

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**QUANTIFICAÇÃO DO IMUNOCONTEÚDO DE INTERLEUCINA-6
NO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON**

Kerly Wollmeister Hofmann

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves

Dissertação de Mestrado

2005

“... não se pode tentar mais nada do que estabelecer o princípio e a direção de uma estrada infinitamente longa. A pretensão de qualquer plenitude sistemática e definitiva seria, no mínimo, uma auto-ilusão.

Aqui, a perfeição só pode ser obtida pelo estudante individual no sentido subjetivo, de que ele comunica tudo quanto conseguiu ver”

Georg Simmel (1858-1918)

Dedico este trabalho com amor aos meus pais Frederico e Beatriz, pois são eles os verdadeiros vencedores. Eles me ensinaram a ter fé, esperança e coragem para superar as dificuldades e muitas vezes trabalharam dobrado, renunciando os seus sonhos em favor dos meus.

Ao meu irmão Bertrand, pelos anos de aprendizado vividos juntos ao longo da maior parte da minha vida.

Às minhas amigas Lúcia Sarmento e Janyne Sattler, porque foram as mãos dadas que não deixaram que eu desistisse do meu objetivo.

Agradeço a Lisandra Mendes e Roberto Lima pela atenção e pelo incentivo, procurando amenizar minha ansiedade diante dos obstáculos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela possibilidade de aprimoramento científico e concretização deste trabalho.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a CAPES, agradeço pelo suporte dado para a realização desta pesquisa.

A Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo incentivo dado a apresentação de trabalhos científicos em eventos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder, orientador desta pesquisa, pela confiança, desprendimento, dedicação, compreensão, ensinamentos e constante incentivo à conclusão deste trabalho, exemplo notável de profissionalismo.

A Profa. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves, co-orientadora deste trabalho, pela oportunidade pessoal de aperfeiçoamento científico neste programa de pós-graduação, pela confiança, compreensão e orientação estatística prestada durante a realização desta dissertação.

A Profa. Dra. Denise Righetto Ziegler, pelo incentivo constante dado à ciência e pela colaboração prestada no início deste percurso.

A Nut^a. Carmen Maria Cardoso Francisco, agradeço pelo estímulo a um aprendizado contínuo e pela primeira possibilidade de contato com o meio científico.

Aos colegas Daniele Fricke e Arthur Francisco Schumacher Schuh pela dedicação demonstrada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela e a Renata Leke, pela atenção dispensada durante a realização da análise bioquímica apresentada neste estudo.

A Luciano de Oliveira, Letícia Konrath e Helena Beatriz Costa, funcionários do PPG em Medicina: Ciências Médicas, pelo auxílio dispensado durante a realização deste mestrado.

Aos profissionais do Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Fabiana Silva da Silva, pela atenção e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina da UFRGS, pela atenção dispensada na aquisição de artigos científicos e material bibliográfico.

Agradeço aos contratados, residentes, funcionários, estagiários e pacientes do Serviço de Neurologia – Ambulatório de Distúrbios do Movimento – do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sem os quais este estudo não seria possível.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

Citocinas na DP.....	30
Interleucina-6.....	33
OBJETIVOS.....	36
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	37
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS.....	56
Abstract.....	58
Introduction.....	59
Material and Methods.....	61
Results.....	64
Discussion.....	65
References.....	69
Tables.....	74
Figures.....	75
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	77
Resumo.....	79
Introdução.....	80
Material e Métodos.....	82
Resultados.....	85
Discussão.....	86
Referências.....	90
Tabelas.....	95
Figuras.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ADL: Escala de Atividades da Vida Diária de Schwab e England.

ANOVA: Análise de variância.

CNS: Sistema nervoso central.

COMT: Catecol-orto-metiltransferase.

CSF: Fluido cerebrospinal.

DA: Dopamina.

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

ELISA: Imunoensaio enzimático de alta sensibilidade.

GABA: Ácido gama-amino butírico.

GP_L: Globo pálido lateral.

GP_M: Globo pálido medial.

(h): Humana.

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

HLA-DR: Antígenos leucocitários humanos de especificidades DR.

HY: Escala de estadiamento de Hoehn e Yahr.

IL: Interleucina.

INF γ : Interferon gama.

IS: Sistema imunológico.

L-DOPA: Levodopa.

LBs: Corpos de Lewy.

MAO: Monoamina oxidase.

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina.

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

NGF: Fator de crescimento neuronal.

OH: Radical hidroxila.

PD: Doença de Parkinson.

RNA_m: Ácido ribonucléico – mensageiro.

ROS: Espécies reativas de oxigênio.

SD: Desvio padrão.

SN: Substância *nigra*

SN_c: Substância *nigra pars compacta*.

SN_r: Substância *nigra pars reticulada*.

STN: Núcleo subtalâmico.

Thal_{va}: Núcleo ventroanterior do tálamo.

Thal_{vl}: Núcleo ventrolateral do tálamo.

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa.

UPDRS: Escala Unificada de Classificação da Doença de Parkinson.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama esquemático ilustrando as alterações que ocorrem na organização funcional dos núcleos da base na PD. A espessura relativa das setas, no esquema à direita, indica o grau de ativação/inibição das vias por elas representadas na PD. As setas pretas representam projeções glutamatérgicas excitatórias, setas cinza representam projeções GABAérgicas inibitórias. A linha pontilhada representa a projeção que vai da SN_c ao estriado (via nigroestriatal), que é dopaminérgica. Na PD a degeneração da via nigroestriatal resulta em alterações nas vias estriato-palidais, que levam a uma hiperatividade das projeções subtalâmicas excitatórias aos núcleos de saída. Como resultado final, a atividade GABAérgica dos núcleos de saída encontra-se potencializada, o que representa um aumento da inibição exercida sobre o tálamo motor, e conseqüentemente uma redução na sinalização tálamo-cortical [122].

FIGURA 2. (Fig.1 - artigo) As concentrações no soro de IL-6, nos três grupos, foram medidas por ELISA. $P > 0,05$.

FIGURA 3. (Fig.2 - artigo) Correlação entre a escala ADL e os valores de IL-6 no soro de pacientes PD tratados com L-DOPA ($n = 23$; $r = -0,457$; $P < 0,05$).

FIGURA 4. (Fig.3 - artigo) O tempo de doença não foi associado com a escala ADL e os níveis de IL-6 ($P > 0,05$).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. (Tabela 1 do artigo) Dados demográficos, bioquímicos e clínicos dos sujeitos avaliados. NP = não representado; * média \pm SD.

INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (PD) é uma das doenças neurológicas mais prevalentes na população idosa, representando cerca de 2/3 dos pacientes atendidos em ambulatórios de distúrbios do movimento. A prevalência da doença é de aproximadamente 160 casos por 100.000 habitantes e a incidência de cerca de 20 casos por 100.000 habitantes por ano. A prevalência e a incidência aumentam com a idade, observando-se uma prevalência de cerca de 1% na população com mais de 60 anos. O início do quadro clínico ocorre geralmente entre 50 e 70 anos de idade. Contudo, pode-se encontrar pacientes com início da doença mais precoce, antes dos 40 anos. A PD pode ocorrer nas diferentes raças e classes sociais em pessoas de ambos os sexos, apesar de alguns estudos epidemiológicos demonstrarem maior frequência no sexo masculino, com uma razão de homens para mulheres de três por dois [10].

Essa doença neurodegenerativa é uma condição crônica cuja principal característica anatomopatológica observada é de uma perda lentamente progressiva de células mesencefálicas da substância *nigra* (SN). Estão presentes com frequência, na SN e no *locus ceruleus*, corpos de inclusão citoplasmática conhecidos como corpos de Lewy (LBs), que representam marcadores anatomopatológicos [26][39].

O aspecto bioquímico central na PD é a diminuição da transmissão dopaminérgica nos núcleos da base [39][120]. A evolução da PD é progressiva, desencadeada pela perda neuronal irreversível e incapacitante. O

grau de gravidade pode ser avaliado por diferentes escalas, como a de Hoehn e Yahr (HY), que apresenta cinco graus de gravidade [39].

As principais manifestações motoras da doença são tremor de repouso, bradicinesia (acinesia ou hipocinesia), rigidez muscular do tipo plástica, podendo ter o sinal da roda denteada e instabilidade postural. Vários outros sintomas (incluindo distúrbios não motores) acompanham a PD: depressão, distúrbios do sono, mudanças emocionais, distúrbios da fala, constipação intestinal e incontinência urinária, dificuldades de mastigação e deglutição, problemas de pele, etc [26][39].

A reposição de dopamina (DA) estriatal é o fundamento do tratamento clínico-farmacológico. São utilizadas medicações anticolinérgicas, agonistas dopaminérgicos, levodopa (L-DOPA) (associada a benzerazida ou a carbidopa), bem como o uso das drogas inibidoras da catecol-orto-metiltransferase (COMT) [120].

O aparecimento das complicações da levodopa-terapia é um dos problemas mais importantes no acompanhamento dos pacientes com PD, como a presença de flutuações como os fenômenos de *wearing off* (piora clínica de final de dose) e *on-off* (“liga-desliga” não relacionado com o momento de administração do medicamento), as discinesias (de pico de dose, final de dose) e outras complicações, notadamente as de ordem neuropsiquiátricas. Esses fatos, associados à progressão natural da doença, bem como a outras co-morbidades, contribuem significativamente para uma piora na qualidade de vida dos pacientes, para as suas atividades da vida diária, com implicações nas taxas de morbidade e mortalidade [49].

A causa da degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais é desconhecida e inúmeros fatores têm sido relacionados ao processo etiopatogênico da PD [142]. De uma forma sucinta pode-se definir como mais importante os seguintes: a) ação de neurotoxinas ambientais; b) o papel do estresse oxidativo e produção de radicais livres; c) as anormalidades mitocondriais; d) predisposição genética; e) envelhecimento cerebral.

Além destes fatores alguns estudos sugerem que anormalidades na função imunológica possam ser um dos mecanismos envolvidos na patogênese da PD. A evidência para tais mecanismos inclui a presença de um número diminuído de linfócitos periféricos [83], uma capacidade de secreção de imunoglobulina diminuída [44][84] e uma alteração na produção de citocinas pelo cérebro e células sangüíneas periféricas dos pacientes com PD [84][45]. Várias citocinas foram consideradas importantes contribuintes ao desenvolvimento e progresso do processo degenerativo [14].

Um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 e 6 (IL-1, IL-6), e fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), foi encontrado no fluido cerebrospinal (CSF) e em cérebros de pacientes com PD [18].

No presente estudo, determinamos o imunocnteúdo de IL-6 no soro de pacientes com PD em atendimento no Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Comparamos o resultado obtido entre indivíduos controles, indivíduos que faziam uso de L-DOPA e indivíduos que não haviam iniciado o tratamento com droga antiparkinsoniana. Relação com o tempo de doença, grau de envolvimento neurológico e estágio da doença foram analisados.

REVISÃO DA LITERATURA

Histórico

A PD foi originalmente descrita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson numa monografia intitulada *An Essay on the Shaking Palsy* [112][144][110]. Essa monografia foi baseada na observação de seis pacientes, um deles encontrava-se no estágio terminal da doença crônica. A patologia intitulada *paralisia agitante* foi definida como uma doença caracterizada pela presença de movimentos tremulares involuntários, com diminuição da força muscular, tendência a inclinação do tronco para frente e alteração da marcha, tendo os sentidos e o intelecto não afetados [110].

Anteriormente a James Parkinson, a literatura médica cita descrições parciais da doença, como aquelas realizadas por Galeno, por autores egípcios (papiros), indianos e, também, por Leonardo Da Vinci [43].

A mudança do nome da doença de *paralisia agitante* para PD (*la maladie de Parkinson*) foi sugerida por Charcot, em homenagem à descrição clássica de James Parkinson. Charcot também contribuiu na descrição do quadro clínico, no diagnóstico diferencial e, no tratamento da doença, pois foi o primeiro neurologista a sugerir uma terapêutica para a PD [34][113][57][43].

Somente em 1960, Ehringer e Hornykiewicz associaram a PD com a depleção da produção de DA nos circuitos motores subcorticais. Grandes doses de D-DOPA (forma dextrógira da DA) via oral foram utilizadas pela primeira vez por Cotzias em 1967, demonstrando significativo efeito benéfico nos pacientes com PD. Posteriormente, o uso da L-DOPA (forma levógira da

DA) e o acréscimo de inibidores da dopa-descarboxilase permitiram uma melhoria no tratamento, com poucos efeitos colaterais tóxicos [43][117]. Após esse período, novas drogas foram descobertas e sugeridas para o tratamento dos pacientes com PD.

Epidemiologia

A inexistência de testes diagnósticos definitivos é apontada pelos estudos epidemiológicos da PD como o maior problema de acurácia, dificultando a comparação de estudos em diferentes tempos ou em diferentes locais. Em algumas comunidades, o tremor essencial soma de 10% a 40% dos diagnósticos falso-positivos da PD [82][96]. Entretanto, nos Estados Unidos e na Europa, a incidência estimada é de 7 a 19 casos por 100.000 habitantes por ano. A prevalência é de 30 a 190 casos por 100.000 habitantes por ano [111].

Fatores de risco para a PD

Idade

O aparecimento da PD encontra uma idade média de 61 anos e uma sobrevida média de 13 anos [67]. A presença da doença é incomum em indivíduos com idade inferior aos 40 anos [111][29][79].

A razão para a prevalência e a incidência aumentarem com a idade ainda é desconhecida. Possíveis explicações incluem vulnerabilidade neuronal relacionada à idade e/ou algum mecanismo etiológico dependente do tempo [141].

Gênero

Em muitos estudos, a prevalência para a PD não difere significativamente entre homens e mulheres [82][5][28][64][124][137].

Raça

Estudos baseados em dados de comunidade apontam uma prevalência maior para a PD na Europa e América do Norte, considerando taxas marcadamente menores no Japão, China e África [101][78][123][128][129]. Esses dados sugerem um fator de risco para a PD entre a raça branca. Estudos baseados em dados hospitalares nos Estados Unidos e África, similarmente, encontram a PD em menor frequência nos indivíduos de raça negra [72][105][107]. Exceções a essa observação são os estudos no Mississippi [129] e outro na Índia [17].

