirmam os dados mais recentes, que descrevem uma diminuição dos níveis de ferro no sangue periférico de pacientes com DP quando comparados a controles. Com isto, o presente estudo corrobora que níveis baixos de ferro sérico podem estar associados a um maior risco de DP, por uma disfunção na homeostasia do ferro nesses indivíduos.

O estresse oxidativo está relacionado a doença de Parkinson e, embora não esteja claro como nem por quê se inicia, apresenta um papel importante na fisiopatologia da doença. A descrição adequada para o estudo desse mecanismo passa pelo uso de biomarcadores que reproduzam o que ocorre no sistema nervoso central de maneira confiável.

O estudo atual confirma a presença de dano oxidativo em pacientes com DP comparados com controles através de marcadores já conhecidos na literatura, mas vai além e apresenta marcadores ainda não descritos na DP. O marcador de lesão proteica AOPP, os marcadores de atividade inflamatória NTPDase e mieloperoxidase e o antioxidante FRAP mostraram-se alterados significativamente e

parecem ser mais confiáveis que as enzimas mais conhecidas como a SOD e a catalase para quantificar o estresse oxidativo na doença de Parkinson.

6.5. Referências

1. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan*. 2014;3:6.
2. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol*. 2010;45(6):410-8.
3. Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(8):779-87.
4. Savica R, Grossardt BR, Carlin JM, Icen M, Bower JH, Ahlskog JE, et al. Anemia or low hemoglobin levels preceding Parkinson disease: a case-control study. *Neurology*. 2009;73(17):1381-7.
5. Pichler I, Del Greco M F, Gögele M, Lill CM, Bertram L, Do CB, et al. Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: a Mendelian randomization study. *PLoS Med*. 2013;10(6):e1001462.
6. Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Dietary intake of metals and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *J Neurol Sci*. 2011;306(1-2):98-102.
7. Berg D, Roggendorf W, Schröder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol*. 2002;59(6):999-1005.
8. Logroscino G, Chen H, Wing A, Ascherio A. Blood donations, iron stores, and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21(6):835-8.
9. Mariani S, Ventriglia M, Simonelli I, Donno S, Bucossi S, Vernieri F, et al. Fe and Cu do not differ in Parkinson's disease: a replication study plus meta-analysis. *Neurobiol Aging*. 2013;34(2):632-3.
10. Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Amit T. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:52-64.
11. Mochizuki H, Yasuda T. Iron accumulation in Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2012;119(12):1511-4.

12. Batista-Nascimento L, Pimentel C, Menezes RA, Rodrigues-Pousada C. Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:128647.
13. Vinish M, Anand A, Prabhakar S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(2):165-9.
14. Agarwal PA, Stoessl AJ. Biomarkers for trials of neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28(1):71-85.
15. Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(10):1787-94.
16. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1(1):244-57.
17. Ellidag HY, Bulbuller N, Eren E, Abusoglu S, Akgol E, Cetiner M, et al. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? *Gut Liver*. 2013;7(6):675-80.
18. ben Anes A, Fetoui H, Bchir S, ben Nasr H, Chahdoura H, Chabchoub E, et al. Increased oxidative stress and altered levels of nitric oxide and peroxynitrite in tunisian patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlation with disease severity and airflow obstruction. *Biol Trace Elem Res*. 2014;161(1):20-31.
19. Wu G, Cheserek MJ, Shi Y, Liu J, Wang L, Le G. [Comparison of serum lipid and protein oxidation products levels in patients with different types of dyslipidemia]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2014;43(4):529-34.
20. Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. *Biometals*. 2010;23(6):985-96.
21. Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, LoGerfo A, Iudice A, Siciliano G, et al. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: Relation with clinical and demographic characteristics. *Clin Biochem*. 2014.
22. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(7):643-50.
23. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1989;52(6):1830-6.

24. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006;52(4):601-23.
25. Sudha K, Rao AV, Rao S, Rao A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India*. 2003;51(1):60-2.
26. Baser H, Can U, Baser S, Yerlikaya FH, Aslan U, Hidayetoglu BT. Assessment of oxidative status and its association with thyroid autoantibodies in patients with euthyroid autoimmune thyroiditis. *Endocrine*. 2014.
27. Kurlak LO, Green A, Loughna P, Broughton Pipkin F. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. *Front Physiol*. 2014;5:310.
28. Desai V, Prasad NR, Manohar SM, Sachan A, Narasimha SR, Bitla AR. Oxidative stress in non-obese women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(7):CC01-3.
29. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000;62(6):649-71.
30. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*. 1994;36(3):348-55.
31. Siciliano G, Piazza S, Carlesi C, Del Corona A, Franzini M, Pompella A, et al. Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2007;254(5):575-80.
32. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
33. Yoshida O, Kimura S, Jackson EK, Robson SC, Geller DA, Murase N, et al. CD39 expression by hepatic myeloid dendritic cells attenuates inflammation in liver transplant ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology*. 2013;58(6):2163-75.
34. Brisevac D, Bajic A, Bjelobaba I, Milosevic M, Stojiljkovic M, Beyer C, et al. Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro. *J Mol Neurosci*. 2013;51(3):871-9.
35. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol*. 2010;257(1):24-30.

36. Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28(1):24-30.
37. Mahajan M, Tiwari N, Sharma R, Kaur S, Singh N. Oxidative stress and its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(1):51-4.
38. Anatoliotakis N, Deftereos S, Bouras G, Giannopoulos G, Tsounis D, Angelidis C, et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(2):115-38.
39. Kouti L, Noroozian M, Akhondzadeh S, Abdollahi M, Javadi MR, Faramarzi MA, et al. Nitric oxide and peroxynitrite serum levels in Parkinson's disease: correlation of oxidative stress and the severity of the disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(7):964-70.
40. Knott AB, Bossy-Wetzl E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(3):541-54.
41. Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(1):1-16.
42. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RaS, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*. 2011;44(4):348-50.
43. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1037-48.
44. Gladyshev VN. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(4):727-31.

7. Apêndices

7.1. Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (pacientes DP)

Título da pesquisa: Associação do Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com Doença de Parkinson

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo investigar a ingestão de ferro e demais nutrientes envolvidos em sua absorção e os níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina em pacientes com Doença de Parkinson. Este estudo está sendo realizado pela equipe médica do ambulatório de neurologia do HCPA, tendo como pesquisador responsável o Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder (Neurologista/Especialista em Distúrbio de Movimento- HCPA).

O meio que vamos usar para realizar este trabalho se dá através de um questionário com perguntas referentes à avaliação antropométrica (peso, altura, perda de peso), avaliação geral (estilo de vida, uso de medicamentos), e avaliação dietética (número de refeições, ingestão de alimentos) e auto-avaliação (percepção da saúde e do estado nutricional). Será realizada a medição do seu peso, altura, circunferência do braço e da panturrilha. Será necessário ainda que você, um familiar ou cuidador preencha um registro alimentar durante três dias, relatando tudo o que foi consumido neste período, e suas respectivas quantidades. Será agendada uma segunda avaliação, quando você deverá entregar os registros alimentares. Neste dia, você será submetido a uma coleta de sangue, para posterior determinação dos seus níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina, através de análise laboratorial.

Salientamos que os procedimentos serão simples e que não haverá risco adicional com a execução dos procedimentos citados. A participação nesse estudo é voluntária e você poderá desistir de participar em qualquer momento, sem que isto cause qualquer prejuízo ao seu tratamento.

Os resultados desta pesquisa serão utilizados apenas para fins científicos e seu nome será mantido no mais rigoroso sigilo.

O benefício que você poderá ter será de conhecer, após a conclusão da pesquisa, dados sobre o tema estudado e que poderão ajudá-lo a conhecer melhor sobre sua alimentação e quanto aos cuidados necessários a sua saúde.

Ressaltamos que a concordância em participar deste estudo não implica em qualquer modificação no seu tratamento, nem tampouco os resultados destes exames terão efeitos sobre você. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (pacientes DP)
Título da pesquisa: Associação do Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com Doença de Parkinson

Eu,fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do procedimento que será realizado e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar.

A equipe médica do ambulatório de Distúrbio do Movimento - HCPA certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face à estas informações.

Fui informado que caso existirem danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso ligar para o ambulatório de Distúrbio do Movimento - HCPA, pelo telefone (51) xxxx xxxx.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Compromisso.

