



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES SANGUÍNEOS NA
DOENÇA DE PARKINSON E VERIFICAÇÃO DA AÇÃO
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ANTIPARKINSONIANOS**

Londrina
2013

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES SANGUÍNEOS NA
DOENÇA DE PARKINSON E VERIFICAÇÃO DA AÇÃO
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ANTIPARKINSONIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F224a Farias, Carine Coneglian de.

Avaliação de marcadores sanguíneos na doença de Parkinson e verificação da ação antioxidante in vitro de antiparkinsonianos / Carine Coneglian de Farias. – Londrina, 2013.
106 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Agentes antiparkinsonianos – Teses. 4. Antioxidantes – Teses. I. Barbosa, Décia Sabbatini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.858

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES SANGUÍNEOS NA
DOENÇA DE PARKINSON E VERIFICAÇÃO DA AÇÃO
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ANTIPARKINSONIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbora
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas suas misericórdias que não têm fim e renovam-se a cada manhã.

Aos meus pais, Elizeu e Maria Marli, pelos princípios de vida que me ensinaram. Pelo amor, paciência e incentivo. Ao meu esposo, Diego Armando, pelo amor, compreensão e incentivo. À minha irmã Lisandra, companheira e amiga.

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa, meu mentor, pela oportunidade e confiança para a realização desse trabalho. Pela sabedoria, dedicação e disponibilidade em me orientar. E, acima de tudo, pelo carinho e amizade gerados nesses anos.

Às professoras Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, Dra. Graziela Scialanti Ceravolo e Dra. Rúbia Casagrande, pelas valiosas contribuições para a conclusão desse trabalho.

Ao professor Wanderlei Onofre Schmitz pela colaboração, incentivo e amizade construída ao longo desses anos.

Ao Dr. Lúcio Baena, pela contribuição na seleção dos pacientes com Parkinson, indispensável à execução desse trabalho.

Às amigas Ana Laura, Andressa Keiko, Alissana Camargo, Chiara Bortolasci, Denise Santiago, Francis Fregonesi, Kamila Landucci, Karine Boll, Luciana Higachi, Marcela Zambrim, Marlene Bardi, Paula Godeny, Renata Martinez, aos amigos André de Souza Nogueira, Emerson Sampaio, Matheus Amarante, Vitor Obara, pela ajuda para com esse trabalho e por proporcionarem muitos momentos de alegria.

À professora Maria Emília Fávero, responsável pelo Laboratório de Pós-Graduação, pela colaboração, suporte oferecido e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-Graduação, Laboratório de Análises Clínicas, setor de coleta, SAME, pelo companheirismo e pelos serviços prestados.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelas aulas que enriqueceram a nossa formação profissional.

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, especialmente à Sandra Lage, pelos auxílios prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos amigos e à minha família, que de alguma forma estiveram presentes, compartilhando comigo momentos felizes.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho.

*"Feliz o homem que acha sabedoria e o homem que
adquire conhecimento"*

Provérbios 3:13

FARIAS, Carine Coneglian. **Avaliação de marcadores sanguíneos na doença de Parkinson e verificação da ação antioxidante *in vitro* de antiparkinsonianos.** 2013. 106p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* no cérebro. O estresse oxidativo contribui para essa degeneração neuronal através de danos a lipídeos, proteínas e ao DNA com subsequente morte celular. Atualmente, a DP tem apenas tratamento sintomático e ainda nada pode ser feito para interromper o processo degenerativo. O objetivo desse trabalho foi avaliar marcadores pró-oxidantes, antioxidantes, bioquímicos e imunológicos nos pacientes com DP e a possível ação antioxidante *in vitro* de algumas drogas de escolha para o tratamento dessa doença. A população desse estudo consistiu de 56 pacientes com Parkinson recrutados do Ambulatório de Neurologia no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina. O Parkinson foi diagnosticado seguindo os critérios do banco de cérebros da sociedade de Parkinson do Reino Unido e da escala de *Hoehn and Yahr*. Apenas pacientes nos estágios 1-3 foram incluídos dentre os 5 estágios dessa classificação. O grupo controle consistiu de 56 indivíduos saudáveis e, para obter grupos homogêneos, parâmetros como idade, gênero e etnia foram controlados. Os marcadores bioquímicos e imunológicos avaliados foram ácido úrico, colesterol total, lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL), triglicérides, glicose, ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ferritina, ferro e proteína C reativa (PCR). O estresse oxidativo foi avaliado pela determinação da capacidade antioxidante total do plasma (TRAP), níveis de grupamentos sulfidril (SH), atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e atividade da paraoxonase 1 (PON-1), dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria (FOX-LOOH), hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência (QL-LOOH) e produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Foi avaliada também a capacidade antioxidante *in vitro* dos medicamentos selegilina, pramipexol e amantadina através do *burst* respiratório, capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), capacidade removedora do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS⁺) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). Os pacientes com DP apresentaram aumento significativo de ferritina e diminuição da AST em comparação com os controles. Os outros parâmetros (ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, glicose, ureia, creatinina, ALT, ferro e PCR) não foram significativamente alterados. Pacientes com DP apresentaram aumento significativo do estresse oxidativo no sangue como indicado pelo QL-LOOH, FOX-LOOH e MDA. AOPP e os níveis de NOx não foram diferentes de forma significativa entre os grupos. Em relação à capacidade antioxidante, os pacientes mostraram menor atividade de catalase e maior atividade de SOD. TRAP, SH e PON-1 não foram significativamente alterados. Os resultados confirmam uma condição de estresse oxidativo em pacientes com DP e que esta pode ser avaliada por biomarcadores no sangue. Aparentemente, a ferritina, um biomarcador bioquímico, sugere estar alterada na DP. Esse estudo também demonstrou que os medicamentos pramipexol e selegilina, mas não amantadina, possuem efeitos antioxidantes *in vitro*, sugerindo possíveis mecanismos neuroprotetores além de outros já conhecidos.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Estresse oxidativo. Agentes antiparkinsonianos. Antioxidantes.

FARIAS, Carine Coneglian. **Evaluation of blood markers in Parkinson's disease and in vitro verification of antiparkinsonians antioxidant activity.** 2013. 106p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) - State University of Londrina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* in the brain. Oxidative stress contributes to neuronal degeneration through to damage to lipids, proteins and DNA with subsequent cell death. Currently the PD has only symptomatic treatment and still nothing can be done to stop the degenerative process. The aim of this study was to evaluate markers pro-oxidants, antioxidants, biochemical and immunological in patients with PD and the possible antioxidant activity in vitro of some drugs of choice for treating this disease. The study population consisted of 56 patients with Parkinson recruited from the neurology ambulatory at Clinical Hospital State University of Londrina. PD was diagnosed and staged according to the criteria of UKPD Society Brain Bank and Hoehn and Yahr Scale for Parkinson's, respectively. Only patients in stages 1-3 were included among the 5 stages of this classification. The control group consisted of 56 healthy subjects and to obtain homogeneous groups parameters such as age, gender and ethnicity were controlled. The biochemical and immunological markers were evaluated uric acid, total cholesterol, low density lipoproteins (LDL), high density lipoproteins (HDL), triglycerides, glucose, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), ferritin, iron and C-reactive protein (CRP). Oxidative stress was assessed by determining the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), levels sulfhydryl group (SH), activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and activity of paraoxonase 1 (PON-1), dosage levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide metabolites (NOx), lipid hydroperoxides by spectrophotometry (FOX-LOOH), lipid hydroperoxides by chemiluminescence (CL-LOOH) and advanced oxidation protein products (AOPP). Was also evaluated the antioxidant capacity in vitro drug selegiline, amantadine and pramipexole through the respiratory burst, donor capacity of hydrogen atoms to the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila (DPPH[•]), radical capacity remover 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). PD patients showed a significant increase ferritin and decreased AST compared with controls. The other parameters (uric acid, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glucose, urea, creatinine, ALT, iron and CRP) were not significantly altered. PD patients showed a significant increase in oxidative stress in the blood as indicated by CL-LOOH, MDA and FOX-LOOH. AOPP and NO levels were not significantly different between groups. Regarding the antioxidant capacity, patients showed lower catalase activity and increased activity of SOD. TRAP, SH and PON-1 were not significantly altered. The results confirm a condition of oxidative stress in patients with PD and this condition can be evaluated biomarkers in the blood. Apparently, ferritin, a biochemical biomarker, suggested to be altered in PD. This study also demonstrated that both pramipexole and selegiline, but not amantadine, have antioxidant effects in vitro, suggesting potential neuroprotective mechanisms in addition to other already known.