Trauma e estresse emocional

Traumas, como um acidente, uma cirurgia ou um intenso estresse emocional são associações que muitos pacientes relacionam ao início da PD. No entanto, até o momento nenhuma ligação direta com trauma ou estresse emocional pode ser provada. Um evento traumático talvez pudesse desencadear sintomas ainda não manifestos, mas isso não deve ser confundido com a etiopatogenia da PD [16][35][138][118].

Infecção

Um estudo [87] sugeriu que uma exposição intrauterina ao vírus influenza poderia causar uma perda de neurônios nigrais e conseqüentemente aumentar a vulnerabilidade à PD, mas esta observação não foi confirmada [37].

Fazzini, Fleming e Fahn encontraram um número elevado de anticorpos ao coronavírus no CSF em pessoas com PD [40]. Determinados coronavírus têm uma afinidade pelos núcleos da base em alguns animais, e membros destas espécies comumente afetam animais agrícolas como os porcos. Analisando sob este ponto de vista, um risco maior para PD associado com a residência rural pode refletir exposição ambiental a um agente infeccioso [141].

Hereditariedade

Hereditariedade é o maior fator de risco associado com a PD após o fator idade. A PD pode ser puramente genética. Alguns estudos apontam que 20% dos pacientes com PD apresentam um familiar de primeiro grau que possua a doença [7][30]. No entanto, acredita-se que para a maioria dos casos de PD a doença ocorra em decorrência de uma predisposição genética em indivíduos expostos a determinados fatores ambientais [9]. Estudos com gêmeos apontam para uma menor contribuição de fatores genéticos na PD, uma vez que as taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos são similares [81][85][146][148][151]. Desde 1996, vários genes

foram identificados como envolvidos na PD. As formas genéticas, no entanto, ainda representam a minoria dos casos de PD.

Tóxicos ambientais

Muitos estudos sugerem que indivíduos residentes em área rural que possuam atividades ligadas à agropecuária ou que tenham contato com herbicidas e/ou pesticidas, ou indivíduos que bebem água de poço, funcionários de indústrias químicas, mineração de ferro e aço, e consumidores de vegetais não-cozidos apresentam risco mais elevado para o desenvolvimento da PD [61][74][132]. Um estudo realizado na China encontrou maior número de casos de PD na área urbana, o que pode estar relacionado à modernização rápida dos centros urbanos e conseqüentemente a maior exposição a tóxicos ambientais [139][140]. A significância destas associações deve ser determinada de forma cautelosa. Todos estes estudos são limitados pelo tamanho amostral pequeno e metodologias diferentes evitam comparações diretas, o que os torna inconclusivos.

Fisiopatologia da PD

Os sinais e sintomas motores da PD resultam primariamente das alterações funcionais dos núcleos da base. Os núcleos da base localizam-se no telencéfalo e consistem em cinco núcleos interconectados: o núcleo caudado e o putamen (que juntos formam o estriado), o globo pálido -

segmentos medial (GP_M) e lateral (GP_L), a substância *nigra pars compacta* (SN_c) e *pars reticulada* (SN_r), e o núcleo subtalâmico (STN) [122].

Num modelo fisiológico simplificado dos núcleos da base, a via direta contém duas sinapses GABA(ácido gama-amino butírico)-érgicas inibitórias: a) uma é entre o estriado e o GP_M ou entre o estriado e a SN_r; b) a outra é entre o GP_M e o núcleo ventroanterior (Thal_{va}) e ventrolateral (Thal_{vl}) do tálamo ou SN_r e o núcleo Thal_{va} e Thal_{vl} do tálamo. A ativação desta via libera o consumo glutamatérgico (excitatória) pelo tálamo nas áreas motoras, sensoriais e outras relacionadas do córtex. A via indireta inclui uma sinapse glutamatérgica excitatória e três sinapses GABA-érgicas inibitórias: a) uma é entre o estriado e o GP_L; b) outra é entre o GP_L e o STN, e o STN projeta fibras excitatórias para o GP_M; c) e entre o GP_M e o tálamo. Em contraste a via direta, as três sinapses inibitórias resultam em inibição das projeções córtico-talâmicas (anteriormente ativadas) quando o circuito indireto é ativado. A atividade nas duas vias depende, entre outros fatores, do balanço entre os receptores excitatório e inibitório, ativados pelos neurônios GABA-érgicos estriatais. O receptor de DA D1-excitatório é encontrado principalmente na via direta e o receptor de DA D2-inibitório, principalmente na via indireta. As inervações dopaminérgicas da SN_c para o estriado e os neurônios colinérgicos intraestriatais são alguns dos mais importantes moduladores do circuito [64][8].

Na PD, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SN_c induz uma cascata de alterações que afeta todos os outros componentes do circuito [122] (Figura1).

Etiopatogenia da PD

Com exceção das raras formas genéticas, a maioria dos casos de PD não apresenta causas determinadas, sendo assim definidos como PD idiopática. Várias hipóteses procuram explicar a etiopatogênese da doença (suscetibilidade genética, agentes tóxicos ambientais, falha na cadeia respiratória mitocondrial, excesso de radicais livres e tóxicos, deficiência de fatores neurotróficos, envelhecimento cerebral ou a combinação desses fatores) [39][79][56][58][90][104].

A característica típica da PD idiopática é a degeneração dos neurônios contendo neuromelanina no tronco cerebral, especialmente na SN_c e no *locus ceruleus*, os neurônios sobreviventes apresentam inclusões citoplasmáticas chamadas LBs [39][120][54][80].

Os LBs são considerados a principal característica patológica da PD, podendo ser encontrados em outras doenças degenerativas ou mesmo em indivíduos assintomáticos [52][53].

Os LBs também são encontrados na SN da população em geral com uma prevalência aproximada de 1% nas pessoas na quinta década de vida para 6 a 10% nas pessoas aos 80 anos de idade [55]. No entanto, é incerto que estes grupos apresentam um estado pré-clínico para PD.

A perda neuronal dopaminérgica na SN dos pacientes com PD ocorre em diferentes regiões. Maiores perdas são observadas nas camadas ventrolaterais, seguidas pelas perdas nas camadas mediais e em menor grau nas células das camadas dorsais [42]. É estimado que os sinais clínicos da PD não ocorrem até que haja uma depleção de cerca de 80% de DA estriatal e

uma perda de cerca de 50% de neurônios dopaminérgicos na SN [13]. Portanto, deve existir uma fase pré-sintomática durante a qual exista perda neuronal ativa sem que ocorra alguma manifestação clínica da PD. Esta idéia é suportada pela evidência de que ocorre perda celular significativa em indivíduos descritos como portadores assintomáticos de LBs em um modelo similar para a PD, com predileção para camada ventrolateral. Assim, os LBs podem representar essa fase pré-sintomática em indivíduos com outro motivo de óbito antes que a PD possa se manifestar clinicamente [42][41].

Na maioria dos casos de PD, os LBs são numerosos e facilmente encontrados na SN e quando estão ausentes excluem a possibilidade da doença. No entanto, também estão presentes em outras condições [55]. Além da SN, os LBs podem ser encontrados em outras áreas, como o *locus ceruleus*, o núcleo dorsal do vago, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos autonômicos, etc [42]. Sua presença em outras áreas do cérebro indica que a PD não é somente uma doença das células dopaminérgicas da SN.

Diversas hipóteses têm sido relacionadas ao processo etiopatogênico da PD, sendo os mais importantes discutidos abaixo. Para cada uma destas hipóteses há pontos a favor e pontos contrários, de modo que se pode pensar que a origem da doença se deva a uma combinação desses fatores:

- Ação de neurotoxinas ambientais;
- O papel do estresse oxidativo e produção de radicais livres;
- As anormalidades mitocondriais;
- Predisposição genética;
- Envelhecimento cerebral.

A ação de neurotoxinas ambientais

Alguns cientistas especulam que a morte dos neurônios dopaminérgicos na PD decorra de uma toxina exógena ou endógena. Essa teoria é baseada na identificação de um composto químico conhecido como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) que induzia quadros clínicos que mimetizam a PD. Em 1979, um estudante de bioquímica de 23 anos desenvolveu parkinsonismo grave após injeções de meperidina produzidas por ele próprio em um laboratório caseiro, após atalhos no processo de manufatura ele contaminou seu composto com MPTP [30]. Seletivamente os neurônios dopaminérgicos da SN_c são destruídos nos indivíduos intoxicados [6]. Desde então, foram desenvolvidos muitos modelos animais de MPTP induzindo parkinsonismo.

O quadro parkinsoniano induzido pelo MPTP não é idêntico ao da PD, tendo o paciente menos tremor, maior comprometimento de equilíbrio e marcha, e prejuízo cognitivo mais evidente [77]. O MPTP não é facilmente encontrado no meio ambiente, no entanto a estrutura química do seu núcleo responsável por sua toxicidade é freqüentemente encontrada em muitas substâncias, tais como alguns herbicidas (por exemplo: o paraquat) [133].

Alguns estudos elegem o hábito de fumar como um efeito protetor para o desenvolvimento da PD, no entanto ainda não há consenso sobre a real participação do cigarro como substância neuroprotetora. Do ponto de vista epidemiológico, fumantes têm maior propensão a doença cardiovasculares, e, desta forma, uma morte precoce; assim, como a PD é de início mais tardio, seria menos freqüente neste grupo. Por outro lado, a nicotina induz uma maior liberação de DA e, assim, apresenta um benefício sintomático na PD [104].

Apesar da busca por muitos cientistas de algum componente presente no meio ambiente que seja capaz de produzir a PD, nenhuma toxina ambiental pôde ser identificada até o momento. Existe uma hipótese em que todos nós estaríamos expostos a uma ou mais toxinas, porém alguns indivíduos seriam incapazes de metabolizá-las adequadamente, sendo assim suscetíveis ao desenvolvimento da doença. Esta inabilidade de metabolizar essas toxinas poderia ser herdada, levantando a possibilidade de causas genéticas para a PD [88].

Existe também a hipótese de que alterações nas rotas metabólicas normais da SN_c, por um defeito genético, pudessem gerar neurotoxinas endógenas. Exemplos são demonstrados por estudos sobre compostos endógenos, tais como as tetraidroisoquinoleínas e β -carbolinas, que se assemelham a estrutura do MPTP e possuem toxicidade dopaminérgica [56][58][90][104].

Um aspecto importante na PD, contrário ao MPTP e aos tóxicos ambientais, é que os sinais e sintomas ocorrem muito gradualmente. Substâncias que penetram ou se acumulam no cérebro lentamente ou levemente tóxicas seriam insignificantes devido à dificuldade de avaliação [88].

O papel do estresse oxidativo e a produção de radicais livres

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre fatores que promovem a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa, os antioxidantes. Muitos estudos acreditam que o estresse oxidativo contribui para a patogênese da PD [97][75][15]. Os radicais livres causam dano celular

através de uma variedade de mecanismos, entre os mais importantes são a peroxidação dos lipídios da membrana, os danos ao DNA (ácido desoxirribonucléico), a nitritificação de resíduos da proteína tirosina e a agregação protéica [48][60][126]. Acredita-se que o aumento do estresse oxidativo na PD seja causado principalmente por disfunção na respiração celular mitocondrial [127], ou por aumento dos níveis locais de ferro livre ou por diminuição dos mecanismos de proteção frente aos radicais livres. Tais hipóteses foram fortalecidas por achados em modelos animais [116].

A SN é rica em DA, a sua oxidação não enzimática leva a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Enzimaticamente, tanto a síntese da DA pela tirosina hidroxilase, como seu catabolismo pela monoamino oxidase (MAO) pode levar à produção de H_2O_2 . A presença de elevados níveis de ferro na SN_c , catalisa a *reação de Fenton* através da qual o H_2O_2 dá origem à formação de uma espécie altamente reativa, o radical hidroxila (OH^\cdot). Os radicais OH^\cdot por sua vez, iniciam a peroxidação lipídica e a morte celular. O excesso de ferro têm sido implicado na indução da citotoxicidade durante a PD através do acúmulo de radicais OH^\cdot [102][103].

Os níveis de glutathiona reduzida estão diminuídos na SN na PD, o que pode evitar a inativação do H_2O_2 e aumentar a formação de radicais tóxicos OH^\cdot [80].

O ferro total está aumentado e a ferritina está diminuída na SN_c nos pacientes com PD. Em adição, a neuromelanina, que é um produto da auto-oxidação da DA, é capaz de formar um complexo com o ferro, assim potencializando a geração de radicais livres [38][63][69].

A evidência do estresse oxidativo é suportada por vários estudos e foi examinada muitas vezes [91][4][12][46][70][106][130][150].

As anormalidades mitocondriais

As especulações de disfunções mitocondriais em pacientes com PD foram estimuladas pela observação de que uma neurotoxina, MPTP, a qual é convertida pela MAO em um metabólito ativo 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) nas células gliais e é preferencialmente armazenado na mitocôndria dos neurônios dopaminérgicos na SN, inibe o complexo I da cadeia respiratória [89][99][125][31].

Uma das razões para a investigação da atividade enzimática da cadeia respiratória tem sido os complexos que contém agrupamentos ferro-enxofre, uma vez que pacientes com PD demonstram um excesso de ferro na SN, particularmente de Fe^{+3} (íon férrico), enquanto que o cérebro normal e as enzimas da cadeia respiratória possuem um alto conteúdo de Fe^{+2} (íon ferroso) [33][36][62][134].

Outra anormalidade também detectada na cadeia respiratória é a diminuição da glutathione. Isso pode resultar em um aumento nos radicais livres a partir de ambos: cadeia respiratória e metabolismo do ferro [11]. E também, o óxido nítrico, um produto do metabolismo da DA, pode afetar a atividade enzimática [32].

Existe uma outra teoria que envolve o depósito de cálcio pelas mitocôndrias, assim os níveis de cálcio citoplasmáticos seriam regulados nos neurônios, onde os retículos endoplasmáticos são exíguos. Mutações no

complexo I alterando os níveis citoplasmáticos de cálcio, o envolvem na apoptose neuronal, implicando na patogenia da doença [125].

Uma hipótese para a morte neuronal programada na PD (apoptose), é que ela seria conseqüência de uma insuficiência respiratória mitocondrial devido a anormalidades descritas no complexo I da cadeia respiratória. Desta forma, uma disfunção mitocondrial, decorrente de fatores tóxicos (exógenos ou endógenos), e/ou fatores genéticos, provocaria uma cascata de eventos que culminaria para a apoptose [56][58][90][104][19].

Estudos questionam se dentro do processo neurodegenerativo as anormalidades mitocondriais encontradas são realmente os eventos primários da PD ou seriam apenas eventos secundários a outros fatores [56][58][90][104].