Assinatura do Paciente	Nome	Data
------------------------	------	------

Assinatura do Pesquisador	Nome	Data
---------------------------	------	------

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ____/____/____ (data) pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha	Nome	Data
--------------------------	------	------

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (controles)

Título da pesquisa: Associação do Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com Doença de Parkinson

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo investigar a ingestão de ferro e demais nutrientes envolvidos em sua absorção e os níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina em pacientes com Doença de Parkinson. Este estudo está sendo realizado pela equipe médica do ambulatório de neurologia do HCPA, tendo como pesquisador responsável o Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder (Neurologista/Especialista em Distúrbio de Movimento- HCPA).

O meio que vamos usar para realizar este trabalho se dá através de um questionário com perguntas referentes à avaliação antropométrica (peso, altura, perda de peso), avaliação geral (estilo de vida, uso de medicamentos), e avaliação dietética (número de refeições, ingestão de alimentos) e auto-avaliação (percepção da saúde e do estado nutricional). Será realizada a medição do seu peso, altura, circunferência do braço e da panturrilha. Será necessário ainda que você, um familiar ou cuidador preencha um registro alimentar durante três dias, relatando tudo o que foi consumido neste período, e suas respectivas quantidades. Será agendada uma segunda avaliação, quando você deverá entregar os registros alimentares. Neste dia, você será submetido a uma coleta de sangue, para posterior determinação dos seus níveis séricos de ferro, ferritina e transferrina, através de análise laboratorial.

Salientamos que os procedimentos serão simples e que não haverá risco adicional com a execução dos procedimentos citados. A participação nesse estudo é voluntária e você poderá desistir de participar em qualquer momento, sem que isto cause qualquer prejuízo ao tratamento do paciente com DP.

Os resultados desta pesquisa serão utilizados apenas para fins científicos e seu nome será mantido no mais rigoroso sigilo.

O benefício que você poderá ter será de conhecer, após a conclusão da pesquisa, dados sobre o tema estudado e que poderão ajudar a conhecer melhor sobre a sua alimentação.

Ressaltamos que a concordância em participar deste estudo não implica em qualquer intervenção medicamentosa, nem tampouco os resultados destes exames terão efeitos sobre você. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá causar nenhum constrangimento com a equipe médica ou alguma interferência no tratamento do paciente com DP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (controles)

Título da pesquisa: Associação do Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com Doença de Parkinson

Eu,fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do procedimento que será realizado e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar.

A equipe médica do ambulatório de Distúrbio do Movimento - HCPA certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face à estas informações.

Fui informado que caso existirem danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso ligar para o ambulatório de Distúrbio do Movimento - HCPA, pelo telefone (51) xxxx xxxx.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Compromisso.

_____	_____	_____
Assinatura do Paciente	Nome	Data

_____	_____	_____
Assinatura do Pesquisador	Nome	Data

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ____/____/____ (data) pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Nome	Data

7.2. Ficha de avaliação pacientes/controles**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS**

Data: ___/___/___
Dados Gerais
Nome:
Sexo: Data Nascimento: ___/___/___ Idade: Telefone:
Nível de Escolaridade:
Tabagismo: 1- não 2 - sim
Dados Clínicos
Outras Doenças:
Tempo de Diagnóstico da DP:
Características Clínicas da DP:
Medicações em Uso:
Hábito Intestinal: 1- constipado 2-normal 3- diarreia
Apetite: 1- diminuído 2 - normal 3 - aumentado

8. Anexos

8.1. Avaliação nutricional

Mini Avaliação Nutricional®

Nome: _____ Sexo: _____ Data: _____

Data Nascimento: _____ Idade: _____ Peso (kg): _____ Altura (cm): _____

Preencher a primeira parte deste questionário, indicando a resposta. Somar os pontos da Triagem. Caso o escore seja igual ou inferior a 11, concluir o questionário para obter a avaliação do estado nutricional.

TRIAGEM
<p>A Nos últimos três meses houve diminuição da ingestão alimentar devido à perda de apetite, problemas digestivos ou dificuldade para mastigar ou deglutir? 0 = diminuição severa da ingestão 1 = diminuição moderada da ingestão 2 = sem diminuição da ingestão</p>
<p>B Perda de peso nos últimos meses 0 = superior a três quilos 1 = não sabe informar 2 = entre um e três quilos 3 = sem perda de peso</p>
<p>C Mobilidade 0 = restrito ao leito ou à cadeira de rodas 1 = deambula, mas não é capaz de sair de casa 2 = normal</p>
<p>D Passou por algum estresse psicológico ou doença aguda nos últimos três meses? 0 = sim 2 = não</p>
<p>E Problemas neuropsicológicos 0 = demência ou depressão graves 1 = demência leve 2 = sem problemas psicológicos</p>
<p>F Índice de massa corpórea (IMC = peso [kg] / estatura [m]²) 0 = IMC < 19 1 = 19 ≤ IMC < 21 2 = 21 ≤ IMC < 23 3 = IMC ≥ 23</p>
<p>Escore de triagem (subtotal, Max de 14 pontos) 12 pontos ou mais - normal; desnecessário continuar a avaliação 11 pontos ou menos - possibilidade de desnutrição; continuar a avaliação</p>