Keywords: Parkinson's disease. Oxidative stress. Antiparkinson agents. Antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

AHC	Ambulatório do Hospital de Clínicas
ABAP	Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)
ABTS ⁺	Radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AOPP	Produtos avançados de oxidação protéica
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DOPAC	Ácido 3,4 dihidroxifenilacético
DOPAL	3,4 dihidroxifenilacetaldeído
DOPET	3,4 dihidroxifeniletanol
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
FOX-LOOH	Hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Proteínas de alta densidade
LDL	Proteínas de baixa densidade
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MAO	Monoamino-oxidase
MAO-B	Monoamino-oxidase B
MDA	Malondialdeído
NO _x ,	Metabólitos do óxido nítrico (NO _x)

OH [•]	Radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
PMA	Acetato de forbol-miristato
PCR	Proteína C-reativa
PBS	Tampão fosfato-salino
PON-1	Paraoxonase 1
SH	Grupamentos sulfidríla
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
QL	Quimiluminescência
QL-LOOH	Hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TRAP	Capacidade antioxidante total do plasma
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	MÉTODOS	18
3.1	AVALIAÇÃO IN VIVO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	18
3.1.1	Casuística.....	18
3.1.1.1	Delineamento	18
3.1.1.2	Cálculo do tamanho da amostra.....	18
3.1.1.3	Amostras	18
3.1.2	Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....	20
3.1.2.1	Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)	20
3.1.2.2	Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (FOX- LOOH)	20
3.1.2.3	Determinação hidroperóxidos por quimiluminescência (QL-LOOH)	21
3.1.2.4	Determinação de malondialdeído (MDA).....	21
3.1.2.5	Metabólitos do óxido nítrico (NOx)	22
3.1.2.6	Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)	22
3.1.2.7	Determinação da superóxido dismutase (SOD)	22
3.1.2.8	Determinação da catalase	23
3.1.2.9	Determinação do grupamento sulfidril (SH).....	23
3.1.2.10	Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1)	23
3.1.2.11	Determinações bioquímicas e imunológicas.....	24
3.2	AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MEDICAMENTOS ANTIPARKINSONIANOS	24
3.2.1	Capacidade de Medicamentos Antiparkinsonianos em Diminuir/Remover EROs no Burst Respiratório	24

3.2.2	Capacidade dos Medicamentos Antiparkinsonianos em Doar Hidrogênio e Estabilizar o Radical Livre DPPH	25
3.2.3	Capacidade dos Medicamentos Antiparkinsonianos em Remover o Radical ABTS+	25
3.2.4	Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) de Medicamentos Antiparkinsonianos	26
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
4.1	COMPARISON OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ANTIPARKINSONIAN DRUGS IN DIFFERENT IN VITRO MODELS	27
4.2	HIGH LEVELS OF PLASMA FERRITIN AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS SHOW A SYSTEMIC RESPONSE IN THE PARKINSON DISEASE	40
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	61
	ANEXO A - Termo de aprovação de pesquisa	62
	ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido	63
	ANEXO C - Diagnósticos da DP segundo o banco de cérebros da sociedade de Parkinson do Reino Unido	65
	ANEXO D - Escala de classificação do estágio da DP	67
	ANEXO E - Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo	68
	ANEXO F - Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP).....	71
	ANEXO G - Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria(FOX-LOOH).....	74
	ANEXO H - Determinação de hidroperóxidos por quimiluminescência (QL-LOOH).....	76
	ANEXO I - Determinação de malondialdeído (MDA)	78
	ANEXO J - Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)	82

ANEXO K - Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP).....	87
ANEXO L - Determinação da superóxido dismutase (SOD).....	89
ANEXO M - Determinação da catalase.....	91
ANEXO N - Determinação do grupamento sulfidril (SH)	93
ANEXO O - Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1).....	95
ANEXO P - Burst Respiratório.....	98
ANEXO Q - Determinação da capacidade doadora de átomos de hidrogênio (DPPH•).....	102
ANEXO R - Determinação da atividade de remoção do radical ABTS+	104
ANEXO S - Determinação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)	106

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que se caracteriza pela degeneração crônica dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* resultando na deficiência de dopamina e disfunção da via nigroestriatal (TSANG e CHUNG, 2009). Outra característica neuropatológica da DP são inclusões citoplasmáticas conhecidas como corpos de Lewy nos neurônios. O corpo de Lewy é composto por um núcleo denso que contém proteínas, que podem ser a α -sinucleína ou ubiquitina e outras do citoesqueleto (ARDUÍNO *et al.*, 2011).

A DP é classificada como a segunda doença neurodegenerativa mais comum que acomete a população idosa, visto que o próprio processo natural do envelhecimento favorece a diminuição de dopamina no sistema nervoso central (SNC) (KIM *et al.*, 2010). Conforme Di Napoli, Shah e Stewart (2007), a prevalência entre os gêneros masculino e feminino é de 1% entre os 60 anos de idade e 3% aos 80 anos de idade.

As manifestações clínicas na DP se caracterizam pelo comprometimento funcional motor, podendo ocorrer bradicinesia, tremor em descanso, rigidez e instabilidade postural. Já as manifestações não motoras incluem alterações do olfato, distúrbios do sono, hipotensão postural, constipação, depressão, ansiedade, sintomas psicóticos, prejuízos cognitivos e demência, entre outros (MIZUNO *et al.*, 2008).

Segundo Dauer e Przedborski (2003) essa doença pode estar vinculada a condições esporádicas e desconhecidas. No entanto são relatadas interações com o ambiente, oxidantes, toxinas ou emoções, desempenhando papel significativo na etiologia da DP, exceto por casos herdados relacionados a defeitos em genes conhecidos. Segundo Jomova *et al.* (2010), cerca de 90 a 95% dos casos da DP possuem causas desconhecidas, enquanto os casos de histórico familiar são responsáveis por 5 a 10%.

Evidências sugerem que o estresse oxidativo (EO) pode provocar ou contribuir para uma variedade de distúrbios do SNC principalmente em doenças neurodegenerativas, como a DP (ZHAO, 2009; TAYLOR, MAIN e CRACK, 2013).

O EO é gerado devido ao desequilíbrio entre a produção de substâncias pro-oxidantes (espécies reativas de oxigênio-EROs e de nitrogênio-

ERNs) e antioxidantes proporcionando a geração de radicais livres potencialmente prejudiciais para as células. As EROs incluem o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical alquila (L^{\bullet}), alcoxila (LO^{\bullet}) e peroxila (LOO^{\bullet}). As espécies reativas de nitrogênio (ERNs), óxido nítrico (NO^{\bullet}). O peroxinitrito ($ONOO^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares no organismo. Dentre os antioxidantes enzimáticos pode-se citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e entre os não enzimáticos a glutathione (GSH), o ácido ascórbico, α -tocoferol e ácido úrico (UTTARA *et al.*, 2009).

Os neurônios dopaminérgicos na SNpc são altamente susceptíveis ao dano oxidativo. Os fatores que podem contribuir para isso incluem a elevada taxa metabólica (grande consumo de oxigênio) do cérebro; baixos níveis de antioxidantes (SOD, GSH e CAT); alta concentração de ferro e substratos oxidáveis como a dopamina, neuromelanina e ácidos graxos poliinsaturados (WU *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2008; HALD e LOTHARIUS, 2005; DATLA *et al.*, 2007).