Predisposição genética

Nos últimos anos, a importância dada aos fatores genéticos na etiopatogenia da PD aumentou exponencialmente, após estudos de Polymeropoulos et al. Com isso, foram definidas algumas formas de doença com herança autossômica dominante, recessiva, genes, *loci* genéticos e um fenótipo de metabolizador lento (pela pesquisa de suscetibilidade a neurotoxinas somada a fatores genéticos) [7][90][51][59][73][131][149][145].

Genes específicos começaram a ser identificados em meados da década de 90, sendo o primeiro (Park1) identificado em uma numerosa família italiana com padrão de herança autossômica dominante. Este gene, localizado no cromossomo 4q21-23, codifica a α -sinucleína, proteína que está presente

nos LBs [114]. A alteração molecular específica no gene da α -sinucleína resulta da mudança de uma base, na substituição da treonina pela alanina no aminoácido 53. O mecanismo de como esta alteração protéica leva ao seletivo dano neuronal da PD ainda é desconhecido [115].

As duas mutações na α -sinucleína, Ala53Thr e Ala30Pro, estão associadas com a doença de início precoce, baixa prevalência de tremor e longa duração da doença comparada com a PD esporádica clássica [76][108][109][114][115].

Outros genes associados com padrão de herança autossômico dominante foram Park3, Park4 e Park5, identificados, porém, em famílias isoladas [147].

Entre os genes associados à herança autossômica recessiva, o principal é o gene Park2. Este gene foi inicialmente identificado em pacientes japoneses com PD juvenil. Nestes pacientes, foram demonstrados aspectos particulares da PD, como flutuação diurna dos sintomas, melhora com o sono, resposta sustentada a L-DOPA, discinesias precoces e lenta evolução, bem como sua associação com hiperreflexia e distonias [86].

Desde a identificação do gene Park2, passou-se a definir essa entidade como parkinsonismo juvenil autossômico recessivo. Este gene está localizado no cromossomo 6q25-27 e codifica uma proteína que possui 465 aminoácidos, a parkina [68][23][24].

Os genes Park 3, 4, 5, 6 e 7 relacionados à PD apresentam, ainda, pequena importância epidemiológica e necessitam estudos adicionais [88].

As pesquisas que correlacionam suscetibilidade genética às neurotoxinas nos pacientes com PD se concentram em um fenótipo de

metabolizador lento, propondo que indivíduos com PD possuam defesas insuficientes para reagir às agressões externas por neurotoxinas ambientais, ou mesmo endógenas. O gene CYP2D6 é um dos vários genes apontados para essa suscetibilidade genética [59][121].

A relação de casos de PD familiar com casos esporádicos não está clara. Casos esporádicos de PD poderiam ser causados por uma mutação em um gene único com penetrância reduzida ou decorrente de traços mais complexos, em que a chance de desenvolver a doença seria determinada por uma interação entre uma predisposição genética e exposição a fatores de risco ambientais [88].

Envelhecimento cerebral

A prevalência aumentada da PD com o passar da idade sugere uma possível contribuição do envelhecimento cerebral na etiopatogenia da doença. Estudos histopatológicos e neuroquímicos mostram que a SN_c é particularmente sensível ao envelhecimento em relação a outras estruturas cerebrais [42].

Estudos associam a sensibilidade ao envelhecimento cerebral à presença de um agente tóxico, que desencadearia processos de morte neuronal progressiva nos pacientes com PD [56][58][90][104]. Entretanto, há evidências que tornam tal mecanismo pouco provável. A fase pré-sintomática da PD não é maior que cinco anos e a perda neuronal na SN_c é de cerca de 45% na primeira década da doença enquanto que em indivíduos normais é de apenas 4,7% [42].

Estudos anatomopatológicos constataram que a porção da SN_c que mais sofre degeneração na PD é a ventrolateral (cujos neurônios projetam-se para o putamen), enquanto que na senilidade, as regiões mais evidentemente afetadas são a dorsal e a ventromedial da SN_c do mesencéfalo [41].

Citocinas na PD

Estudos questionam o envolvimento da microglia e das citocinas na etiopatogenia da PD [56][58][90][104]. Foi sugerido que um desequilíbrio no balanço de citocinas, neurotrofinas e proteínas relacionadas a apoptose estaria envolvido na patogênese da PD [27].

Durante uma resposta imune, várias células do sistema imune (IS) devem comunicar com uma outra com o objetivo de coordenar o reconhecimento e a destruição de organismos invasores. Algumas das interações entre as células são mediadas por sinais de superfície, considerando que um número de outras interações, particularmente essas a uma distância moderada, são mediadas por citocinas, um diverso grupo de pequenos polipeptídios que medeiam e regulam as reações imunes e inflamatórias. A maioria senão todas as células do IS secretam citocinas, normalmente seguidas de ativação, e cada tipo celular produz um tipo distinto delas. O número total de citocinas é moderadamente grande, talvez algumas dúzias, mas a complexidade da ação da citocina multiplica sua diversidade dentro de uma grande rede reguladora [94][1].

Cada citocina individual pode possuir múltipla atividade sobre diferentes tipos de células e várias citocinas freqüentemente apresentam funções

relacionadas (mas raramente idênticas). Citocinas podem ter efeitos sinérgicos ou antagonistas e podem induzir ou inibir a síntese de outras citocinas. Uma secreção padrão completa de citocinas pode ser regulada por outras citocinas e sinais adicionais. Elas atuam localmente ou sistemicamente, dependendo das taxas de síntese e utilização. A rede complexa de citocinas do IS aparece como um sistema regulador de outros órgãos do corpo, conduzindo uma intercomunicação entre o IS e outros sistemas [94].

Um tipo de citocinas com funções inter-relacionadas freqüentemente induzidas por uma cascata coordenada são as envolvidas na inflamação. Essas citocinas são sintetizadas por macrófagos e células não-imunes, tais como as células endoteliais e fibroblastos, e incluem IL-1, IL-6, TNF α e quimiocinas. Existe uma rede complexa de estimulação-cruzada entre essas citocinas que resulta numa cascata inflamatória, causando derrame vascular, edema, aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, atração química e ativação de monócitos e granulócitos [94][1].

Estudos observaram mudanças nas populações de linfócitos no CSF e sangue, síntese de imunoglobulina e citocinas, e produção de proteínas de fase aguda nos pacientes com PD. Estas hipóteses são suportadas pela observação da ativação da célula-T, a qual lidera a produção de interferon gama (INF γ) cuja principal função é ativar os macrófagos. Como em outras doenças neurodegenerativas, existe uma evidência de inflamação, caracterizada por uma reação glial (especialmente a microglia), assim como um aumento da expressão de antígenos leucocitários humanos de especificidades DR (HLA-DR), citocinas, e componentes do complemento. Essas observações sugerem que mecanismos do IS estão envolvidos na patogênese da PD [27].

O papel de mecanismos do IS nas doenças neurodegenerativas tais como a PD é uma importante área de investigação [3]. O processo de perda neuronal, que lidera a ativação da glia e a produção de várias moléculas e citocinas pró-inflamatórias, parece-se com uma inflamação clássica, mas sem a participação ou a mínima de macrófagos e linfócitos do sangue [27].

Citocinas pró-inflamatórias fazem parte da resposta imune do cérebro com injúria. Elas são secretadas por células imunocompetentes, e também pela glia e neurônios, e estão envolvidos na comunicação química entre as células e no IS. A expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e $TNF\alpha$ foram observadas no CSF e em cérebros de pacientes com PD [18]. Em um modelo animal de PD induzido por MPTP foram observados níveis aumentados de ácido ribonucleico – mensageiro (RNAm) para IL-1 β , $TNF\alpha$, IL-6, IL-10, $INF\gamma$ no estriado [25].

As IL-1 β e IL-6 aumentam a produção da proteína precursora da amiloide e a formação da β -amilóide, e estão envolvidos na patogênese da doença de Alzheimer [3]. No rato transgênico, uma maior expressão de IL-6 causa encefalopatia com astrogliose, perda neuronal, desmielinização e edema [21].

Citocinas podem, no entanto, ter um efeito protetor sobre os neurônios. Por exemplo, a IL-1 amplifica a secreção de alguns fatores neurotróficos, tais como o fator de crescimento neuronal (NGF) [135], e ativa os astrócitos na direção do crescimento pelos neuritos dos neurônios dopaminérgicos [71].

Uma elevada produção de IL-1 β pode fornecer alguns efeitos neuroprotetores para os neurônios dopaminérgicos [100]. A IL-6 aumenta o

tempo de sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos em cultura e regula a síntese de DA [65]. Os níveis aumentados de IL-6 no CSF na PD estão inversamente correlacionados com a gravidade da doença, sugerindo que uma maior regulação de IL-6 ocorre para regenerar os neurônios lesionados em um estágio inicial da doença [95]. Quais das duas ações opostas das citocinas ocorre sobre os neurônios (tóxica ou protetora) pode depender do tipo de estímulo, da concentração de moléculas secretadas, e da expressão e interação do receptor [47].

Mudanças na resposta imune (produção de radicais tóxicos pela glia, síntese de citocinas), privação de fatores do crescimento, produção aumentada de ROS, e disfunção mitocondrial foram observadas na PD. Esses fatores podem gerar uma injúria neuronal, chegando a apoptose. A apoptose previne a liberação de substâncias tóxicas (tais como as enzimas proteolíticas) das células que estão para morrer, prevenindo a ativação de moléculas inflamatórias [27].

Estudos histopatológicos de cérebros de pacientes com PD sugerem a ocorrência de um processo apoptótico: a perda celular ocorre gradualmente (somente poucas células por dia), e a subsequente eliminação das células mortas pela microglia local restringe o processo degenerativo [152].

Interleucina-6

A IL-6 possui um importante papel nos mecanismos de defesa. Devido a sua atividade pleiotrópica, a IL-6 foi anteriormente denominada interferon beta-2, estimuladora de célula B fator 2, fator de crescimento

hibridoma/plasmacitoma e fator hepatócito estimulador. A IL-6 tem um peso molecular de 26 kDa e é expressa em uma variedade de diferentes tipos celulares incluindo monócitos, fibroblastos e células endoteliais [119].

A IL-6 é um membro da família das citocinas neuropoiéticas que foi inicialmente descrita em termos de sua atividade no IS e durante a inflamação. Evidências acumuladas apontam para um papel essencial da IL-6 no desenvolvimento, diferenciação, regeneração e degeneração dos neurônios no sistema nervoso central (CNS) e periférico. Os maiores locais de síntese de IL-6 são os neurônios e células da glia. As funções da IL-6 são mediadas por um sistema de receptor específico composto de um ligante e um sinal transdutor. A IL-6 pode exercer ações completamente opostas sobre os neurônios, gerando sobrevivência neuronal após injúria ou causando degeneração e morte celular em algumas desordens [50].

Tilgner et al [143] apontaram um envolvimento da IL-6 na proliferação e ativação das células gliais relacionadas com desordens neurodegenerativas como a PD. No entanto, Akynea et al [2] evidenciou um fator protetor da IL-6 a várias subpopulações de neurônios de algumas formas de insulto neuronal, incluindo a neurotoxicidade por MPP⁺. Cardenas and Bolin [22] adicionaram que na ausência de IL-6, os neurônios dopaminérgicos são mais vulneráveis ao MPTP.

Uma marcada observação suporta um envolvimento potencial da IL-6 na PD, devido a sua imunoreatividade elevada na região dopaminérgica nigroestriatal dos pacientes com PD [92][98]. Em concordância com este estudo, pacientes com PD demonstram elevados níveis de IL-6 no CSF [18][95][98].

Müller et al [95] ao encontrar níveis elevados de IL-6 no CSF de pacientes com PD identificou uma correlação inversa com a gravidade da doença, especialmente para bradicinesia mais do que para rigidez e sem alteração para tremor, sugerindo que uma maior regulação de IL-6 ocorre no início ou na fase inicial do processo degenerativo. A intensidade da doença foi avaliada pela escala UPDRS (Escala Unificada de Classificação da PD) e a parte III desta foi subdividida segundo os sintomas predominantes bradicinesia, tremor e rigidez.

Bessler et al [14] suporta a hipótese de que drogas dopaminérgicas alteram o IS, apontando a L-DOPA como uma droga capaz de exercer um efeito imuno-modulatório, estimulando a produção de IL-6. No entanto, estudos sugerem que níveis aumentados de citocinas na PD podem não ser um efeito secundário a terapia com L-DOPA [98][93].

Níveis elevados de IL-6 não foram identificados no plasma de pacientes com PD [136][20], sendo que um estudo de Blum-Degen et al [18] encontrou concentrações plasmáticas de IL-6 reduzidas na PD, mas sem significado estatístico comparado com controles.

Como na doença de Alzheimer, não se conhece a ligação da IL-6 com a patogênese da PD.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o nível de interleucina-6 no soro de pacientes com PD em atendimento no Ambulatório de Distúrbios do Movimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Específicos

- Comparar o conteúdo desta interleucina no soro de pacientes com PD com o de indivíduos controles.
- Estudar alterações no nível desta interleucina no soro de pacientes com PD em relação à utilização de levodopa.
- Relacionar o nível desta proteína com o tempo de doença, graus de envolvimento neurológico e o estágio da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000). Cellular and Molecular Immunology, 4ed, WB Saunders Company, 235-269.
2. Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H (1995). Interleukin-1 β enhances survival and interleukin-6 protects against MPP-neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Expl Neurol*, 136, 44-52.
3. Akiyama H, Barger S, Barnum S et al (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21, 383-421.
4. Andersen JK (2001). Do alterations in glutathione and iron levels contribute to pathology associated with Parkinson's disease? *Novartis Foundation Symposium*, 235, 11-20.
5. Ashok PP, Radhakrishnan K, Sridharan R, et al (1986). Parkinsonism in Benghazi, East Libya. *Clin Neurol Neurosurg*, 88, 109-113.
6. Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW (1985). Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, 35, 949-956.
7. Bandmann O, Marsden CD, Wood NW (1998). Genetic aspects of Parkinson's disease. *Mov Dis*, 13, 203-211.
8. Barbeau A (1961). Dopamine and basal ganglia disease. *Arch Neurol*, 4, 97-102.
9. Barbeau A, Pourcher E (1982). New data on the genetics of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 9, 53-60.