AVALIAÇÃO GLOBAL

G O paciente vive em sua própria casa (não em casa geriátrica ou hospital)
 0 = não 1 = sim

H Utiliza mais de três medicamentos diferentes por dia?
 0 = sim 1 = não

I Lesões de pele ou escaras?
 0 = sim 1 = não

J Quantas refeições faz por dia?
 0 = uma refeição 1 = duas refeições 2 = três refeições

K O paciente consome:

- pelo menos uma porção diária de leite ou derivados (queijo, iogurte)? sim não
 - duas ou mais porções semanais de legumes ou ovos? Sim não
 - carne, peixe ou aves todos os dias? sim não
- 0,0 = nenhuma ou uma resposta «sim»
 0,5 = duas respostas «sim»
 1,0 = três respostas «sim»

L O paciente consome duas ou mais porções diárias de frutas ou vegetais?
 0 = não 1 = sim

M Quantos copos de líquidos (água, suco, café, chá, leite) o paciente consome por dia?
 0,0 = menos de três copos
 0,5 = três a cinco copos
 1,0 = mais de cinco copos

N Modo de se alimentar
 0 = não é capaz de se alimentar sozinho
 1 = alimenta-se sozinho, porém com dificuldade
 2 = alimenta-se sozinho sem dificuldade

O O paciente acredita ter algum problema nutricional?
 0 = acredita estar desnutrido
 1 = não sabe dizer
 2 = acredita não ter problema nutricional

P Em comparação a outras pessoas da mesma idade, como o paciente considera a sua própria saúde?
 0,0 = não muito boa
 0,5 = não sabe informar
 1,0 = boa
 2,0 = melhor

Q Circunferência do braço (CB) em cm
 0,0 = CB < 21
 0,5 = 21 ≤ CB ≤ 22
 1,0 = CB > 22

R Circunferência da panturrilha (CP) em cm
 0 = CP < 31 1 = CP ≥ 31

Avaliação global (máximo 16 pontos)
Escore da triagem
Escore total (máximo 30 pontos)

Ref.: Guigoz Y, Vellas B and Garry PJ. 1994. Mini Nutritional Assessment: A practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. Facts and Research in Gerontology. Supplement # 2:15-59. Rubenstein LZ, Harker J, Guigoz Y and Vellas B. comprehensive Geriatric Assessment (CGA) and the MNA: An Overview of CGA, Nutritional Assessment, and Development of a Shortened Version of the MNA. In: "Mini Nutritional Assessment (MNA): Research and Practice in the Elderly". Vellas B, Garry PJ and Guigoz Y, editors. Nestlé Nutrition Workshop Series. Clinical & Performance Programme, vol. 1. Karger, Bâle, in press. ©1998 Société des Produits Nestlé S.A., Vevey, Switzerland, Trademark Owners

Avaliação do Estado Nutricional

de 17 a 23,5 pontos - risco de desnutrição

8.2. UPDRS

I. Cognição, Comportamento e Humor

1. Prejuízo Intelectual

0. Nenhum

1. Leve. Consistente perda de memória, com lembrança parcial dos eventos e sem outras dificuldades.

2. Moderada perda de memória, com desorientação e dificuldade moderada para resolver problemas complexos. Leve mas definitivo prejuízo na realização das tarefas domésticas, necessitando ajuda ocasionalmente.

3. Perda severa de memória com desorientação no tempo e freqüentemente no espaço. Total prejuízo na resolução de problemas.

4. Total perda de memória com orientação preservada somente para pessoa. Incapaz de realizar julgamentos ou solucionar problemas. Necessita muito auxílio nos cuidados pessoais. Não pode sair sem acompanhante.