O aumento de ferro no cérebro da DP tem sido relacionado à degeneração dos neurônios da SNpc e com a diminuição da capacidade de armazenamento, devido à diminuição da expressão da ferritina. Esse aumento do ferro implicaria nos mecanismos de EO, por induzir a formação de radicais livres pela reação de Fenton e pela reação de Haber-Weiss. Ambas as reações produzem OH^{\bullet} , uma das espécies radicalares mais nocivas ao organismo humano (MOSLEY *et al.*, 2006).

A dopamina é estável em vesículas sinápticas no interior da célula, no entanto, uma vez que a dopamina existe fora da vesícula em um neurônio danificado, é facilmente metabolizado pela monoamina oxidase (MAO) e induz à formação excessiva de H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} . Também na oxidação da dopamina pela MAO, há a formação de um componente tóxico 3,4 dihidroxiilfenilacetaldeído (DOPAL), que é oxidado para o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), através da aldeído desidrogenase (ALDH) ou reduzidos para 3,4 dihidroxifeniletanol (DOPET) através de redutases. A concentração elevada de DOPAL, pode ser altamente prejudicial às células dopaminérgicas facilitando a neurodegeneração na DP (ROBERTS *et al.*, 2008). A dopamina também pode possuir ação neurotóxica dado seu grupo catecol, que tem a propensão para o ciclo redox e gera EROs na presença de oxigênio molecular. A auto-oxidação desse composto resulta em uma

quinona altamente reativa e $O_2^{\bullet-}$ (GAD ELHAK *et al.*, 2010; TAYLOR, MAIN, e CRACK 2013).

É evidente que o estresse oxidativo indica implicações cruciais na DP. Para Migliore *et al.* (2002), Agil *et al.* (2006) e Choi *et al.* (2006), é possível identificar nos cérebros de pacientes com DP aumento na oxidação de proteínas, DNA e lipídeos. Esta condição pode ser encontrada não só no cérebro destes pacientes mas também sistemicamente (MIGLIORE e COPPEDÉ, 2009). Dentre os biomarcadores para estresse oxidativo, pode-se citar hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos avançados de oxidação protéica (AOPP), subprodutos do óxido nítrico (NOx) e alterações das enzimas antioxidantes SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx) (ABRAHAM *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2008; NIKAM *et al.*, 2009; NIKOLOVA e MANCHEVA, 2013).

Estudos também têm demonstrado que pacientes com DP além de apresentarem estresse oxidativo, possuem modificações no perfil bioquímico e inflamatório sanguíneo que estão relacionados a alterações nos mecanismos de regulação do conteúdo de ferro e alguns marcadores inflamatórios incluindo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α (MOSLEY *et al.*, 2006; ANDICAN *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2012; IKEDA *et al.*, 2013; DOHERTY, 2013).

Segundo Lang (2009) na década de 60, após a identificação das alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de pacientes com DP, surgiu o primeiro tratamento com sucesso, estimulando assim o desenvolvimento de novas terapias que pudessem ser efetivas. A introdução da levodopa representou o maior avanço terapêutico para essa doença, minimizando os principais sintomas da DP.

A prescrição dos medicamentos para a DP visa à melhora dos movimentos voluntários, redução dos tremores e uma qualidade de vida melhor. Muitas vezes combinam levodopa, agonistas dopaminérgicos como por exemplo pramipexol; inibidores da monoamino oxidase B (MAO-B) como por exemplo a selegilina; inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT) como entacapone e tolcapone; anticolinérgicos como biperideno e antiglutamatérgicos como por exemplo a amantadina. A forma de tratamento mais adequada leva em consideração fatores como o estágio da doença, a sintomatologia presente, ocorrência de efeitos colaterais, idade do paciente e medicamentos em uso (YUAN *et al.*, 2010).

O tratamento utilizado para DP, sob a ótica de ação antioxidante, tem sido investigado na tentativa de determinar uma possível atividade

neuroprotetora. Essa atividade antioxidante seria através da neutralização dos radicais livres, podendo impedir a perda neuronal e dessa forma possuir algum efeito sobre o processo de progressão da doença (DEXTER e JENNER, 2013). Em função disso, vários compostos estão sendo estudados *in vitro* e *in vivo* como possíveis agentes neuroprotetores. Contudo, o papel desses agentes ainda precisa ser bem estabelecido para uso terapêutico (CASSARINO *et al.*, 1998; SCHAPIRA, 2002; TAKAHATA *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2009; MAZZIO, CLOSE e SOLIMAN, 2011).

Em função do exposto, observou-se a importância dos processos redox na fisiopatologia da DP. Se o organismo tenta de alguma forma lançar mecanismos de compensação é um assunto em aberto. (MAZZIO; CLOSE; SOLIMAN, 2011; BOGDANOV *et al.*, 2008). Enquanto estudos com animais e humanos indicam que no cérebro destes há alterações substanciais na proporção entre oxidantes e antioxidantes, este trabalho visa analisar sistemicamente marcadores de estresse oxidativo, bioquímicos e imunológicos nos pacientes que apresentam essa doença. Além disso, identificar se as drogas geralmente utilizadas no tratamento dessa patologia apresentam algum efeito antioxidante no sentido de identificar algum outro mecanismo de ação além dos já conhecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcadores pró-oxidantes, antioxidantes, bioquímicos e imunológicos nos pacientes com DP e verificar possível ação antioxidante *in vitro* de algumas drogas de escolha para o tratamento dessa patologia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação *in vivo*:

- Identificar a capacidade antioxidante total do plasma (TRAP) e determinar os níveis de grupamentos sulfidril (SH) em indivíduos com DP;
- Dosear os níveis de malondialdeído (MDA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria (FOX-LOOH), hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência (QL-LOOH) e produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) em indivíduos com DP;
- Analisar a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e atividade da paraoxonase 1 (PON-1);
- Analisar os parâmetros bioquímicos e imunológicos ácido úrico, colesterol total, lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL), triglicérides, glicose, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ferritina, ferro e proteína C reativa (PCR).

Avaliação *in vitro*:

- Verificar a capacidade antioxidante *in vitro* dos medicamentos selegilina, pramipexol e amantadina através do *burst* respiratório, capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), capacidade removedora do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP).

3 MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.1.1 Casuística

3.1.1.1 Delineamento

Trata-se de um estudo observacional do tipo caso-controle, realizado no período de março de 2012 a julho de 2013.

3.1.1.2 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no STATCALC do programa Epi info versão 6.04d, tendo como referência dados de estudos desenvolvidos por Yuan *et al.* (2000) e Sharma *et al.* (2007). A amostra foi estimada em cada grupo considerando uma diferença de média mínima de 100%, com poder estatístico de 80% e nível de significância de 5%. De acordo com os cálculos, a estimativa do tamanho da amostra para o presente estudo seria de 50 indivíduos em cada grupo.

3.1.1.3 Amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer N° 222/2011 - folha de rosto N° 446588 (Anexo I). Todos os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido. Logo após tomarem ciência do projeto e sentindo-se plenamente esclarecidos, assinaram o termo de consentimento (Anexo II).

Os pacientes com DP foram selecionados no ambulatório de neurologia do Hospital de Clínicas (AHC) da Universidade Estadual de Londrina. Foram avaliados 56 pacientes com idade de 50 anos ou mais sem restrição de gênero e etnia, diagnosticados segundo os critérios do banco de cérebros da

sociedade de Parkinson do Reino Unido (Anexo III) e selecionados os que estavam entre as fases 1 a 3 da escala de *Hoehn and Yahr* (Anexo IV) sendo excluídos os pacientes com DP nas fases 4 e 5. Pacientes que apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimune, renais, cardíacas, hepáticas ou outras doenças neurológicas que por auto declaração fossem tabagistas, etilistas ou utilizassem suplementos antioxidantes também foram excluídos do estudo.

Os pacientes com DP estavam sobre tratamento medicamentoso, dependendo dos sintomas e gravidade da doença, a saber: levodopa mais carbidopa, levodopa mais benserazida, pramipexol, amantadina, selegilina, biperideno ou entacapone. As drogas utilizadas no tratamento da DP fazem parte da rotina de tratamento dos pacientes atendidos no AHC e são baseados na portaria SAS/MS N° 228 que estabelece um protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (BRASIL, 2010).