10. Bem-Shlomo Y (1996). How far are we in understanding the cause of Parkinson's disease? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 61, 4-16.
11. Ben-Schachar D, Eshel G, Riederer P, Youdim MBH (1992). Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 32, S105-110.
12. Bennett JP (1999). Free radicals, oxidative stress and the origin of Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 170, 75-6.
13. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of Neurological Science*, 20, 415-455.
14. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M (1999). IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed & Pharmacother*, 53, 141-145.
15. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen J (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6), 1037.
16. Bharucha NE, Stokes L, Schoenberg BS, et al (1986). A case-control study of tarinpeira discordant for Parkinson's disease: A search for environmental risk factors. *Neurology*, 36, 284-288.
17. Bharucha NE, Bharucha EP, Bharucha AE et al (1988). Prevalence of Parkinson's disease in the Parsi community of Bombay, India. *Arch Neurol*, 45, 1321-1323.

18. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W et al (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202, 17-20.
19. Burke RE (1998). Programmed cell death and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13(suppl 1), 17-23.
20. Cadet P, Zhu W, Mantione K, Rymer M, Dardik I, Reisman S, Hagberg S, Stefano GB (2003). Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med*, 12(4), 485-492.
21. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E et al (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1061-1065.
22. Cardenas H, Bolin LM (2003). Compromised reactive microgliosis in MPTP-lesioned IL-6 KO mice. *Brain Res*, 985(1), 89-97.
23. Choi P, Ostrerova-Golts N, Sparkman D, Cochran E, Lee JM, Wolozin B (2000). Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport*, 11, 2635-2638.
24. Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001). Parkin ubiquitinates the alphasynuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy body formation in Parkinson disease. *Nat Med*, 7, 1144-1150.
25. Ciesielska A, Joniec T, Przybylkowski A et al (2003). Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a

- murine model of the Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 63, 117-126.
26. Collins RC (1998). Doença de Parkinson e atrofia de múltiplos sistemas. In: Collins RC. *Neurologia*. 2ed, São Paulo, Guanabara-Koogan, 127-137.
27. Cztonkowska A, Jastrzebska IK, Cztonkowski A, Peter D, Stefano GB (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. *MedSci Monit*, 8(8), RA165-177.
28. D'Alessandro R, Gamberini G, Granieri E, et al (1987). Prevalence of Parkinson's disease in the Republic of San Marino. *Neurology*, 37, 1679-1682.
29. David IG, Peter LL (1997). Parkinson's disease. In: Greenfield JG, Lantos PL (eds). *Greenfield's Neuropathology*, 6th, London, Edward Arnold, 2, 286-291.
30. Davis GC, Williams AC, Markey SP et al (1979). Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*, 1, 249-254.
31. Davis WP Jr, Russel HS (1998). Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson's disease. *Am J Hum Genet*, 62, 758-762.
32. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1992). A novel messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol*, 32, 297-311.
33. Dexter DT, Wells FR, Agid F, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1987). Increased nigral iron content in post mortem parkinsonian brain. *Lancet*, 2(8569), 1219-1220.
34. Dimsdale H (1946). Changes in the Parkinson syndrome in the twentieth century. *Q J Med*, 15, 155-170.

35. Dulaney E, Stern M, Hurtig H et al (1990). The epidemiology of Parkinson's disease: A case-control study of young-onset versus old-onset patients. *Movement Dis*, 5(suppl 1), 12.
36. Earle KM (1968). Studies on Parkinson's disease including x-ray fluorescent spectroscopy of formalin fixed tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*, 27, 1-14.
37. Ehmeier KP, Mutch WJ, Calder SA et al (1989). Does idiopathic parkinsonism in Aberdeen follow intrauterine influenza? *J Neurol Neurosurg Psych*, 52, 911-913.
38. Fahn S, Cohen G (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*, 32, 804-812.
39. Fahn S (1998). Distúrbios do movimento. In: Merritt HH, Howland LP. *Trabalho de neurologia*. 9ed, São Paulo, Guanabara-Koogan, 563-576.
40. Fazzini E, Fleming J, Fahn S (1990). Cerebrospinal fluid antibodies to coronaviruses in patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 40(suppl1), 169.
41. Fearnley JM, Lees AJ (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional reactivity. *Brain*, 114, 2283-2301.
42. Fearnley J, Lees A (1996). Parkinson's disease: neuropathology. In: Watts RL, Koller WC (eds), *Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice*, New York, McGraw-Hill, 263-278.
43. Finger S (1994). Some movement disorders. In: Finger S. *Origins of Neuroscience. A History of Explorations into Brain Function*, New York, Oxford University Press, 223-228.
44. Fiszer U, Piotrowska K, Korlak J, Czlonkowska A (1991). The immunological status in Parkinson's disease. *Med Lab Sci*, 48, 196-200.

45. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Olsson T, Link H (1994). Gamma delta⁺ cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 121, 39-45.
46. Foley P, Riederer P (2000). Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J Neurol*, 247(2), 1182-94.
47. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N et al (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *Journal of Neuroscience*, 22, RC216.
48. Forsberg L, Faire U, Morgenstern R (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys*, 389, 84-93.
49. Fowler SB (1997). Hope and a health-promoting lifestyle in persons with Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Nursing*, 29(suppl 2), 111-116.
50. Gadiant RA, Otten UH (1997). Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurology*, 52, 379-390.
51. Gasser T (2001). Molecular genetics of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 86, 23-32.
52. Gibb W, Lees AJ (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 51, 745-752.
53. Gibb WR, Mountjoy CQ, Mann DM, Lees AJ (1989). A pathological study of the association between Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 52, 701-708.

54. Gibb WRG, Scott T, Lees AJ (1991). Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 6, 2.
55. Gibb WRG (1992). Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurologic Clinics*, 10, 361-376.
56. Gibb WRG, Lees AJ (1994). Pathological clues to the cause of Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S (eds). *Movement Disorders*, 3rd, Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd, 145-166.
57. Goetz C, Bonduelle M, Gelfand T (1995). *Charcot. Constructing Neurology*. New York, Oxford University Press.
58. Golbe L, Langston JW (1993). The etiology of Parkinson's disease: new directions for research. In: Jankovic J, Tolosa E (eds), *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, 2nd, Baltimore, Williams & Wilkins, 93-102.
59. Goldman S, Tanner C (1998). Etiology of Parkinson's disease. In: Jankovic J, Tolosa E (eds.) *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, 3rd, Baltimore, Williams & Wilkins, 133-158.
60. Good PF, Hsu A, Werner P et al (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57, 338-342.
61. Gorell J, Johnson C, Rybicki B, Peterson E, Richardson R (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50, 1346-1350.
62. Götz ME, Freyberger A, Riederer P (1990). Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 29, S241-249.
63. Graham JM, Paley MN, Grunewald RA et al (2000). Brain iron deposition in Parkinson's disease imaged using the PRIME magnetic resonance sequence. *Brain*, 123, 2423-2431.

64. Graybiel AM (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 13, 244-253.
65. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M et al (1991). Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*, 40, 445-452.
66. Harada H, Nishikawa S, Takahashi K (1983). Epidemiology of Parkinson's disease in a Japanese city. *Arch Neurol*, 40, 151-154.
67. Hirano A (1992). The central nervous system. *Diagnostic Ultra structure of Non-Neoplastic Diseases*, 23, 551-553.
68. Ishikawa A, Takahashi H (1998). Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism. *J Neurol*, 245(11 suppl 3), P4-9.
69. Jenner P, Schapira AHV, Marsden CD (1992a). New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*, 42, 2241-2250.
70. Jenner P, Olanow CW (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44(3 Suppl 1), S72-84.
71. Johansson S, Stromberg I (2002). Guidance of dopaminergic neuritic growth by immature astrocytes in organotypic cultures of rat fetal ventral mesencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 443, 237-249.
72. Kessler II (1972). Epidemiologic studies of Parkinson's disease. A hospital-based survey. *Am J Epidemiol*, 95, 308-318.
73. Klein C (2001). The genetics of Parkinson's disease. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 90, 1015-1023.
74. Koller W, Vetereoverfield B, Gray C et al (1990). Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology*; 40, 1218-1221.

75. Koutsilieris E, Scheller C, Tribl F, Riederer P (2002). Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress-microglial contribution. *Parkinsonism Relat Disord*, 8(6), 401.
76. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 18, 106-108.
77. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-980.
78. Li SC, Schoenberg BS, Wang CC et al (1985). A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic of China. *Arch Neurol*, 42, 655-657.
79. Limongi JCP (1996). Etiopatogenia. In: Meneses MS, Teive HAG (eds). *Doença de Parkinson. Aspectos Clínicos e Cirúrgicos*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 37-50.
80. Lowe J, Leigh PN (2002). Disorders of movement and system degeneration. In: Greenfield JG, Lantos P (eds). *Greenfield's Neuropathology*, 7th, London, Edward Arnold, 2, 329-336.
81. Marsden CD (1987). Twins and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psych*, 50, 105-106.
82. Marttila RJ, Rinne UK (1967). Epidemiology of Parkinson's disease in Finland. *Acta Neurol Scand*, 43(suppl 33), 9-61.
83. Marttila RJ, Eskola J, Paivarinta M, Rinne UK (1984). Immune functions in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 40, 315-323.

84. Marttila RJ, Soppi E, Rinne UK (1985). Immune functions in Parkinson's disease subsets, concanavalin A induced suppressor cell activity and in vitro immunoglobulin production. *J Neurol Sci*, 69, 121-131.
85. Marttila RJ, Kaprio J, Koshevuo M, Rinne UK (1988). Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology*, 38, 1217-1219.
86. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S et al (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*, 60, 588-596.
87. Mattock C, Marmot M, Stern G (1988). Could Parkinson's disease follow intrauterine influenza? A speculative hypothesis. *J Neurol Neurosurg Psych*, 51, 753-756.
88. Meneses MS, Teive HAG (eds) (2003). *Doença de Parkinson*, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 3-63.
89. Mizuno Y, Sone N, Saitoh T (1987). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem*, 48, 1787-1793.
90. Mizuno Y, Ikebe SI, Hattori N et al (1997). Etiology of Parkinson's disease. In: Watts RL, Koller WC (eds). *Movement Disorders Neurologic Principles and Practice*. New York, McGraw-Hill, 161-182.
91. Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S et al (1998). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44(3 Suppl 1), 599-609.
92. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and

- transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 180, 147-150.
93. Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T (1999a). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- α induction. *Neuroscience Letters*, 268, 101-104.
 94. Mosmann T (1996). Cytokines and immune regulation. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W (eds). *Clinical Immunology Principles and Practice*, St Louis, Mosby-Year Book Inc, 217-230.
 95. Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W (1998). Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlates to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 98, 142-144.
 96. Mutch WJ, Dingwall-Fordyce I, Downie AW et al (1986). Parkinson's disease in a Scottish city. *Br Med J*, 292, 534-536.
 97. Mytilineou C, Kramer B, Yabut J (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord*, 8(6), 385.
 98. Nagatsu T (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Transm*, 109, 731-745.
 99. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine. *Life Sciences*, 36, 2503-2508.

100. Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E et al (2000). Influence of interleukin-1 beta gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 284, 73-76.
101. Okada K, Kobayashi S, Tsunematsu T (1990). Prevalence of Parkinson's disease in Izumo City, Japan. *Gerontology*, 36, 340-344.
102. Olanow CW (1990). Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*, 40, 32-37.
103. Olanow CW (1992). An introduction to the free-radical hypothesis in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 32, S 2-9.
104. Olanow CW, Jenner P, Tatton WG (1998). Neurodegeneration and Parkinson's disease. In: Jankovic J, Tolosa E. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, 3rd, Baltimore, Williams & Wilkins, 67-103.
105. Osuntokun BO (1971). The pattern of neurological illness in tropical Africa: experience at Ibadan, Nigeria. *J Neurol Sci*, 12, 417.
106. Owen AD, Schapira AH, Jenner P et al (1997). Indices of oxidative stress in Parkinson's disease. *Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. J Neural Transm Suppl*, 51, 167-173.
107. Paddison RM, Griffith RP (1974). Occurrence of Parkinson's disease in black patients at Charity Hospital in New Orleans. *Neurology*, 24, 688-690.
108. Papadimitriou A, Veletza V, Hadjigeorgiou GM et al (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology*, 52, 651-654.
109. Papapetropoulos S, Paschalis C, Athanassiadou A et al (2001). Clinical phenotype in patients with alpha-synuclein Parkinson's disease living in

- Greece in comparison with patients with sporadic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70, 662-665.
110. Parkinson J (1817). *An Essay on the Shaking Palsy*. London, Whittingham & Rowland.
 111. Parkinsonism and akinetic-rigid disorders (1998). *Neuropathology*, 28, 1-28.
 112. Pearce JMS (1989). Aspects of the history of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, special supplement, 6-10.
 113. Pearce JMS (1992). History of Parkinson's disease, In: Pearce JMS. *Parkinson's Disease and Its Management*, Oxford, Oxford University Press, 4-12.
 114. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E et al (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-2047.
 115. Polymeropoulos MH (1998). Autosomal dominant Parkinson's disease and alpha-synuclein. *Ann Neurol*, 44(3 Suppl 1), 563-564.
 116. Przedborski S, Jackson-Lewis V (1998). Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. *Curr Opin Neurol*, 11, 335-339.
 117. Putnam TJ (1940). Treatment of unilateral paralysis agitans by section of the lateral pyramidal tract. *Arch Neurol Psych*, 44, 950-956.
 118. Rajput AH, Offord KP, Beard MC, Kurland LT (1984). Epidemiology of Parkinson's disease. Incidence, classification and mortality. *Ann Neurol*, 16, 278-287.

119. Rich R, Fleisher T, Shearer W, Kotzin B, Schroeder H (2001). Clinical Immunology. Principles and practice, 2ed, CV Mosby, 2, 2036-2044.
120. Rieder CRM, Bianchin MM, Schröder N (2000). Doenças neurológicas e alterações do comportamento: doença de Parkinson. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 257-270.
121. Rieder CRM, Parsons RB, Fitch NJ, Williams AC, Ramsden DB (2000). Human brain cytochrome P450 1B1: immunohistochemical localization in human temporal lobe and induction by dimethylbenz(a)anthracene in astrocytoma cell line (MOG-G-CCM). *Neurosci Lett*, 278, 177-180.
122. Rieder CRM, Bianchin M, Schröder N (2003). Aspectos neuropsiquiátricos da doença de Parkinson. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I (org). Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos, 2ed, Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 1, 417-427.
123. Rocca WA, Morgante M, Grigoletto F et al (1990). Prevalence of Parkinson's disease and other parkinsonisms: a door-to-door survey in two Sicilian communities. *Neurology*, 40(suppl 1), 422.
124. Rosati G, Granieri E, Pinna L et al (1980). The risk of Parkinson's disease in Mediterranean people. *Neurology*, 30, 250-255.
125. Russel HS, Janice KP, Scott WM, John N, Davis II, Patricia AT, Jermy BT, James P, Bennett G, Frederick W, Robert E, Davis W, Davis P (1998). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases*, 11, 67-75.