2. Alteração do Pensamento

0. Não

1. Sonhos vívidos / sonhando acordado

2. Alucinações "benignas" com "insight" / discernimento retido.

3. Alucinações ou ilusões ocasionais ou freqüentes, sem "insight", podendo interferir com as atividades diárias.

4. Alucinações persistentes, ilusões ou psicoses elaboradas. Inabilidade para cuidar de si mesmo.

3. Depressão

0. Ausente

1. Períodos de tristeza ou culpa maior que o normal, nunca persiste por dias ou semanas.

2. Depressão persistente (uma semana ou mais)

3. Depressão persistente com sintomas vegetativos (insônia, anorexia, perda de peso e perda de interesse)

4. Depressão persistente com sintomas vegetativos e pensamentos suicidas.

4. Motivação/ Iniciativa

0. Normal

1. Perda do interesse maior que o usual; mais passivo.

2. Perda da iniciativa ou desinteresse em atividades eletivas (fora da rotina).
 3. Perda de iniciativa ou desinteresse em atividades do dia-a-dia (rotineiras).
 4. Retraído/ Isolacionismo, completa perda da motivação.
-

II. Atividades da vida diária

5. Fala

0. Normal.
1. Levemente afetada. Sendo compreendido sem dificuldade.
2. Moderadamente afetada. Às vezes pedindo para repetir as declarações para que sejam compreendidas.
3. Severamente afetada. Frequentemente pedindo para repetir as declarações para que sejam compreendidas.
4. Ininteligíveis na maior parte do tempo.

6. Salivação

0. Normal
1. Leve mas definido excesso de saliva na língua; podendo "babar" durante o sono
2. Moderado excesso de saliva; podendo "babar" um pouco.
3. Marcado excesso de saliva com alguma "baba".
4. "Babando" muito, necessitando constantemente de lenço ou toalha.

7. Ao engolir

0. Normalmente
1. Se afogando raramente.
2. Ocasionalmente se afogando.
3. Necessitando alimento macios.
4. Necessitando de Sonda NG ou Gastrostomia para alimentar-se.

8. Caligrafia

0. Normal
1. Um pouco vagarosa e caligrafia reduzida de tamanho.
2. Moderadamente lenta com caligrafia reduzida de tamanho, todas as palavras são legíveis.
3. Severamente afetada; nem todas as palavras são legíveis.

4. A maioria das palavras não são legíveis.

9. Ao cortar alimentos e manusear utensílios

0. Normal

1. Um tanto quanto vagaroso ou desajeitado, mas sem necessitar de auxílio.
2. Pode cortar a maior parte da comida, de modo vagaroso e desajeitado; algumas vezes necessitando de auxílio.
3. Comida tem que ser cortada por alguém, mas pode alimentar-se lentamente.
4. Necessita ser alimentado.

10. Ao trocar de roupa

0. Normalmente

1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Ocasionalmente auxiliado com botões, coloca os braços nas mangas.
3. Muita necessidade de auxílio, podendo fazer algumas coisas sozinho.
4. Necessita ser vestido.

11. Higiene pessoal

0. Normal.

1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Necessita auxílio para tomar banho; ou muito vagaroso nos cuidados de higiene.
3. Requer ajuda para escovar os dentes, tomar banho, pentear os cabelos, indo ao banheiro.
4. Cateter de Foley ou outros auxílios mecânicos.

12. Ao trocar de posição na cama e arrumar os lençóis

0. Normal.

1. Um tanto quanto vagaroso, mas sem necessitar de auxílio.
2. Vira-se na cama e ajusta os lençóis sozinho, mas tem grande dificuldade
3. É capaz de iniciar a tentar, mas não se vira ou ajusta os lençóis sozinho.
4. Não consegue executar, realizado por outra pessoa.

13. Quedas [não relacionadas ao "congelamento"]

0. Nunca.

1. Raramente tem quedas.

2. Ocasionalmente cai, menos de uma vez por dia.
3. Quedas cerca de uma vez por dia.
4. Quedas mais que uma vez por dia.

14. "Congelamento" quando caminha

0. Nunca.
1. Raramente ocorre "congelamento" quando caminha; pode ter hesitação inicial.
2. Ocasionalmente ocorre "congelamento" quando caminha.
3. Freqüentemente ocorre "congelamento". Ocasionalmente cai por "congelamento"
4. Freqüentemente cai por "congelamento".