O grupo controle consistiu de 56 indivíduos isentos de doenças graves, que não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renais, cardíacas, hepáticas, outras doenças neurológicas e que não estivessem utilizando suplementos antioxidantes, oriundos de diversas regiões da cidade de Londrina-PR. Para obtenção de grupos o mais homogêneos possíveis, parâmetros como idade, gênero e etnia foram controlados e pareados. Todos os indivíduos envolvidos neste estudo, por auto declaração, relataram não serem etilistas ou tabagistas.

Dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo foram coletados por meio de um formulário (Anexo V) e pela consulta aos prontuários do AHC.

Foram coletados 45mL de sangue por punção venosa, de todos os voluntários: 15 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo EDTA para determinação das atividades enzimáticas da SOD e CAT; 5mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo fluoreto para a dosagem de glicose e 25mL de sangue tubos com vácuo (vacutainer®) sem anticoagulante para a realização de ácido úrico, perfil lipídico, uréia, creatinina, AST, ALT, ferro, ferritina, TRAP, SH, MDA, NOx, FOX-LOOH, QL-LOOH, AOPP e PON-1. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga (EVLAB®, Londrina, PR, Brasil) e alíquotas de soro foram armazenadas em freezer a -70°C (Kendro®, Asheville, NC, EUA) até o momento de uso.

3.1.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

3.1.2.1 Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)

O TRAP foi avaliado por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996) (Anexo VI). A metodologia é baseada na geração de radicais peroxila (RO_2^*), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azoiniciador dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (ABAP). Sabe-se que o ABAP gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, permitindo assim a detecção de antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no soro ou plasma (Yokozawa *et al.*, 2000).

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer[®], (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em μ M Trolox.

3.1.2.2 Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (FOX-LOOH)

Os hidroperóxidos (LOOH) foram determinados através da oxidação ferrosa do alaranjado de xilenol (FOX) utilizando a técnica descrita Jiang *et al.* (1991) (Anexo VII). Esse método é baseado na oxidação de íons ferrosos para íons férricos sob condições ácidas que reagem com o corante indicador FOX produzindo um complexo colorido. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic[®] modelo Helios- α , (Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 560 nm. A concentração de FOX foi expressa em mM.

3.1.2.3 Determinação hidroperóxidos por quimiluminescência (QL-LOOH)

A avaliação da formação de hidroperóxidos por quimiluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha *et al.* (1991) (Anexo VIII). A quimiluminescência estimulada por t-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento

da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo.

Este experimento foi realizado em contador β marca Beckman[®] LS 6000 (Fullerton, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30°C, durante 120 minutos. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm).

3.1.2.4 Determinação de malondialdeído (MDA)

A quantificação de MDA foi realizada conforme a técnica descrita por Bastos *et al.* (2012) (Anexo IX) que consiste na medida dos níveis de MDA através da complexação com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizando para estimativação do MDA a cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

Para a realização da análise do aduto TBA-MDA-TBA foi utilizado um sistema de CLAE Alliance e2695, Waters[®] (Barueri, SP, Brasil) com uma coluna Eclipse XDB-C18 4,6mm x 250mm 5 μ m, Agilent[®] (Santa Clara, CA, EUA). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 532 nm. Para análise dos dados foi utilizada curva de calibração preparada com soluções de MDA em diferentes concentrações, comparando medidas de área de pico das amostras com concentrações conhecidas da curva padrão. As concentrações de MDA foram expressas em μ mol de MDA/mg de proteínas.

3.1.2.5 Metabólitos do óxido nítrico (NOx)

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998) (Anexo X). O óxido nítrico é um gás muito instável e rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos, que podem ser detectados no soro. O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi feita em leitora de microplacas

Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi expressa em μM .

3.1.2.6 Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)

Para a quantificação de AOPP no plasma foi utilizado o método descrito por Witko-Sarsat *et al.* (1996) (Anexo XI). Esse teste foi utilizado para medir a oxidação protéica. A leitura da reação da AOPP foi feita em um espectrofotômetro, marca Thermo Spectronic®, modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi expressa em $\mu\text{mol/L}$ de equivalente de cloramina T.

3.1.2.7 Determinação da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD nos eritrócitos foi determinada usando o método do pirogalol descrita por Marklund e Marklund (1974) (Anexo XII). Esta técnica baseia-se na inibição que esta enzima promove na auto-oxidação do pirogalol em solução aquosa. A quantidade de SOD que foi capaz de inibir 50% da oxidação do pirogalol foi definida como uma unidade de atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi feita em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic®, modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos por U/mg Hb.

3.1.2.8 Determinação da catalase

A análise da atividade da catalase foi através da medida do decaimento na concentração de H_2O_2 e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1984) (Anexo XIII). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic®, modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 240 nm. Os valores de catalase foram expressos em U/mg Hb.

3.1.2.9 Determinação do grupamento sulfidril (SH)

O grupamento SH de proteínas foi avaliado no plasma por espectrofotometria descrito previamente por Hu (1994) (Anexo XIV). O método de análise é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas. A leitura da reação foi feita em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic[®], modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína.

3.1.2.10 Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1)

A atividade total da PON-1 foi determinada pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink Furlong (2008) (Anexo XV). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, foi determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a $1,31\text{mMol}/\text{Lcm}^{-1}$.

3.1.2.11 Determinações bioquímicas e imunológicas

As análises bioquímicas e imunológicas foram mensuradas por metodologias automatizadas. As análises bioquímicas utilizadas foram feitas no aparelho Dimension[®], modelo RxL (Deerfield, IL, EUA). A análise imunológica foi realizada no aparelho Architect i2000SR, Abbott, IL, EUA).

3.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MEDICAMENTOS ANTIPARKINSONIANOS

3.2.1 Capacidade de Medicamentos Antiparkinsonianos em Diminuir/Remover EROs no *Burst* Respiratório

A produção de EROs por neutrófilos (*burst* respiratório), obtidos do sangue de um voluntário sadio, foi avaliada por quimiluminescência em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) de acordo com uma adaptação do método descrito por Freitas *et al.* (2008) e Huber, Krotz-fahning, Hock (2006) (Anexo XVI). Esta metodologia baseia-se no monitoramento das EROs produzidas pelos neutrófilos após estímulo com acetato de forbol miristato (PMA). A intensidade da quimiluminescência (fluxo de fótons) é diretamente proporcional à taxa de produção de radicais livres.

O *burst* respiratório em neutrófilos foi induzido por PMA na presença de 10^{-4} M de pramipexol, selegilina e amantadina ou tampão fosfato-salino (PBS) (grupo controle). O dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para dissolver os fármacos do teste não demonstrou influenciar o *burst* em experimentos piloto realizados em nosso laboratório (dados não mostrados). A leitura (amplitude de resposta entre 300-620 nm) foi realizada durante 60 min (uma leitura/min), sob temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados foram expressos em cpm. Cada análise experimental foi composta por pelo menos 14 repetições. Para a análise estatística, o valor máximo de cada curva foi utilizada, independentemente do tempo em que ocorreu.

3.2.2 Capacidade dos Medicamentos Antiparkinsonianos em Doar Hidrogênio e Estabilizar o Radical livre DPPH^{*}

O DPPH^{*} é um radical livre estável que reage com compostos capazes de doar átomo de hidrogênio. A medição da capacidade em doar hidrogênio e estabilizar o radical livre DPPH^{*} foi realizada de acordo com Blois (1958) (Anexo XVII). As concentrações dos medicamentos utilizados na reação foram 0,002-0,05 mg/mL de pramipexol, 0,015-0,25 mg/mL de selegilina e 0,311-5,4 mg/mL de amantadina. A redução do radical DPPH^{*} foi determinada pela mudança na absorbância medida a 517 nm em espectrofotômetro marca Thermo Spectronic® modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA). A supressão do radical resulta na diminuição da absorbância. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade.