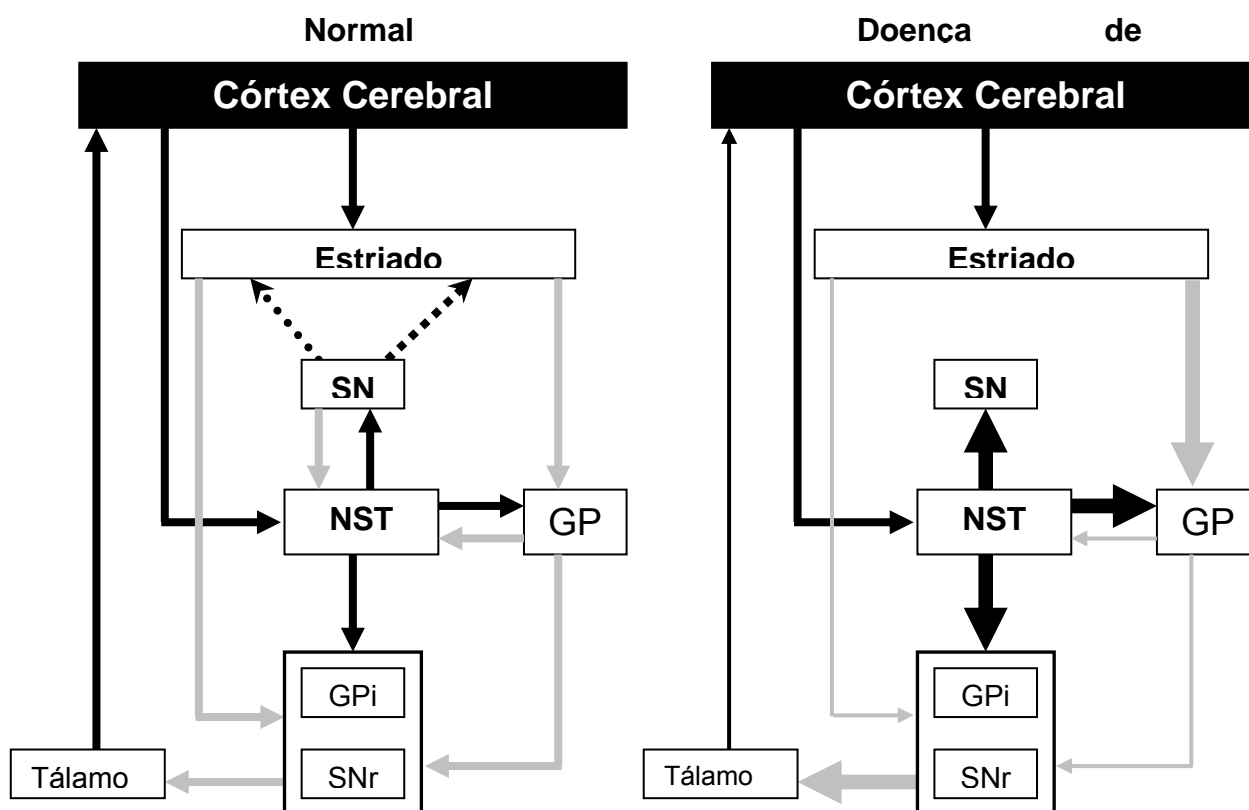
126. Sayre LM, Smith MA, Perry G (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem*, 8, 721-738.
127. Schapira AH, Gu M, Taanman JW et al (1998). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44(3 Suppl 1), 589-98.
128. Schoenberg BS, Anderson DW, Haerer AF (1985). Prevalence of Parkinson's disease in the biracial population of Copiah County, Mississippi. *Neurology*, 35, 841-845.
129. Schoenberg BS, Osuntokun BO, Adeuja AOG et al (1988). Comparison of the prevalence of Parkinson's disease in black populations in the rural US and in rural Nigeria: door-to-door community studies. *Neurology*, 38, 645-646.
130. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J et al (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, 267, 4904-4911.
131. Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Masterman D, Mastaglia F, Laing NG, Stajich JM, Slotterbeck B, Booze MW, Ribble RC, Rampersaud E, West SG, Gibson RA, Middleton LT, Roses AD, Haines JL, Scott BL, Vance JM, Pericak-Vance MA (2001). Complete genomic screen in Parkinson disease: Evidence for multiple genes. *JAMA*, 286(18), 2239-2244.
132. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG (1992). Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42, 1328-1335.

133. Snyder SH, Damato RJ (1985). Neurology: predicting Parkinson's disease. *Nature*, 317, 198-199.
134. Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm*, 74, 199-205.
135. Strijbos PJ, Rothwell NJ (1995). Interleukin-I beta attenuates excitatory aminoacid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*, 15, 3468-3474.
136. Stypula G, Kunert-Radek J, Stephen H, Zylinska K, Pawlikowski M (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*, 3, 131-4.
137. Sutcliffe RLG, Prior R, Mawby B, McQuillan WJ (1985). Parkinson's disease in the district of the Northampton Health Authority, United Kingdom. *Acta Neurol Scand*, 72, 363-379.
138. Tanner CM, Chen B, Wang W et al (1987). Environmental factors in the etiology of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 14, 419-423.
139. Tanner CM, Chen B, Wang W et al (1989). Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China. *Neurology*, 39, 660-664.
140. Tanner CM, Langston JW (1990). Do environmental toxins cause Parkinson's disease - a critical review. *Neurology*, 40, 17-30.

141. Tanner CM (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. In: Cedarbaum JM, Ganchar ST. *Neurologic Clinics*. Philadelphia, WB Saunders Company, 10 (number 2), 317-329.
142. Temlett JA (1996). Parkinson's disease: biology and etiology. *Curr Opin Neurobiol*, 9, 303-307.
143. Tilgner J, Volk B, Kaltschmidt C (2001). Continuous interleukin-6 application in vivo via macroencapsulation of interleukin-6-expressing COS-7 cells induces massive gliosis. *Glia*, 35(3), 234-245.
144. Tyler KL, Tyler R (1986). The secret life of James Parkinson (1755-1824): the writings of Old Hubert. *Neurology*, 36, 222-224.
145. Vaughan JR, Davis MB, Wood NW (2001). Genetics of parkinsonism: a review. *Ann Hum Genet*, 65, 111-116.
146. Vierregge P, Schiffke A, Kompf D (1991). Parkinson's disease in twins. *Neurology*, 41(suppl), 255.
147. Vila M, Przedborski S (2004). Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med*, 10, S 58-62.
148. Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE et al (1983). Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology*, 33, 815-824.
149. Wood N (1997). Genes and Parkinsonism. *J Neurol, Neurosurgery and Psychiatry*; 62, 305-309.
150. Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM (2000). Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 7, 240-250.
151. Zimmerman TR, Bhatt M, Calne DB, Duvoisin RC (1991). Parkinson's disease in monozygotic twins: a followup. *Neurology*, 41(suppl), 255.

152. Ziv I, Melamed E (1998). Role of apoptosis in the pathogenesis of Parkinson's disease: a novel therapeutic opportunity? *Movement Disorders*, 13, 865-870.

Figura 1. Diagrama esquemático ilustrando as alterações que ocorrem na organização funcional dos núcleos da base na PD. A espessura relativa das setas, no esquema à direita, indica o grau de ativação / inibição das vias por elas representadas na PD. As setas pretas representam projeções glutamatérgicas excitatórias, setas cinza representam projeções GABAérgicas inibitórias. A linha pontilhada representa a projeção que vai da SN_c ao estriado (via nigroestriatal), que é dopaminérgica. Na PD a degeneração da via nigroestriatal resulta em alterações nas vias estriato-palidais, que levam a uma hiperatividade das projeções subtalâmicas excitatórias aos núcleos de saída. Como resultado final, a atividade GABAérgica dos núcleos de saída encontra-se potencializada, o que representa um aumento da inibição exercida sobre o tálamo motor, e conseqüentemente uma redução na sinalização tálamo-cortical [122].



ARTIGO EM INGLÊS

INTERLEUKIN-6 SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

Kerly Wollmeister Hofmann¹, Daniele Fricke², Renata Leke³, Arthur Francisco Schumacher Schuh⁴, Luis Valmor Cruz Portela⁵, Márcia Lorena Fagundes Chaves⁶, Carlos Roberto de Mello Rieder⁷.

¹Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: kerly.hofmann@terra.com.br

²Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴Aluno de Graduação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Professor Doutor do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁶Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Coordenador do Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

ABSTRACT: Interleukin-6 (IL-6) plasma concentrations were not found elevated in Parkinson's disease (PD) patients. Aim of this study was to evaluate IL-6 serum levels in PD patients and the effects of drugs and disease severity on it. The IL-6 levels ($P > 0.05$) between PD patients and controls were similar. However, IL-6 higher levels correlated negatively with the Activities of Daily Living (ADL) scale ($r = - 0,457$; $P < 0.05$). Our results suggest that only marginal effects occur on the peripheral immune system, and that the role of IL-6 on disease progression needs to be elucidated.

KEYWORDS: Interleukin-6, Parkinson's disease, cytokines, levodopa.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is characterized by a loss of dopamine (DA) in the striatum caused by a degeneration of dopaminergic neurons in the zone compact of the substantia nigra [1][2]. Although many different hypotheses have been studied, the PD is a degenerative disorder of unknown etiology [3]. Several lines of evidence suggest that neuroimmune mechanisms may be involved in the neurodegenerative process. Both microglia and astrocytes are the sources of the potentially toxic compounds that may aggravate neuronal injury during degenerative processes in PD. Astrocytes are generally known for their protective actions towards neurons [4]. They secrete neurotrophic factors. In contrast to these protective effects astrocytes may produce pro-inflammatory cytokines and nitric oxide [5].

It has been suggested that pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) induce neurodegeneration in the brains of patients suffering from Alzheimer's disease. The inflammatory cytokine IL-6 might also be involved in the pathology of PD. The inflammatory reaction may be related to neurodegeneration as these cytokines increase leukocyte adhesion and migration, disrupt the blood-brain barrier and induce glial cell activation. This could subsequently lead to the overproduction of reactive oxygen species, the induction of apoptosis or a-specific cytolysis induced by the activation of the complement system [3].

Pro-inflammatory cytokines are secreted by immunocompetent cells but also by glia and neurons [3]. IL-6, a member of the neuropoietic cytokine family, induces acute phase protein synthesis, differentiation of neuronal cells and

improves catecholaminergic and cholinergic cell survival [6][7]. IL-6 may support regenerative processes in the brain [8]. There is an involvement of IL-6 in the proliferation and activation of glial cells, seen in neurodegenerative disorders [9].

Elevated IL-6 levels in the nigrostriatal region of postmortem brain [10][11] and in the cerebrospinal fluid (CSF) [11][12][13] were reported in PD. IL-6 higher levels in CSF in PD were associated with the beginning of the degenerative process [13]. The IL-6 plasma concentrations were not different between PD patients [12][14][15]. A study found that levodopa (L-DOPA), in physiological concentrations (mean daily dosage 575 ± 230 mg), presented an immuno-modulatory effect on cells from both PD patients and controls, and caused a stimulation of IL-6 production [16]. However, other work suggested that the increased cytokine levels in PD patients might not be due to the secondary effects of L-DOPA therapy [17].

In the present work, we studied IL-6 serum levels in patients with PD treated and not treated and in control subjects using high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). We also assessed the correlations between their serum levels and some clinical feature.

MATERIAL AND METHODS

Patients and controls

Serum was collected from 40 patients (23 PD patients receiving L-DOPA and 17 virgin of therapy) from the Movement Disorders Clinics of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients were examined by a neurologist and were diagnosed as having probable PD using as criteria the presence of three of four cardinal features (rest tremor, muscle rigidity, bradykinesia and asymmetric onset) and no alternative explanations for the findings [18]. Furthermore, all patients showed a good response to L-DOPA. The patients that had been recently diagnosed were followed after treatment and were excluded of the study when not showed a good response to antiparkinsonian drugs, these patients were selected from a screening of individuals of the community through external communication (newspaper). Age varied from 41 to 84 years.

PD patients treated with antiparkinsonian drug received only L-DOPA associated to a dopa-decarboxylase inhibitor; already these received attendance from the Movement Disorders Clinics of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Age varied from 52 to 83 years.

A similar age and sex community group (n=23) without neurological findings or disorders affecting the central nervous system (CNS) was selected as the comparison group for the study. Age varied from 48 to 76 years. They were selected of individuals of the community.

The clinical stage of PD was evaluated according to the classification of Hoehn and Yahr (HY) [19], in which higher values represent to higher degree of

dependence and the Schwab and England Activities of Daily Living (ADL) scale [20], in which smaller values are associated to higher degree of severity of disease. Subjects with metabolic disturbances, other neurological diseases except PD or with inflammation or infectious disorder were excluded. The exclusion criteria were the same between patients and controls. Drugs and comorbidities were controlled in both groups. All subjects gave informed consent. The medical ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the research project.

Blood samples (5 ml) from patients and controls were collected without anticoagulant and sera were frozen at -70°C until analyzed.

Interleukin-6

The Biotrak™ human (h) IL-6 ELISA system from Amersham Biosciences was used for measuring IL-6 in serum of all patients and controls. The assay system is based on a solid phase ELISA, which utilizes an antibody for (h) IL-6 bound to the wells of a microtitre plate together with an antibody to (h) IL-6 conjugated to biotin and streptavidin-HRP detection. The optical density was determined at 450 nm.