15. Marcha

0. Normal.
1. Dificuldade leve. Pode não balançar os braços ou pode tender a arrastar as pernas (marcha arrastada).
2. Dificuldade moderada, mas requer pouca ou nenhuma assistência
3. Distúrbio severo da marcha, necessitando de auxílio.
4. Não pode caminhar, mesmo com auxílio.

16. Tremor

0. Ausente.
1. Leve e raramente presente
2. Moderado; aborrecendo o paciente.
3. Severo; interferindo com muitas atividades.
4. Marcado; interferindo com a maioria das atividades.

17. Sintomas sensoriais relacionados ao Parkinsonismo

0. Ausente.
 1. As vezes tem amortecimentos, formigamentos, ou dor leve
 2. Freqüentemente tem amortecimentos, formigamento ou dor; sem produzir estresse.
 3. Freqüentemente tem sensações dolorosas.
 4. Dor excruciante.
-

III. Exame Motor

18. Fala

0. Normal.

1. Leve perda da expressão, dicção e/ou volume.
2. Monótona, inarticulada mas compreensível; moderadamente prejudicada.
3. Marcadamente prejudicada, difícil de compreender.
4. Ininteligível.

19. Expressão Facial

0. Normal.

1. Mínima hipomímia, podendo ser “face de pôquer”.
2. Leve mas definida diminuição anormal da expressão facial.
3. Moderada hipomímia; lábios separados algumas vezes.
4. Facies em máscara ou fixa com severa ou completa perda da expressão facial; lábios separados mais de 0.5 cm.

20. Tremor de repouso

0. Ausente.

1. Leve e raramente presente.
2. Leve em amplitude e persistente. Ou moderado na amplitude, mas somente intermitentemente presente.
3. Moderada amplitude e presente a maior parte do tempo.
4. Marcada amplitude e presente a maior parte do tempo.

Face, lábios e queixo:

Mão direita:

Mão esquerda:

Pé direito:

Pé esquerdo:

21. Tremor postural e de ação das mãos

0. Ausente.

1. Leve, presente com a ação.
2. Moderado em amplitude, presente com a ação.
3. Moderado em amplitude, postural e de ação.
4. Marcado em amplitude, interferindo com a alimentação.

Direita:

Esquerda:

22. Rigidez [*movimento passivo das articulações maiores com o paciente relaxado em posição sentada, ignore a roda denteada*]

0. Ausente
1. Leve ou detectável só quando ativado por outros movimentos.
2. Leve a moderada.
3. Marcada, mas total extensão de movimentos obtida facilmente.
4. Severa, total extensão de movimentos obtida com dificuldade.

Pescoço:

Superior direita:

Superior esquerda:

Inferior direita:

Inferior esquerda:

23. "Finger Taps" [*paciente bate o polegar com o dedo indicador em rápida sucessão com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal
1. Um tanto quanto lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço definido e inicial. Pode apresentar pausas ocasionais durante o movimento.
3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar o movimento ou pausas no movimento continuado.
4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

24. Movimentos manuais [*Paciente abre e fecha as mãos sucessivamente e rapidamente com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal
1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.
2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.

3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.

4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

25. Movimentos rápidos alternantes das mãos [*movimentos de pronação-supinação das mãos, verticalmente ou horizontalmente, com a maior amplitude possível, cada mão separadamente*]

0. Normal

1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.

2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.

3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.

4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

26. Agilidade das pernas [*paciente bate sucessivamente e rapidamente o calcanhar no chão, erguendo totalmente a perna. Amplitude deve ser aproximadamente de 8 cm*].

0. Normal.

1. Levemente lento e/ ou reduzido na amplitude.

2. Moderadamente prejudicado. Cansaço nítido e inicial. Pode ter pausas ocasionais no movimento.

3. Prejuízo severo. Freqüente hesitação ao iniciar movimentos ou pausas no movimento continuado.

4. Dificilmente pode executar a tarefa.

Direita:

Esquerda:

27. Ao levantar-se da cadeira [*paciente tentando levantar de uma cadeira de metal ou madeira reta com os braços mantidos cruzados*]

0. Normal

1. Lento; ou pode necessitar mais que uma tentativa.

2. Impulsiona-se com os braços da cadeira.

3. Tende a cair para trás e pode ter que tentar mais que uma vez, mas pode levantar sem auxílio.

4. Sem capacidade de levantar sem auxílio.

28. Postura

0. Normalmente ereto.

1. Não fica totalmente ereto, postura levemente inclinada, poderia ser normal para pessoas mais idosas.

2. Coloca-se moderadamente inclinado, definitivamente anormal; pode estar ligeiramente inclinado para um lado.

3. Postura severamente inclinada com cifose; pode estar moderadamente inclinado para um lado.

4. Marcada flexão com extrema anormalidade de postura.

29. Marcha

0. Normal

1. Caminha lentamente, pode ter marcha arrastada com passos curtos, mas sem festinação (acelerando os passos) ou propulsão.