3.2.3 Capacidade dos Medicamentos Antiparkinsonianos em Remover o Radical ABTS⁺

A capacidade de remoção do radical livre ABTS⁺ é medida pela supressão da cor do radical devido à diminuição do mesmo no meio e consequente queda da absorbância quando substâncias antioxidantes são adicionadas. Esse método foi realizado de acordo com Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005) com algumas modificações (Anexo XVIII). Foram avaliadas diferentes concentrações de pramipexol 0,001-0,03 mg/mL, selegilina 0,015-0,225 mg/mL e amantadina 0,311-5,4 mg/ml. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic[®], modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 730 nm. A supressão do radical no meio de reação foi monitorada através da diminuição da absorbância. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade.

3.2.4 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) de Medicamentos Antiparkinsonianos

FRAP foi avaliado de acordo com Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005) (Anexo XIX). Neste ensaio, os antioxidantes adicionados ao meio de reação reduzem o complexo Fe³⁺ TPTZ para formar um complexo de Fe²⁺ TPTZ de cor azul, que resulta em um aumento na absorbância.

Foram avaliadas as concentrações de pramipexol (0,164 mg/mL), de selegilina (0,573 mg/mL) e de amantadina (19,23 mg/mL) no meio de reação. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic[®] modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) em comprimento de onda de 595 nm. Uma curva analítica com diferentes concentrações de Trolox[®] (4,0 - 20,0 μ M) foi usada para posterior cálculo dos resultados em μ mol/L equivalente de trolox/mg/mL de medicamento.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados obtidos no *burst* respiratório foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn.

As concentrações de pramipexol, selegilina e amantadina que inibiram 50% do radical DPPH[•] e ABTS⁺ foi considerada a concentração inibidora média (IC₅₀). No FRAP os resultados obtidos com as drogas-teste foram comparados com a curva trolox. Para análise dos resultados obtidos nos testes *in vivo* utilizou-se os testes de Kolgomorov-Smirnov e Bartlett para verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade. Em função da violação destes pressupostos, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e os dados foram apresentados sob forma de mediana e valores mínimos e máximos. Para as variáveis categóricas gênero e etnia, utilizou-se o teste exato de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e as análises foram efetuadas no software GraphPad Prism[®] v. 4.0. e no GraphPad InStat v. 3.10.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1: Submetido para Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

4.1 COMPARISON OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ANTIPARKINSONIAN DRUGS IN DIFFERENT IN VITRO MODELS

Carine C. Farias^a, Kamila L. Bonifácio¹, Andressa K. Matsumoto^b, Luciana Higachi², Rúbia Casagrande¹, Estefânia G. Moreira¹, Décio S. Barbosa^{1*}.

E-mail:

carine_coneglian@yahoo.com.br; landuccikamila@gmail.com; dessamatsu@hotmail.com; luhigachi@yahoo.com.br; rubiacasa@uel.br; egmoreira@uel.br; sabatini@uel.br.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta*. Furthermore, oxidative stress is apparent in PD, causing or contributing to the neurodegenerative process. Currently PD has only symptomatic treatment and still nothing can be done to stop the degenerative process of the disease. This study aimed to comparatively evaluate the antioxidant capacity of pramipexole, selegiline and amantadine in different in vitro studies and to offer possible explanations on the molecular antioxidant mechanisms of these drugs. In vitro, the antioxidant capacity of the drugs was assessed by the ability of antiparkinsonian drugs to decrease or scavenge ROS in the neutrophil respiratory burst, ability of antiparkinsonian drugs to donate hydrogen and stabilize the free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]), to scavenge 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS⁺) and evaluation of the ferric reducing antioxidant power (FRAP). This study demonstrated that both pramipexole and selegiline, but not amantadine, have antioxidant effects in vitro by scavenging superoxide anion on the respiratory burst, donating electron in the ABTS⁺ assay and presenting ferric reduction antioxidant power. This chemical structure-related antioxidant capacity, suggests a possible neuroprotective mechanisms of these drugs beyond their already recognized mechanisms of action.

Keywords: Parkinson disease. Oxidative stress. Antiparkinson agents. Antioxidants.

^a Graduation Program in Health Sciences of State University of Londrina

^b Pharmacy Undergraduate Students of State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

* Corresponding author at: Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil. Tel.; (55) (43) 3371245.

E-mail address: sabatini@uel.br (D.S.Barbosa).

1 INTRODUCTION

Parkinson disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disorder, affecting 1 to 2% of the population above 65 years of age and, approximately, 4% of individuals above 85 years (Perfeito, Oliveira, Rego, 2012). The clinical symptoms of PD manifest as the loss of initiation and control of movement, which appear after a substantial loss of dopaminergic neurons (50-60%) in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc). As a consequence of this cell loss, dopamine in *striatum* is depleted by 70-80% (Datla *et al.*, 2007; Mercado, Valde, Hetz, 2013).

The pharmacological treatment of PD has not changed substantially in the past 30 years and dopamimetic therapy is the gold standard. L-dopa and dopaminergic agonists are the main drugs used but a series of enzyme inhibitors, (peripheral decarboxylase inhibitors, catechol-O-methyl transferase inhibitors, and monoamine oxidase-B inhibitors) also support dopamimetic therapy. Besides dopamimetic therapy, antimuscarinics and amantadine, which have multiple mechanisms of action, have also been employed in a case-specific manner (Dexter, Jenner, 2013; Nolan, Sullivan, Toulouse, 2013; Obeso *et al.*, 2010).

The cause of *nigral* cell death in PD remains unclear, yet several hypothesis have emerged in the scientific literature. The “oxidative stress hypothesis” postulates that a disruption in the balance between antioxidant molecules and reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) leads to oxidative damage of cellular macromolecules and, consequently, to cell death. This hypothesis is based on the fact that the oxidative metabolism of dopamine generates hydrogen peroxide (H₂O₂) and others ROS, exposing dopaminergic neurons of the SNpc to chronic oxidative stress (Drechsel, Patel, 2008; Liddell *et al.*, 2013). Oxidative stress is evidenced in PD by the increased lipid peroxidation and DNA damage in the substantia nigra and increased encephalic protein oxidation (Surendran, Rajasankar, 2010).

Even though the mechanisms by which antiparkinsonian drugs increase dopaminergic or decrease cholinergic neurotransmissions are well understood, the literature misses information regarding mechanisms involved in a possible intrinsic antioxidant activity that the antiparkinsonian drugs might have that could, consequently, collaborate to their therapeutical efficacy. This study aimed to

comparatively evaluate the antioxidant capacity of pramipexole, selegiline and amantadine in different in vitro studies and to offer possible explanations on the molecular antioxidant mechanisms of these drugs.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

The drugs used were: amantadine hydrochloride (Mantidan™, Eurofarma, Brazil), selegiline hydrochloride (Jumexil™, Chiesi, Brazil) and pramipexole dihydrochloride (Sifrol™, Boehringer-Ingelheim, Brazil). The drugs were macerated and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO: Synth, Brazil). The reagents used for the assays were: phorbol myristate acetate (PMA: Sigma-Aldrich, USA), luminol (Acros, USA), histopaque (Sigma-Aldrich, USA), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS: Sigma-Aldrich, USA), potassium persulfate (J.T.Baker, USA), monobasic potassium phosphate anhydrous (KH₂PO₄: Synth, Brazil), potassium hydroxide (KOH: Merck, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]: Sigma-Aldrich, USA), sodium acetate trihydrate (Synth, Brazil), acetic acid (Vetec, Brasil), absolute ethanol (Synth, Brazil), ferric chloride hexahydrate (FeCl₃: Synth, Brazil), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ: Sigma-Aldrich, USA), hydrochloric acid fuming (Merck, Germany), Trolox (Sigma-Aldrich, USA). All reagents were of the highest grade available commercially.