Statistical Analysis

Comparison between the three groups was made by using the Chi-square test for gender and the one-way analysis of variance (ANOVA) (Tukey test) for age and IL-6. Statistical analysis, between the groups of PD patients

with L-DOPA therapy and the virgin of therapy, were performed with Chi-square (Yates Correction) test for first symptom and predominant symptom, t-test for time of disease, and Mann-Whitney test for HY and ADL scales. To evaluate the role of L-DOPA in creating immunological alterations, IL-6 serum levels of patients receiving L-DOPA treatment and PD patients without antiparkinsonian drug therapy were compared using the t-test. Correlations are presented with Pearson's coefficient, for IL-6 within the group treated. $P < 0,05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The demographic, biochemical and clinical characteristics of patients and controls are depicted in Table 1. The age ($P > 0.05$) and the gender ($P = 0.097$) were not statistically different in three groups ($P > 0.05$). There was not statistic difference between PD patients treated and not treated for first symptom ($P = 0.749$), predominant symptom ($P = 0.23$) and HY ($P = 0.155$) and ADL ($P = 0.807$) scales. Figure 1 shows that the IL-6 serum concentrations were similar in three groups.

IL-6 levels did not vary between PD patients that are treated with L-DOPA (mean daily dosage 563.0 ± 242.8 mg) and the no treated ($P = 0.328$).

IL-6 serum concentrations in the group with L-DOPA therapy presented a negative correlation with ADL scale (which decreases with the severity of PD) ($r = -0.457$, $P < 0.05$) (Fig.2). However, there were not associations between L-DOPA dosage, time of disease (Fig.3), HY scale and IL-6 levels in this group. Furthermore, time of disease not presented correlation with ADL scale (Fig.3), but with HY scale presented correlation positive ($r = 0.485$, $P < 0.02$).

DISCUSSION

The present study detected not a significant difference of IL-6 in the serum of PD patients in relation to the control. Other authors showed this same result in plasma of PD patients [12][14][15]. A study [12] compared IL-6 levels between control subjects, PD and Alzheimer's disease patients by ELISA, PD patients were rated in the stages I to III according to HY. Other study [14] examined IL-6 plasma concentrations in patients with PD without any previous treatment. Already other study [15] analyzed IL-6 levels in PD patients by ELISA in four different phases according to a cyclic exercise protocol; blood samples were drawn before the exercise session. However, elevated IL-6 levels in the CSF [11][12][13] and nigrostriatal dopaminergic region [10][11] of PD patients were well documented.

One of the objectives of the present study was to detect the effect of L-DOPA on IL-6 levels in serum. A study suggested that the alterations of the cytokines levels in PD patients might not be due to the secondary effects of L-DOPA therapy [17]; while other attributed to the drug itself a stimulatory effect on IL-6 production [16]. We found not alterations in the IL-6 levels with to L-DOPA administration.

Abnormal immune functions have been postulated to be one of the mechanisms underlying the pathogenesis of PD. The evidence for such mechanisms include the alterations of cytokines production by brain of patients with PD [21][22]. IL-6 is known to play a key role in the interaction between the nervous and immune system, e.g., in the so-called acute phase response [12].

Although glial cells may be involved in the pathophysiology of several degenerative diseases, they have been poorly studied in PD. Recent evidence supports the possibility that glial cells secrete factors that have either protective or deleterious effects on dopaminergic neurons [23]. Signals that activate microglia [7][24][25] and astrocytes [7][24][26][27][28][29][30] such as neurotransmitters (e.g. noradrenaline, histamine, substance P) and inflammatory mediators trigger IL-6 synthesis and release.

As in astrocytes, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β e TNF α are potent stimulators of neuronal IL-6 synthesis [31]. The fact that IL-6 synthesis in brain cells may be induced by pro-inflammatory cytokines and neurotransmitters / neuropeptides, supports the concept of a tight cross-communication between neurons and glial involving IL-6. This may be of significance not only for maintaining brain homeostasis and neuronal differentiation, but also for pathological processes occurring during CNS neurodegeneration [32].

Cytokines synthesis may trigger neuronal injury, leading to apoptosis. Apoptosis prevents the release of toxic substances from dying cells, preventing the activation of aggressive inflammation. Histopathology of PD brains suggests the occurrence of an apoptotic process [3]. Therefore, these changes may be secondary or compensatory responses.

We found an inverse correlation between serum IL-6 levels and ADL scale, indicating that the progression of the disease was associated with the increased levels of IL-6. The patients with clinically less severe degree presented IL-6 levels similar to controls. The increase of this protein levels with the increase of the PD severity might be a consequence of neuronal damage of other brain regions, which occurs with the progression of PD. Furthermore,

inflammation initiate by neuronal damage in the striatum and substantia nigra in PD may aggravate the course of the disease [33]. The association suggested between high IL-6 levels in serum in patients with disease more advanced needs to be investigated; maybe the use of drug for bigger time or a lesion more diffuse of CNS can be an explanation.

In conclusion, our results suggest that only marginal effects occurs on the peripheral immune system, and that the neuroimmune dysfunctions found for other studies in post mortem brain and CSF in the PD patients seem to be limited to the CNS. A study [34] found that early IL-6 production in the CNS exceeded serum IL-6 levels by several orders of magnitude and that a correlation between CSF and serum IL-6 was found only after trauma and corresponded to a severe dysfunction of the blood-brain barrier.

ACKNOWLEDGEMENTS

CAPES and FINE-HCPA supported this work.

REFERENCES

1. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973). Brain Dopamine and the Syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, Morphological and Neurochemical Correlations. *Journal of Neurological Science*, 20, 415-55.
2. Hornykiewicz O (1993). Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol*, 60, 140-147.
3. Cztonkowska A, Jastrzebska IK, Cztonkowski A, Peter D, Stefano GB (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. *MedSci Monit*, 8(8), RA165-177.
4. Vila M, Jackson-Lewis V, Guegan C et al (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14, 483-489.
5. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B et al (1996). Nitric oxide synthesis and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363.
6. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M et al (1991). Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*, 40, 445-452.
7. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 β . *J Immunol*, 150, 2659-2667.
8. Woodroffe MN (1995). Cytokine production in the central nervous system. *Neurology*, 45, 6-10.

9. Tilgner J, Volk B, Kaltschmidt C (2001). Continuous interleukin-6 application in vivo via macroencapsulation of interleukin-6-expressing COS-7 cells induces massive gliosis. *Glia*, 35(3), 234-245.
10. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 180, 147-150.
11. Nagatsu T (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Transm*, 109, 731-745.
12. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W et al (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202, 17-20.
13. Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W (1998). Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlates to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 98, 142-144.
14. Stypula G, Kunert-Radek J, Stephen H, Zylinska K, Pawlikowski M (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*, 3, 131-4.
15. Cadet P, Zhu W, Mantione K, Rymer M, Dardik I, Reisman S, Hagberg S, Stefano GB (2003). Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med*, 12(4), 485-492.

16. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M (1999). IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed & Pharmacother*, 53, 141-145.
17. Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T (1999a). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- α induction. *Neuroscience Letters*, 268, 101-104.
18. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 56, 33-39.
19. Hoehn MM, Yahr MD (1967). Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*, 17, 427-442.
20. Schwab RS, England AC. (1969). In: Gillingham FJ, Donaldson MC (eds). Projection technique for evaluating surgery in Parkinson's disease. Third Symposium on Parkinson's disease. Edinburgh, UK: Livingstone, 152-157.
21. Marttila RJ, Soppa E, Rinne UK (1985). Immune functions in Parkinson's disease subsets, concanavalin A induced suppressor cell activity and in vitro immunoglobulin production. *J Neurol Sci*, 69, 121-131.
22. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Olsson T, Link H (1994). Gamma delta⁺ cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 121, 39-45.
23. Hertz I, Hansson F, Ronnback I (2001). Signaling and gene expression in the neuron-glia unit during brain function and dysfunction: Holger Hyden in memoriam. *Neurochem Int*, 39, 227-252.

24. Norris JG, Benveniste EN (1993). Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol*, 45, 137-146.
25. Sébire G, Emile D, Walton C, Héry C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M (1993). In vitro production of IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α by human embryonic microglial and neuronal cells. *J Immunol*, 150, 1517-1523.
26. Wesselingh SL, Gough NM, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ (1990). Detection of cytokine mRNA in astrocytes cultures using the polymerase chain reaction. *Lymph Cyt Res*, 9, 177-185.
27. Norris JG, Tang L, Sparacio SM, Benveniste EN (1994). Signal transduction pathways mediating astrocytes IL-6 induction by IL-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Immunol*, 152, 841-850.
28. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi M (1992). TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*, 583, 296-299.
29. Cadman ED, Witte DG, Lee C (1994b). Regulation of the release of interleukin-6 from human astrocytoma cells. *J Neurochem*, 63, 980-987.
30. Gritter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC (1994). Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol*, 51, 101-108.
31. Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA (1995). Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. *J Neuroimmunol*, 63, 113-123.
32. Gadiant RA, Otten UH (1997). Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurology*, 52, 379-390.

33. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinsons disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211.
34. Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C (1995). Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock*, 5, 311-317.

Table 1. Demographic, biochemical and clinical data of subjects evaluated. NP = not performed; * mean \pm SD.

	PD patients without treatment (n = 17)	PD patients with L- DOPA (n = 23)	Controls (n = 23)	P
Age (years)*	65.3 \pm 13.1	66.5 \pm 8.8	60.0 \pm 7.8	> 0.05
Gender (male/female) (%)	41.2/58.8	65.2/34.8	34.8/65.2	0.097
Time of disease (years)*	2.8 \pm 3.9	8.1 \pm 6.1	NP	0.002
First symptom (tremor/rigidity) (%)	82.4/17.6	78.3/21.7	NP	0.749
Predominant symptom (tremor/rigidity) (%)	82.4/17.6	65.2/34.8	NP	0.230
L-DOPA dosage*	NP	563.0 \pm 242.8	NP	-
HY scale (< 3/ \geq 3) (%)	70.6/29.4	47.8/52.2	NP	0.155
ADL scale (\geq 70/ < 70) (%)	64.7/35.3	60.9/39.1	NP	0.807

Figure 1. Serum IL-6 concentrations in three groups were measured by ELISA.

P > 0,05.

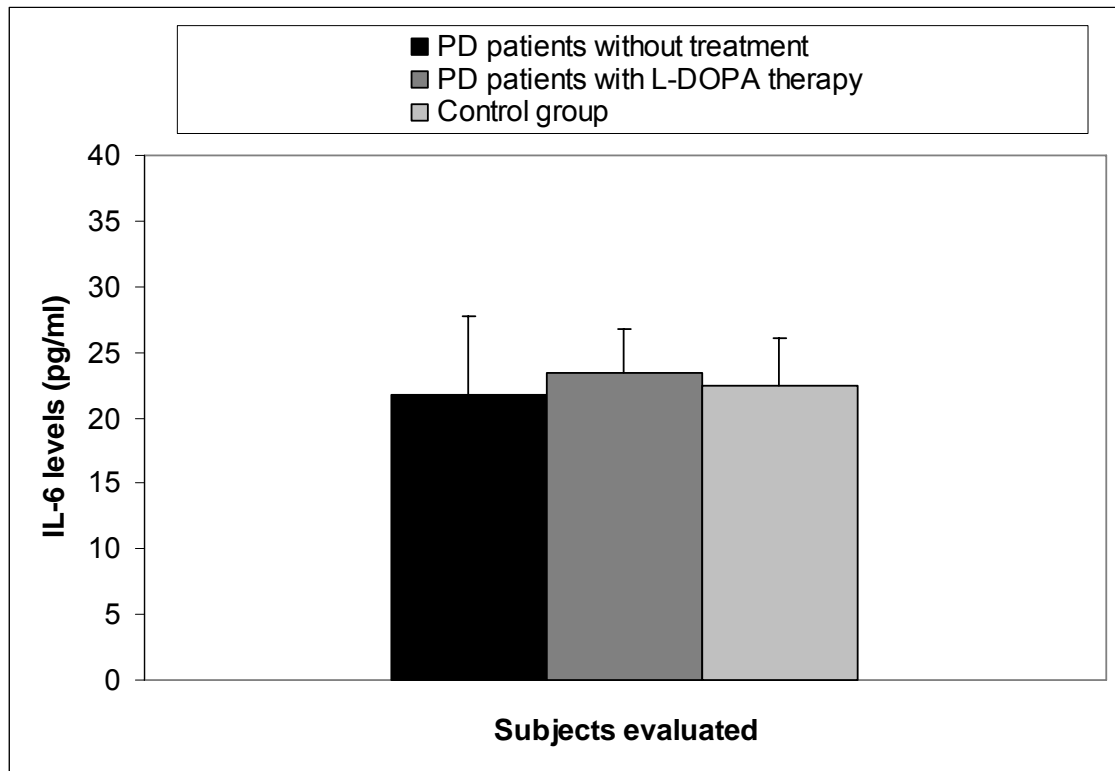


Figure 2. Correlation between ADL scale and IL-6 values in serum of the PD patients with L-DOPA treatment (n = 23; r = -0,457; p < 0,05).