2. Caminha com dificuldade, mas requer pouca ou nenhuma assistência; pode ter alguma festinação, passos curtos ou propulsão.

3. Severo distúrbio da marcha, necessitando auxílio.

4. Não pode caminhar, mesmo com auxílio.

30. Estabilidade Postural [*Resposta ao súbito deslocamento posterior produzido por puxada nos ombros enquanto o paciente está de pé com os olhos abertos e os pés ligeiramente separados. Paciente é preparado, podendo ser repetido algumas vezes a manobra*]

0. Normal

1. Retropulsão, mas volta à posição original sem auxílio.

2. Ausência de resposta postural, podendo cair se não for amparado pelo examinador.

3. Muito instável, tende a perder o equilíbrio espontaneamente.

4. Não consegue parar sem auxílio.

31. Bradicinesias e hipocinesias corporais [*Combinando lentificação, hesitação, diminuição do balanço dos braços, pequena amplitude, e pobreza dos movimentos em geral*]

0. Sem.

1. Mínima lentificação, dando ao movimento um caráter “deliberado”; poderia ser normal para algumas pessoas. Possivelmente amplitude reduzida.
 2. Leve grau de lentificação e pobreza dos movimentos que é definitivamente anormal. Alternativamente, alguma redução da amplitude.
 3. Moderada lentificação, pobreza ou diminuição da amplitude dos movimentos.
 4. Marcada lentificação, pobreza ou diminuição da amplitude dos movimentos.
-

IV. Complicações da Terapia [na última semana]

A. Discinesias

32. Duração: Qual a proporção do dia (acordado) em que as discinesias estão presentes? [Informação histórica]

0. Nenhuma
1. 1-25%
2. 26-50%
3. 51-75%
4. 76-100%

33. Incapacidade: o quanto as discinesias são incapacitantes?

0. Não incapacitante.
1. Levemente incapacitante.
2. Moderadamente incapacitante.
3. Gravemente incapacitante.
4. Totalmente incapacitante.

34. Discinesias dolorosas: o quanto as discinesias são dolorosas?

0. Nenhuma discinesia dolorosa.
1. Leve.
2. Moderada.
3. Grave.
4. Acentuada.

35. Presença de distonia no início da manhã:

0. Não.
1. Sim.

B. Flutuações Clínicas

36. Os períodos 'off' são previsíveis?

- 0. Não.
- 1. Sim

37. Os períodos 'off' são imprevisíveis?

- 0. Não.
- 1. Sim.

38. Os períodos 'off' surgem repentinamente, em questão de segundos?

- 0. Não.
- 1. Sim.

39. Qual a proporção do dia acordado em que o paciente fica 'off', em média?

- 0. Nenhuma.
- 1. 1-25%
- 2. 26-50%
- 3. 51-75%
- 4. 76-100%

C. Outras complicações**40. O paciente tem anorexia, náusea ou vômitos?**

- 0. Não
- 1. Sim

41. Algum distúrbio do sono, como hipersonia ou insônia?

- 0. Não.
- 1. Sim.

42. O paciente tem ortostase sintomática?

- 0. Não.
- 1. Sim.

8.3. H&Y

Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn e Yahr (modificada) Fonte: Shenkman ML et al 2001

ESTÁGIO 0: Nenhum sinal da doença.

ESTÁGIO 1: Doença unilateral.

ESTÁGIO 2: Doença bilateral sem déficit de equilíbrio.

ESTÁGIO 3: Doença bilateral leve a moderada; alguma instabilidade postural; capacidade para viver independente.

ESTÁGIO 4: Incapacidade grave, ainda capaz de caminhar ou permanecer de pé sem ajuda.

ESTÁGIO 5: Confinado à cama ou cadeira de rodas a não ser que receba ajuda.