2.2 Ability of antiparkinsonian drugs to decrease/scavenge ROS in the neutrophil respiratory burst

ROS production by neutrophils (respiratory burst) was evaluated by chemiluminescence according to an adaptation of the method described by Freitas *et al.* (2008) and Huber, Krötz-fahning, Hock (2006) in a multilabel plate reader Victor X-3, PerkinElmer® (Waltham, MA, EUA). Human neutrophils were isolated from whole blood through gradient density centrifugation. Neutrophil burst was induced by PMA in the presence of 10⁻⁴ M of pramipexole, selegiline, amantadine or PBS (control group). Even though DMSO was used to dissolve the test drugs it does not influence respiratory burst as demonstrated in pilot experiments conducted in our laboratory

(data not show). The reaction medium in each well was composed by 200 μL neutrophils (2.5×10^6 cells/mL), 50 μL of luminol 20 mM, 10 μL of the solutions of the test drugs and 50 μL of PMA 5 mM. After fast homogenization, reading (response range between 300-620 nm) was conducted for 60 min (one read/min) under a temperature of $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Results was expressed as count per minute (cpm). Each experimental group was composed by at least 14 replicates. For statistical analysis, the peak value of each curve was used, independently of the time it occurred.

2.3 Ability of antiparkinsonian drugs to donate hydrogen and stabilize the free radical DPPH $^{\bullet}$

The measurement of free radical scavenging was conducted according to Blois, (1958), with some modifications. Antiparkinsonian drugs were added to the reaction mixture containing 1 mL 0.1 M acetate buffer (pH 5.5), 1 mL of ethanol and 0.5 mL of ethanolic solution of DPPH $^{\bullet}$ 250M. The drugs concentrations in the reaction were 0.002-0.05 mg/mL of pramipexole, 0.015-0.25 mg/mL of selegiline and 0.311-5.4 mg/mL of amantadine. The reduction of DPPH $^{\bullet}$ radical was determined by the change in absorbance measured at 517 nm in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic $^{\text{®}}$ (Waltham, MA, EUA). The suppression of the colored radical results in absorbance decrease. The positive control was prepared in the absence of the test drugs in order to determine the maximum odd electrons of DPPH $^{\bullet}$, which was considered 100% of free radicals in the solution and used to calculate the hydrogen-donating ability (%) of the drugs evaluated. The blank was prepared from the reaction mixture without DPPH $^{\bullet}$ solution. Samples were analyzed in triplicate. The results were expressed as percentage of activity by the following equation:

Equation 1: % of activity = $[1 - (\text{sample absorbance}/\text{control absorbance})] \times 100$.

2.4 Ability of antiparkinsonian drugs to scavenge ABTS $^{\bullet+}$ radical

The ability to scavenge the ABTS $^{\bullet+}$ free radical was carried out according to Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005) with some modifications. ABTS $^{\bullet+}$ solution was obtained after the reaction of 7mM ABTS with

2.45mM potassium persulphate. This solution was diluted in phosphate buffer (pH 7.4, 0.1M) until it reached an absorbance of 0.7 to 0.8 at 730 nm in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA). Different concentrations of pramipexole 0.001-0.03 mg/mL, selegiline 0.015-0.225 mg/mL and amantadine 0.311-5.4 mg/mL were evaluated. The suppression of the colored radical on the medium was monitored through the decrease in absorbance. The positive control was prepared in the absence of the test drugs and was considered 100% of free radicals in the solution, which was used to calculate the scavenging ability of the drugs. The blank was prepared with a solution of potassium persulfate diluted in phosphate buffer. Samples were performed in triplicate and the ability of scavenging ABTS⁺ was calculated by equation I.

2.5 Evaluation of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) of antiparkinsonian drugs

FRAP was evaluated according to Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005) with some modifications. In this assay, antioxidants added to medium reduce the Fe⁺³TPTZ complex to form a blue-colored Fe⁺²TPTZ complex, which results in an increase in the absorbance.

FRAP reagent was prepared with 2.5 mL of the solution of TPTZ (10mM) in HCl (40mM), 2.5 mL FeCl₃·(6H₂O) solution and 25mL of acetate buffer (pH 3.6, 0.3Mm). The solution was incubated at 37°C for 30 min. For the assay, 900 μ L of FRAP reagent were added to 90 μ L of water and 10 μ L of trolox standard and 150 μ L of pramipexole (0.164 mg/mL) or 100 μ L of selegiline (0.573mg/mL) or 180 μ L of amantadine (19.23 mg/mL) in the reaction medium. After incubation at 37°C for 30 minutes, measurements were obtained in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA) at 595 nm. An analytical curve with different concentrations of trolox (4.0-20.0 μ M) was used for subsequent calculation of results in μ mol/L trolox equivalent mg/mL of the drugs. The positive control was prepared in the absence of the test drugs. The blank was prepared with a solution of FRAP reagent and water.

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis of the respiratory burst data was performed using Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. The concentration of pramipexole, selegiline and amantadine that caused 50% of DPPH and ABTS scavenging was considered the mean inhibitory concentration (IC₅₀). On the FRAP the results obtained with the test-drugs were compared to trolox curve. The results were considered significant if $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Ability of antiparkinsonian drugs to decrease/scavenge ROS in the neutrophil respiratory burst

Figure 1A presents the chemiluminescence produced by PMA-stimulated neutrophils in the absence (Control) or presence of 10^{-4} M pramipexole, selegiline and amantadine. Each curve was plotted with the median of at least 14 replicates.

Kruskal-Wallis indicated a significant difference in the peak values of the kinetic curves (KW= 28.9, $p < 0.0001$). Dunn's test revealed that the peak values obtained with both pramipexole and selegiline were significantly lower than control (Figure 1B). Amantadine lacked antioxidant effect.

As observed in Figure 1B, the control neutrophils have shown median cpm. 87859 (76463 to 105561), whereas the values for pramipexole, selegiline and amantadine were, respectively: 24364 (23208 to 26404), 57418 (53884 to 62901) and 78418 (74934 to 84717).

3.2 Free radical scavenging assays

The ability of pramipexole, selegiline and amantadine to scavenge ABTS⁺, DPPH[•] and FRAP was evaluated.

In the ABTS⁺ assay, both pramipexole and selegiline scavenged the positively charged ABTS⁺ radical in a concentration-dependent manner (Figure 2A and 2B). Pramipexole assay resulted in a linearity of R^2 0.9749 between 0.001 to

0.03 mg/mL. Maximum activity was found to be 99% at the concentration of 0.03 mg/mL and IC₅₀ was 0.002 mg/mL. Selegiline assay showed a linearity of R² 0.9934 between 0.015 and 0.225 mg/mL. Maximum activity was 54% at the concentration of 0.225 mg/ml and IC₅₀ was 0.191 mg/mL (Figure 2B). Amantadine did not present scavenging activity and the concentration-response curve parameters could not be calculated.

In the DPPH[•] assay any of the drugs presented scavenging activity (data not shown).

On FRAP assay, pramipexole (1mg/mL) reducing power was 11,8 µmol/L trolox equivalent and selegiline (1mg/mL) was 8,9 µmol/L trolox equivalent. As observed in the other tests, amantadine lacked antioxidant response in this assay.

4 DISCUSSION

Over the past few decades a large volume of data generated from clinical studies, autopsies and in vitro and in vivo experimental models have suggested that nitrosative and oxidative stress play an important role in neurodegeneration of the substantia nigra associated with PD. ROS/RNS lead to molecular damage (lipidic and protein peroxidation, DNA damage) that can disrupt biological functions and ultimately induce neuronal death (Danielson and Andersen, 2008; Perfeito, Oliveira, Rego, 2012).

This study demonstrated that both pramipexole and selegiline, but not amantadine, have antioxidant effects in vitro by scavenging superoxide anion (O₂^{•-}) on the respiratory burst, donating electron in the ABTS⁺ assay and presenting ferric reduction antioxidant power. This antioxidant capacity suggests a possible neuroprotective mechanism of these drugs beyond their already recognized mechanism of antiparkinsonian effect.