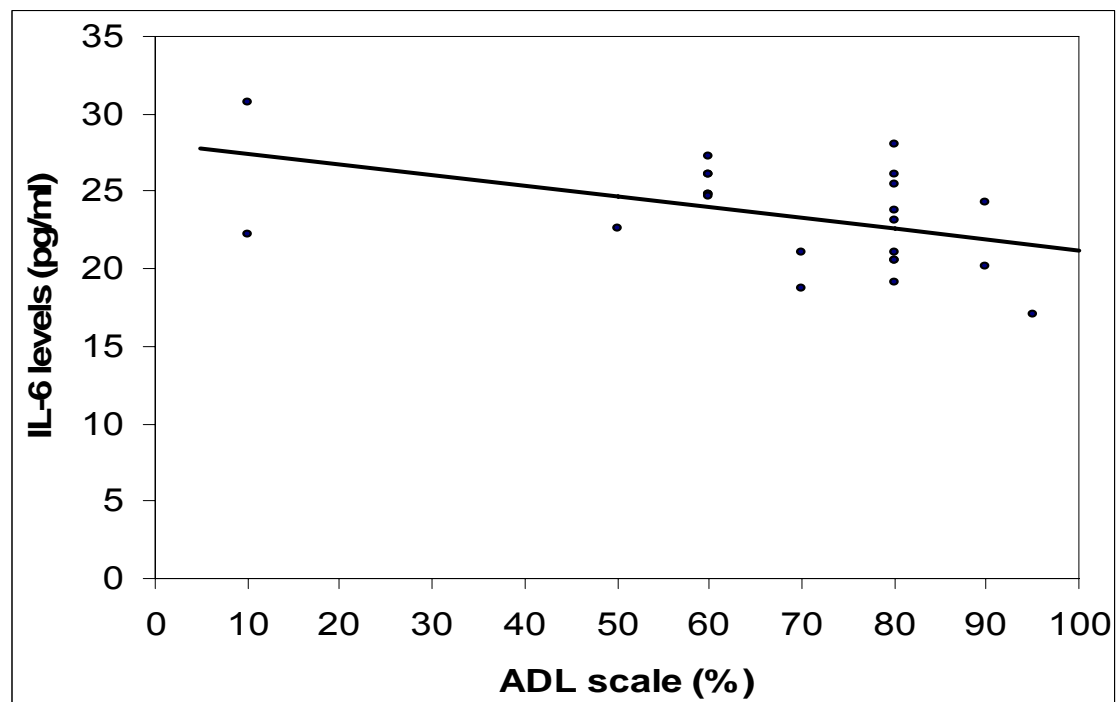
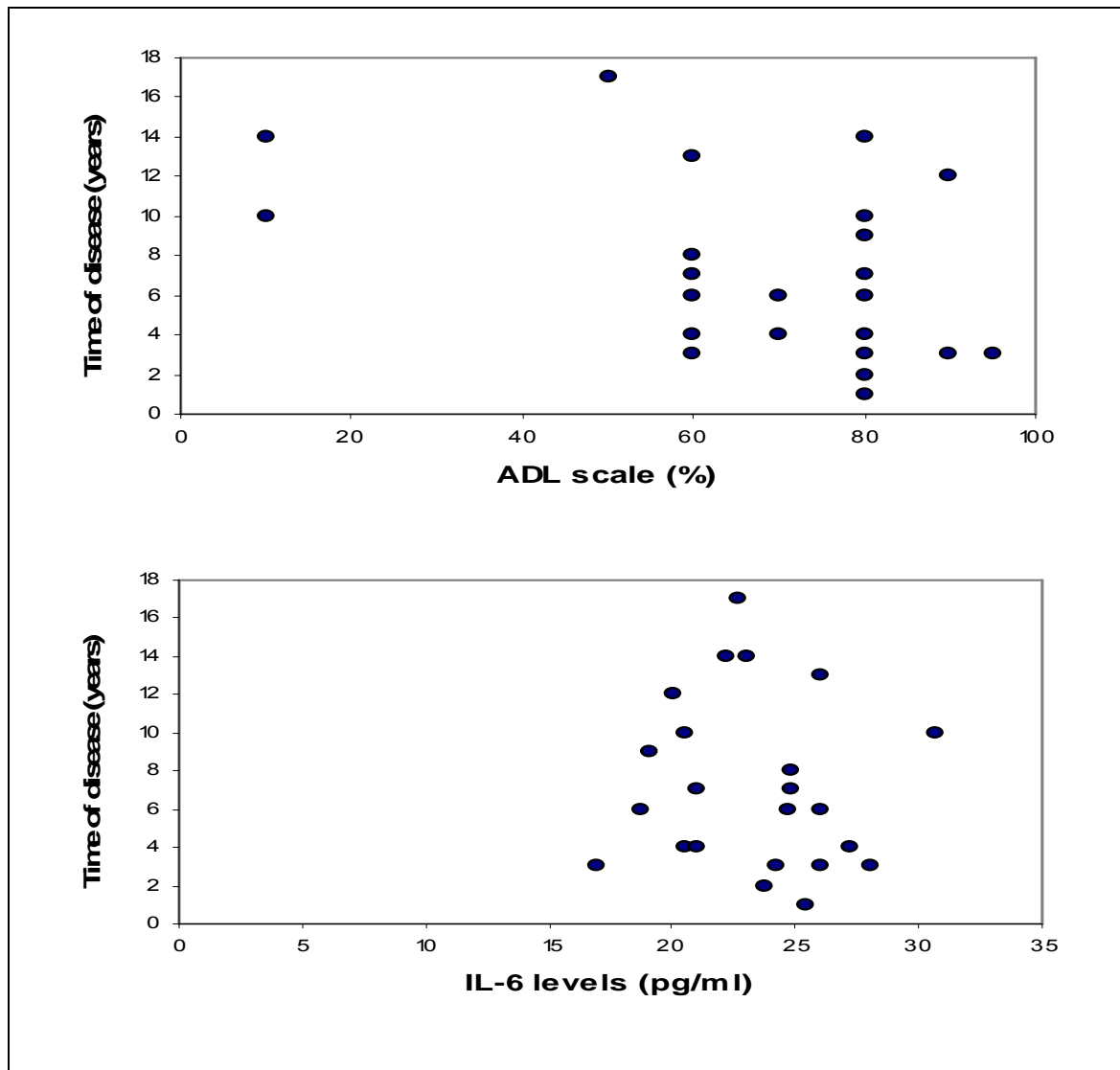


Figure 3. Time of disease was not associated with ADL scale and IL-6 levels ($P > 0,05$).



ARTIGO EM PORTUGUÊS

NÍVEIS DE INTERLEUCINA-6 NO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON

Kerly Wollmeister Hofmann¹, Daniele Fricke², Renata Leke³, Arthur Francisco Schumacher Schuh⁴, Luis Valmor Cruz Portela⁵, Márcia Lorena Fagundes Chaves⁶, Carlos Roberto de Mello Rieder⁷.

¹Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: kerly.hofmann@terra.com.br

²Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴Aluno de Graduação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Professor Doutor do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁶Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Coordenador do Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESUMO: As concentrações plasmáticas de interleucina-6 (IL-6) não se encontram elevadas nos pacientes com doença de Parkinson (PD). O objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de IL-6 no soro de pacientes com PD e os efeitos da L-DOPA e da gravidade da doença sobre estes níveis. Os níveis de IL-6 ($P > 0,05$) entre os pacientes PD e controles foram similares. Contudo, níveis elevados de IL-6 correlacionaram-se negativamente com a escala de Atividades da Vida Diária de Schwab e England (ADL) ($r = -0,457$; $P < 0,05$). Nossos resultados sugerem que ocorrem somente efeitos marginais sobre o sistema imune periférico e que o papel da IL-6 sobre a progressão da doença precisa ser elucidado.

PALAVRAS-CHAVE: Interleucina-6, doença de Parkinson, citocinas, levodopa.

INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (PD) é caracterizada por uma perda de dopamina (DA) no estriado causada por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos na zona compacta da substância nigra [1][2]. Embora muitas hipóteses diferentes tenham sido estudadas, a PD é uma desordem degenerativa de etiologia desconhecida [3]. Várias linhas de evidência sugerem que mecanismos neuroimunes estão envolvidos no processo neurodegenerativo. Ambos microglia e astrócitos são fontes de compostos potencialmente tóxicos que podem agravar a injúria neuronal durante os processos degenerativos na PD. Os astrócitos são geralmente conhecidos por suas ações protetoras sobre os neurônios [4]. Eles secretam fatores neurotróficos. Em contraste a esses efeitos protetores, os astrócitos podem produzir citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico [5].

Sugere-se que citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) induzem neurodegeneração nos cérebros de pacientes que sofrem de doença de Alzheimer. A citocina inflamatória IL-6 pode também estar envolvida na patologia da PD. A reação inflamatória pode estar relacionada a neurodegeneração, pois essas citocinas aumentam a adesão e migração de leucócitos, rompem a barreira hematoencefálica e induzem a ativação das células da glia. Isso pode, subseqüentemente, conduzir a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, a indução da apoptose ou a uma citólise específica induzida pela ativação do sistema complemento [3].

Citocinas pró-inflamatórias são secretadas por células imunocompetentes e também pela glia e neurônios [3]. A IL-6, um membro da família neuropoiética de citocinas, induz a síntese de proteína de fase aguda, a diferenciação de células neuronais e aumenta a sobrevivência das células colinérgicas e catecolaminérgicas [6][7]. A IL-6 pode manter processos regenerativos no cérebro [8]. Existe um envolvimento da IL-6 na proliferação e ativação de células gliais, visto nas desordens neurodegenerativas [9].

Níveis elevados de IL-6 na região nigroestriatal do cérebro pós-morte [10][11] e no fluido cerebrospinal (CSF) [11][12][13] foram encontrados na PD. Níveis elevados de IL-6 no CSF na PD foram associados com o início do processo degenerativo [13]. As concentrações plasmáticas de IL-6 não foram diferentes entre os pacientes PD [12][14][15]. Um estudo encontrou que a levodopa (L-DOPA), em concentrações fisiológicas (dosagem média diária 575 ± 230 mg), apresentava um efeito imuno-modulatório sobre as células de ambos pacientes PD e controles, e causou uma estimulação da produção de IL-6 [16]. Contudo, outro trabalho sugeriu que os níveis aumentados de citocinas nos pacientes PD possam não ser devido a efeitos secundários da terapia com L-DOPA [17].

No presente trabalho, nós estudamos os níveis séricos de IL-6 em pacientes com PD tratados e não-tratados e em sujeitos controles usando imunoenensaio enzimático de alta sensibilidade (ELISA). Nós também avaliamos as correlações entre seus níveis no soro e algumas características clínicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e controles

O soro foi coletado de 40 pacientes (23 pacientes PD recebendo L-DOPA e 17 virgens de terapia) do Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes foram examinados por um neurologista e foram diagnosticados como provável PD usando como critério a presença de três de quatro características cardinais (tremor de repouso, rigidez muscular, bradicinesia e início assimétrico) e nenhuma explicação alternativa para os achados [18]. Além disso, todos os pacientes demonstraram uma boa resposta a L-DOPA. Os pacientes que tinham diagnóstico recente foram seguidos após tratamento e foram excluídos do estudo quando não demonstravam uma boa resposta a drogas antiparkinsonianas, estes pacientes foram selecionados a partir de uma triagem de indivíduos da comunidade através de comunicação externa (jornal). A idade variou entre 41 e 84 anos.

Os pacientes PD tratados com droga antiparkinsoniana receberam somente L-DOPA associada a um inibidor da dopa-descarboxilase; já estes recebiam atendimento no Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A idade variou entre 52 e 83 anos.

Um grupo da comunidade com idade e sexo similares (n=23) sem achados neurológicos ou distúrbios afetando o sistema nervoso central (CNS) foi selecionado como um grupo para comparação no estudo. A idade variou entre 48 e 76 anos. Eles foram selecionados de indivíduos da comunidade.

O estágio clínico da PD foi avaliado de acordo com a classificação de Hoehn e Yahr (HY) [19], em que os maiores valores representam um maior grau de dependência; e a escala de Atividades da Vida Diária de Schwab e England (ADL) [20], em que os menores valores estão associados a um maior grau de gravidade da doença. Sujeitos com alterações metabólicas, outras doenças neurológicas exceto PD ou com quadro inflamatório ou infeccioso foram excluídos. Os critérios de exclusão foram os mesmos entre pacientes e controles. Drogas e co-morbidades foram controladas em ambos os grupos. Todos os sujeitos forneceram consentimento informado. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Amostras de sangue (5 ml) dos pacientes e controles foram coletadas sem anticoagulante e os soros foram congelados a -70°C até a análise.

Interleucina-6

O sistema BiotrakTM de ELISA para IL-6 humana (h) da Amersham Biosciences foi utilizado para medir a IL-6 no soro de todos os pacientes e controles. O sistema de ensaio é baseado em uma fase sólida da ELISA, que utiliza um anticorpo para a IL-6 (h) ligado aos poços de uma placa padrão, juntamente com um anticorpo para IL-6 (h) conjugado a biotina e a detecção com streptavidina-HRP. A densidade óptica foi determinada a 450 nm.

Análise estatística

Comparação entre os três grupos foi feita usando o teste Qui-quadrado para o gênero, e a análise de variância (ANOVA) (teste de Tukey) para a idade e IL-6. Análises estatísticas, entre os grupos de pacientes PD com levodopa-terapia e os virgens de terapia, foram realizadas com o teste Qui-quadrado (Correção de Yates) para o primeiro sintoma e o sintoma predominante, teste-t para o tempo de doença e teste de Mann-Whitney para as escalas HY e ADL. Para avaliar o papel da L-DOPA na criação de alterações imunológicas, os níveis séricos de IL-6 de pacientes recebendo tratamento com L-DOPA e pacientes PD sem terapia com droga antiparkinsoniana foram comparados usando teste-t. Correlações são apresentadas com o coeficiente de Pearson, para IL-6 no grupo tratado. $P < 0,05$ foi considerado significativo estatisticamente.

RESULTADOS

As características demográficas, bioquímicas e clínicas dos pacientes e controles estão descritas na Tabela 1. A idade ($P > 0.05$) e o gênero ($P = 0.097$) não foram estatisticamente diferentes nos três grupos. Não existiu diferença estatística entre os pacientes tratados e não tratados para o primeiro sintoma ($P = 0.749$), o sintoma predominante ($P = 0.23$) e as escalas HY ($P = 0.155$) e ADL ($P = 0.807$). A Figura 1 demonstra que as concentrações séricas de IL-6 foram similares nos três grupos.

Os níveis de IL-6 não variaram entre pacientes PD que são tratados com L-DOPA (dosagem média diária 563.0 ± 242.8 mg) e os não tratados ($P = 0.328$).

As concentrações de IL-6 no soro do grupo com levodopa-terapia apresentaram uma correlação negativa com a escala ADL (cujo score é menor quanto mais gravemente comprometido estiver o paciente) ($r = -0.457$, $P < 0.05$) (Fig.2). Contudo, não existiram associações entre a dosagem L-DOPA, o tempo de doença (Fig.3) a escala HY e os níveis de IL-6 neste grupo. Além disso, o tempo de doença não apresentou correlação com a escala ADL (Fig.3), mas com a escala HY apresentou correlação positiva ($r = 0.485$, $P < 0.02$).

DISCUSSÃO

O presente estudo não detectou uma diferença significativa de IL-6 no soro de pacientes com PD em relação ao controle. Outros autores demonstraram esse mesmo resultado no plasma [12][14][15]. Um estudo [12] comparou os níveis de IL-6 entre sujeitos controles, pacientes PD e pacientes com doença de Alzheimer por ELISA, os pacientes PD foram classificados entre os estágios I-III de acordo com a escala de HY. Outro estudo [14] examinou as concentrações plasmáticas de IL-6 em pacientes PD não tratados anteriormente. Já outro estudo [15] analisou os níveis de IL-6 em pacientes PD por ELISA em quatro fases diferentes de acordo com um protocolo de exercício cíclico; amostras de sangue foram coletadas antes da sessão de exercício. Contudo, níveis elevados de IL-6 no CSF [11][12][13] e região dopaminérgica nigroestriatal [10][11] de pacientes PD foram bem documentados.

Um dos objetivos do presente estudo foi detectar o efeito da L-DOPA, sobre os níveis de IL-6 no soro. Um estudo [17] sugeriu que alterações nos níveis de citocinas nos pacientes PD possam não ser devido a efeitos secundários da terapia com L-DOPA, enquanto que um outro [16] atribuiu a própria droga um efeito estimulador sobre a produção de IL-6. Nós não encontramos alterações nos níveis de IL-6 com a administração de L-DOPA.

Funções imunes anormais têm sido postuladas como um dos mecanismos subjacentes à patogênese da PD. A evidência para tais mecanismos inclui alterações na produção de citocinas pelo cérebro de pacientes com PD [21][22]. Conhece-se o papel chave da IL-6 na interação

entre o sistema nervoso e o imune, por exemplo, na suposta resposta de fase aguda [12].

Embora as células gliais possam estar envolvidas na patofisiologia de várias doenças degenerativas, elas são pobremente estudadas na PD. Uma evidência recente suporta a possibilidade de que células gliais secretam fatores, que possuem ou efeitos protetores ou deletérios sobre os neurônios dopaminérgicos [23]. Sinais que ativam a microglia [7][24][25] e astrócitos [7][24][26][27][28][29][30] tais como neurotransmissores (por exemplo, noradrenalina, histamina, substância P) e mediadores inflamatórios iniciam a síntese e a liberação de IL-6.

Como nos astrócitos, citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e TNF α são estimuladores potentes da síntese de IL-6 neuronal [31]. O fato de que a síntese de IL-6 nas células cerebrais possa ser induzida por citocinas pró-inflamatórias e neurotransmissores / neuropeptídeos, suporta o conceito de uma forte comunicação-cruzada entre neurônios e glia envolvendo IL-6. Isso pode ser importante não somente para a manutenção da homeostase cerebral e diferenciação neuronal, mas também para os processos patológicos ocorridos durante a neurodegeneração do CNS [32].

A síntese de citocinas pode desencadear injúria neuronal, conduzindo a apoptose. A apoptose previne a liberação de substâncias tóxicas pelas células que estão para morrer, evitando a ativação da inflamação agressiva. Estudos histopatológicos de cérebros PD sugerem a ocorrência de um processo apoptótico [3]. Portanto, essas mudanças podem ser secundárias ou respostas compensatórias.

Nós encontramos uma correlação inversa entre os níveis de IL-6 no soro e a escala ADL, indicando que a progressão da doença foi associada com os níveis aumentados de IL-6. Os pacientes com, clinicamente, menor grau de incapacidade apresentam níveis de IL-6 similares aos controles. O aumento dos níveis dessa proteína com o aumento da gravidade da PD pode ser uma consequência do dano neuronal de outras regiões do cérebro, que ocorre com a progressão da PD. Além disso, uma inflamação iniciada por dano neuronal no estriado e substância nigra na PD podem agravar o curso da doença [33]. A associação sugerida entre os níveis elevados de IL-6 no soro de pacientes com doença mais avançada precisa ser investigada, talvez o uso prolongado da L-DOPA ou uma lesão mais difusa do CNS possa ser uma explicação.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que ocorrem somente efeitos marginais sobre o sistema imune periférico e que disfunções neuroimunes encontradas por outros estudos no cérebro pós-morte e CSF nos pacientes PD parecem estar limitadas ao CNS. Um estudo [34] encontrou que a produção precoce de IL-6 no CNS excedia os níveis de IL-6 no soro em várias ordens de magnitude e que uma correlação entre IL-6 no CSF e soro foi encontrada somente após trauma e correspondia a uma severa disfunção da barreira hematoencefálica.

AGRADECIMENTOS

CAPES e FINE-HCPA apoiaram esse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973). Brain Dopamine and the Syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, Morphological and Neurochemical Correlations. *Journal of Neurological Science*, 20, 415-55.
2. Hornykiewicz O (1993). Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol*, 60, 140-147.
3. Cztonkowska A, Jastrzebska IK, Cztonkowski A, Peter D, Stefano GB (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. *MedSci Monit*, 8(8), RA165-177.
4. Vila M, Jackson-Lewis V, Guegan C et al (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14, 483-489.
5. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B et al (1996). Nitric oxide synthesis and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363.
6. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M et al (1991). Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*, 40, 445-452.
7. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 β . *J Immunol*, 150, 2659-2667.
8. Woodroffe MN (1995). Cytokine production in the central nervous system. *Neurology*, 45, 6-10.

9. Tilgner J, Volk B, Kaltschmidt C (2001). Continuous interleukin-6 application in vivo via macroencapsulation of interleukin-6-expressing COS-7 cells induces massive gliosis. *Glia*, 35(3), 234-245.
10. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994). Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 180, 147-150.
11. Nagatsu T (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Transm*, 109, 731-745.
12. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W et al (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202, 17-20.
13. Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W (1998). Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlates to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 98, 142-144.
14. Stypula G, Kunert-Radek J, Stephen H, Zylinska K, Pawlikowski M (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*, 3, 131-4.
15. Cadet P, Zhu W, Mantione K, Rymer M, Dardik I, Reisman S, Hagberg S, Stefano GB (2003). Cyclic exercise induces anti-inflammatory signal molecule increases in the plasma of Parkinson's patients. *Int J Mol Med*, 12(4), 485-492.

16. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M (1999). IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed & Pharmacother*, 53, 141-145.
17. Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T (1999a). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- α induction. *Neuroscience Letters*, 268, 101-104.
18. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 56, 33-39.
19. Hoehn MM, Yahr MD (1967). Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*, 17, 427-442.
20. Schwab RS, England AC. (1969). In: Gillingham FJ, Donaldson MC (eds). Projection technique for evaluating surgery in Parkinson's disease. Third Symposium on Parkinson's disease. Edinburgh, UK: Livingstone, 152-157.
21. Marttila RJ, Soppa E, Rinne UK (1985). Immune functions in Parkinson's disease subsets, concanavalin A induced suppressor cell activity and in vitro immunoglobulin production. *J Neurol Sci*, 69, 121-131.
22. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Olsson T, Link H (1994). Gamma delta⁺ cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 121, 39-45.
23. Hertz I, Hansson F, Ronnback I (2001). Signaling and gene expression in the neuron-glia unit during brain function and dysfunction: Holger Hyden in memoriam. *Neurochem Int*, 39, 227-252.

24. Norris JG, Benveniste EN (1993). Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol*, 45, 137-146.
25. Sébire G, Emile D, Walton C, Héry C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M (1993). In vitro production of IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α by human embryonic microglial and neuronal cells. *J Immunol*, 150, 1517-1523.
26. Wesselingh SL, Gough NM, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ (1990). Detection of cytokine mRNA in astrocytes cultures using the polymerase chain reaction. *Lymph Cyt Res*, 9, 177-185.
27. Norris JG, Tang L, Sparacio SM, Benveniste EN (1994). Signal transduction pathways mediating astrocytes IL-6 induction by IL-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Immunol*, 152, 841-850.
28. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi M (1992). TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*, 583, 296-299.
29. Cadman ED, Witte DG, Lee C (1994b). Regulation of the release of interleukin-6 from human astrocytoma cells. *J Neurochem*, 63, 980-987.
30. Gritter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC (1994). Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol*, 51, 101-108.
31. Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA (1995). Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. *J Neuroimmunol*, 63, 113-123.
32. Gadiant RA, Otten UH (1997). Interleukin-6 (IL-6) – a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurology*, 52, 379-390.

33. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinsons disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211.
34. Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C (1995). Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock*, 5, 311-317.

Tabela 1. Dados demográficos, bioquímicos e clínicos dos sujeitos avaliados.NP = não representado; * média \pm SD.

	Pacientes PD sem tratamento (n = 17)	Pacientes PD com L-DOPA (n = 23)	Controles (n = 23)	P
Idade (anos)*	65.3 \pm 13.1	66.5 \pm 8.8	60.0 \pm 7.8	> 0.05
Gênero (masculino/feminino) (%)	41.2/58.8	65.2/34.8	34.8/65.2	0.097
Tempo de doença (anos)*	2.8 \pm 3.9	8.1 \pm 6.1	NP	0.002
Primeiro sintoma (tremor/rigidez) (%)	82.4/17.6	78.3/21.7	NP	0.749
Sintoma predominante (tremor/rigidez) (%)	82.4/17.6	65.2/34.8	NP	0.230
Dosagem de L-DOPA*	NP	563.0 \pm 242.8	NP	-
Escala HY (< 3/ \geq 3) (%)	70.6/29.4	47.8/52.2	NP	0.155
Escala ADL (\geq 70 / < 70) (%)	64.7/35.3	60.9/39.1	NP	0.807

Figura 1. As concentrações no soro de IL-6, nos três grupos, foram medidas por ELISA. $P > 0,05$.

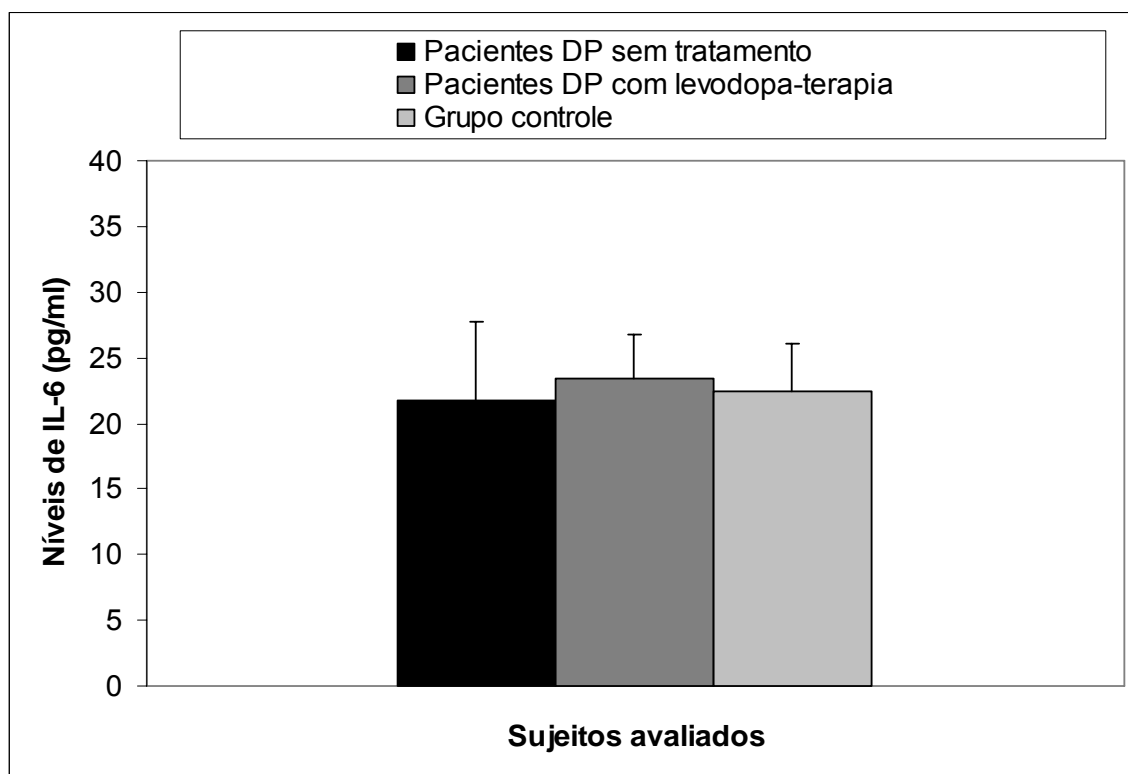


Figura 2. Correlação entre a escala ADL e os valores de IL-6 no soro de pacientes PD tratados com L-DOPA ($n = 23$; $r = -0,457$; $P < 0,05$).

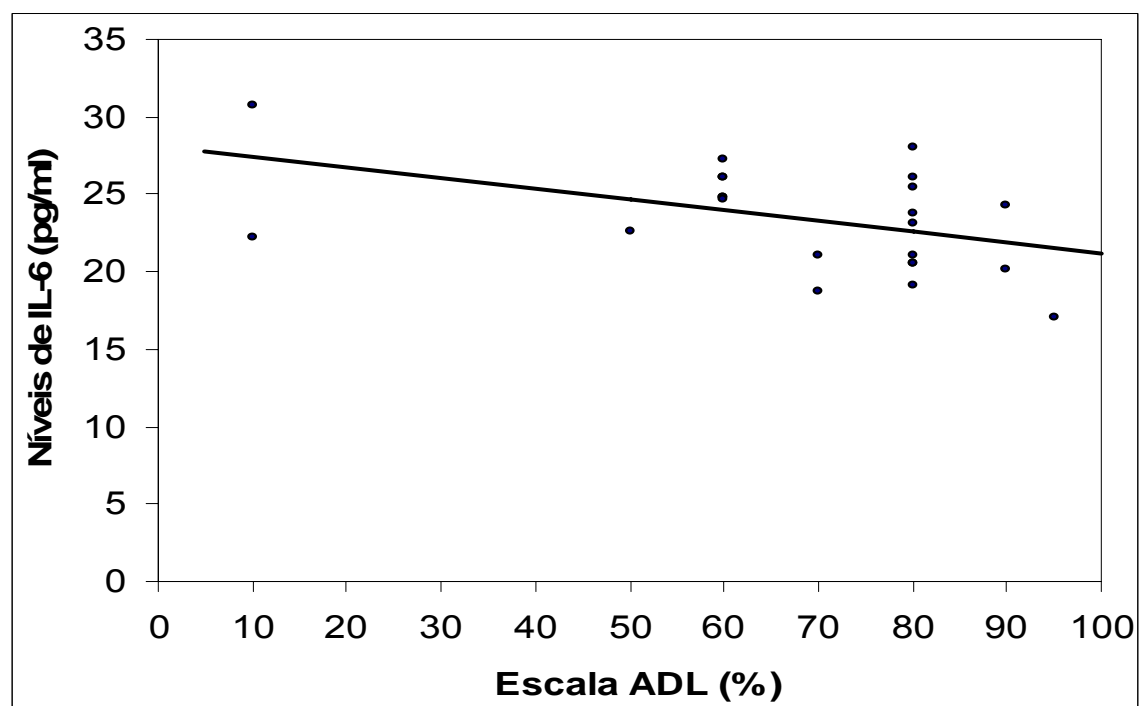


Figura 3. O tempo de doença não foi associado com a escala ADL e os níveis de IL-6 ($P > 0,05$).