Pramipexole and selegiline produced positive effects scavenging ABTS⁺ radical and presenting ferric reduction antioxidant power but lacked effect towards DPPH[•] radical. The antioxidant activity of these drugs may be due to reducing power related to their chemical structure.

Pramipexole is a dopaminergic agonist that consists of a fused bicyclic tetrahydrobenzothiazole (Figure 3) (Baumann *et al.*, 2011). The antioxidant activity observed in the respiratory burst could have resulted from the neutralization

of the $O_2^{\cdot-}$ by the release of one proton (H^+) from the amino group (NH_2) of pramipexole. After the donation, the radical can resonate with the thiazole ring whereas the neutralization of the superoxide radical would allow it to dissociate into H_2O and O_2 . Moreover, pramipexole molecule also presents two secondary amine groups which can donate the pair of electrons to neutralize ROS and induce the antioxidant activity observed in the ABTS⁺ and FRAP assays. Our results corroborate studies from the literature that describe antioxidant activity for pramipexole both in vitro (Cassarino *et al.*, 1998; Ferger, Teismann, Mierau, 2000; Gu *et al.*, 2004) and in vivo (Shin *et al.*, 2009). In vivo, pramipexole inhibits ROS production via decreased turnover of dopamine metabolism mediated by its action on dopaminergic autoreceptors. In addition, it also presented a direct scavenging activity and stimulated cellular glutathione peroxidase and catalase (Shin *et al.*, 2009). Taken together, data seem to support an antioxidant activity for pramipexole which could result from intrinsic characteristics of its molecule.

Selegiline is a selective irreversible inhibitor of monoamino oxidase B (MAO-B), the enzyme responsible for the oxidative metabolism of dopamine and which activity increases in the brain during aging and neurodegeneration. The inhibition of MAO-B can prevent ROS formation from dopamine metabolism. Some studies have described a neuroprotective effect of this drug independent of its inhibitory action on MAO (Boll, Zubeldia, Rios, 2011; Follmer, 2013; Singh, Pillay, Choonara, 2007). Takahata *et al.* (2006) described that selegiline can decrease oxidative stress in *nigrostriatum* by augmenting the antioxidant capacity, i.e., increasing the activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT) and the level of GSH in specific brain regions. The results obtained in the present work suggest an intrinsic antioxidant ability of the selegiline molecule, which could be attributable to the propargylamine group (Figure 3). This group is formed by propargyl, containing the unit acetylene (alkyne), as well as by a tertiary amine. It is hypothesized that selegiline was able to reduce the respiratory burst through the release of a proton (H^+) from the acetylenic unit that neutralized the $O_2^{\cdot-}$. Moreover, the tertiary amine group could also have shared a pair of electrons and neutralized ROS, as observed in three out of four assays employed in this study. It is noteworthy that even though selegiline presented an intrinsic antioxidant activity, it was less effective than the one observed with pramipexole. Probably the formed radical in the selegiline molecule after the proton release is not very stable.

Amantadine lacked in vitro antioxidant activity in all the assays conducted in this study even though this drug also presents an amino (NH₂) group (Figure 3). Our results support the importance of a conjugated system to stabilize the load (like pramipexole) because isolated groups (as observed in amantadine) do not result in antioxidant activity.

Interestingly, pramipexole and selegiline failed to stabilize the radical DPPH[•]. A possible explanation for this lack of effect would be the low reactivity of this radical as well as steric hindrance caused by its bulky molecular structure (Prior, Wu, Schaich, 2005).

5 CONCLUSIONS

Both pramipexole and selegiline have shown in vitro antioxidant activity either in ABTS⁺ and FRAP assays as well as in respiratory burst, which is a more complex assay. Although some studies have already pointed into this direction, the literature was lacking a comparative study among antiparkinsonian drugs as well as a discussion on the hypotheses that could explain the antioxidant mechanisms of these drugs. If the antioxidant activity of pramipexole and selegiline offer neuroprotection and contributes effectively in delaying PD progression is an open question that remains to be answered.

REFERENCES

Baumann, M.; Baxendale, I.R.; Ley, S.V.; Nikbin, N. An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. **J. Org. Chem.**, v.7, p.442-495, 2011.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature.**, v.181, p.1199-1200, 1958.

Boll, M.C.; Zubeldia, M.A.; Rios, C. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **Curr. Neuropharmacol.**, v.9, n.2, p.350-359, 2011.

Cassarino, D.S.; Fall, C.P.; Smith, T.S.; Bennett, J.J.P. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. **J. Neurochem.**, v.71, n.1, p.295-301, 1998.

Danielson, S.R.; Andersen, J.K. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, n.10, p.1787-1794, 2008.

Datla, K.P.; Zbarsky, V.; Rai, D.; Parkar, S.; Osakabe, N.; Aruoma, O. I.; Dexter, D.T. Short-term supplementation with plant extracts rich in flavonoids protect nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.26, n.4, p.341-349, 2007.

Dexter, D.T.; Jenner, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radic. Biol. Med.**, v.63, p.132-144, 2013.

Drechsel, D.A.; Patel, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.44, n.11, p.1873-1886, 2008.

Ferger, B.; Teismann, P.; Mierau, J. The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an in vivo microdialysis study. **Brain Res.**, v.883, n.2, p.216-223, 2000.

Follmer, C. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Quim. Nova**, v.36, n.2, 306-313, 2013.

Freitas, M.; Porto, G.; Lima, J.L.; Fernandes, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clin. Biochem.**, v.41, n.7-8, p.570-575, 2008.

Gu, M.; Irvani, M.; Cooper, J.M.; King, D.; Jenner, P.; Schapira, A.H.V. Pramipexole protects against apoptotic cell death by non-dopaminergic mechanisms. **J. Neurochem.**, v. 91, n.5, 1075-1081, 2004.

Huber, K.; Krötz-fahning, M.; Hock, B. Respiratory burst as a biomarker for stress response. **Protoplasma**, v.229, n.2-4, p. 221-224, 2006.

Liddell, J.R.; Obando, D.; Liu, J.; Ganio, G.; Volitakis, I.; Mok, S.; Crouch, P.J.; White, A.R.; Codd, R. Lipophilic adamantyl or deferasirox based conjugates of desferrioxamine B have enhanced neuroprotective capacity: implications for Parkinson disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 60, p.147-156, 2013.

Mercado, G.; Valde, S.P.; Hetz, C. An ERcentric view of Parkinson's disease. **Trends Mol. Med.**, v.19, n.3, p.165-175, 2013.

Nolan, Y.M.; Sullivan, A.M.; Toulouse, A. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. **Trends Mol. Med.**, v.19, n.3, p.187-196, 2013.

Obeso, J.A.; Rodriguez-Oroz, M.C.; Goetz, C.G.; Marin, C.; Kordower, J.H.; Rodriguez, M.; Hirsch, E.C.; Farrer, M.; Schapira, A.H.V.; Halliday, G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat. Med.**, v.16, n.6, p.653-661, 2010.

Perfeito, R.; Oliveira, T.C.; Rego, A.C. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease- resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radic. Biol. Med.**, v.53, n.9, p.1791-1806, 2012.

Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agr. Food Chem.**, v.53,n.10, p.4290-4302, 2005.

Sánchez-González, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chem.**, v.90, n. 1-2, p.133-139, 2005.

Shin, J.Y.; Park, H.J.; Ahn, Y.H.; Lee, P.H. Neuroprotective effect of L-dopa on dopaminergic neurons is comparable to pramipexol in MPTP-treated animal model of Parkinson's disease: a direct comparison study. **J. Neurochem.**, v.111, n.4, p.1042-1050, 2009.

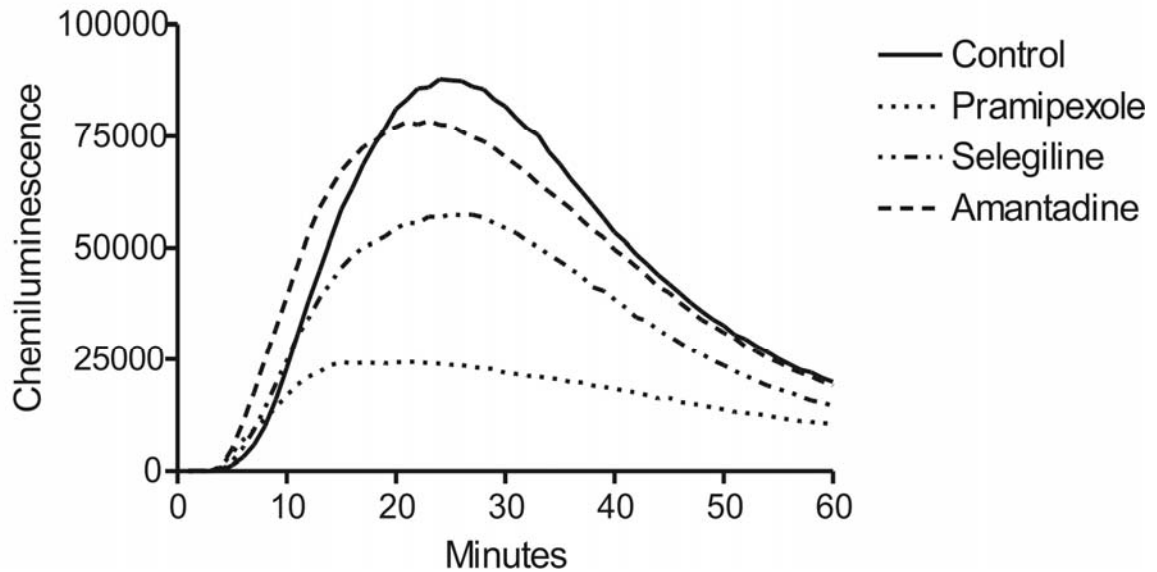
Singh, N.; Pillay, V.; Choonara, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, v.81, n.1, p.29-44, 2007.

Surendran, S.; Rajasankar, S. Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches. **Neurol. Sci.**, v.31, n.5, p.531-540, 2010.

Takahata, K.; Shimazu, S.; Katsuki, H.; Yoneda, F.; Akaike, A. Effects of selegiline on antioxidant systems in the nigrostriatum in rat. **J. neural. transm.**, v.113, n. 2, p.151-158, 2006.

Figure 1 - Activation of human neutrophils by PMA in the absence (control) or presence of antiparkinsonian drugs (10^{-4} M). Each group was composed by at least 14 replicates. A. Kinetic curves obtained each minute for 60 minutes. B. Box plot of the peak values on the kinetic curves. Data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. * $p < 0.001$ compared to control; & $p < 0.01$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to pramipexole. cpm = count per minute.

A



B

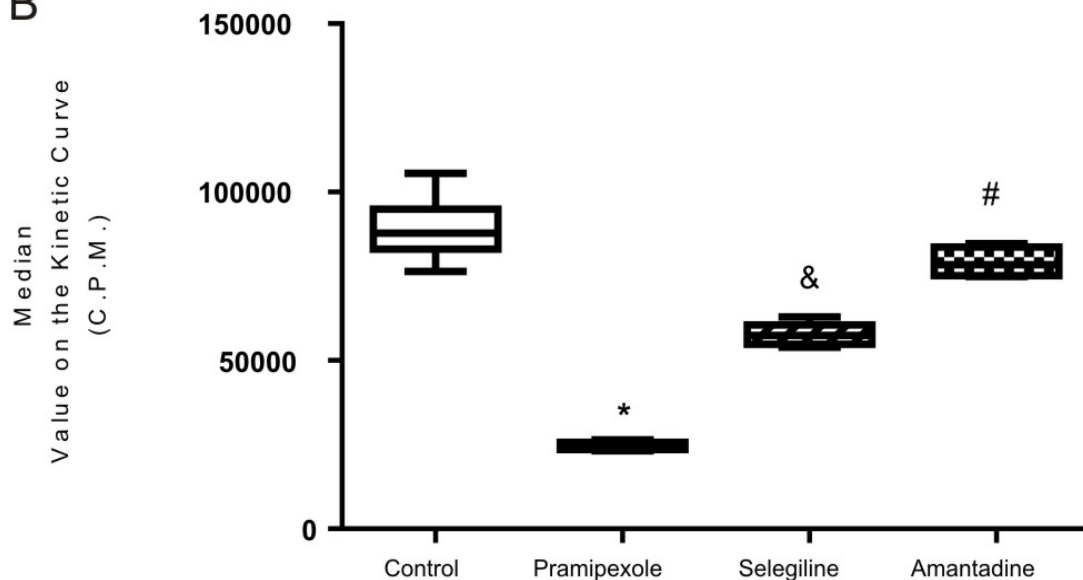


Figure 2 - Free radical scavenging activity of pramipexole (A) and selegiline (B) in the ABTS⁺ assay. Data are means \pm standard error mean (SEM) of triplicate values and are presented as percentage of inhibition relative to control.

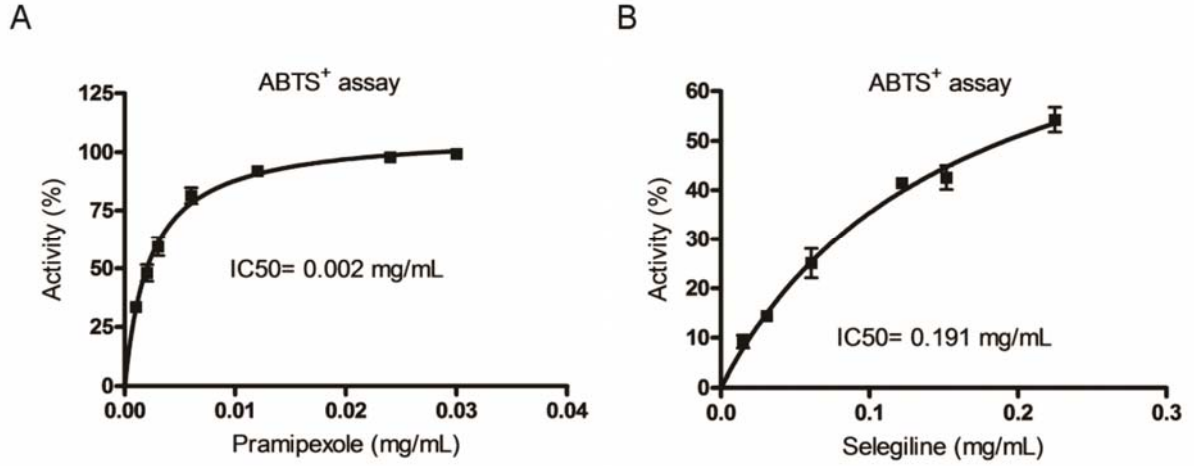
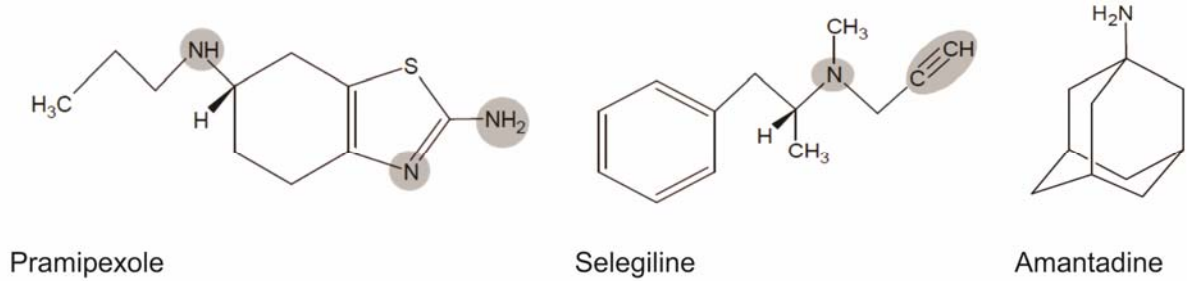


Figure 3 - Chemical structure of antiparkinsonian drugs. The structural characteristics of pramipexole, selegiline, but not amantadine, can define antioxidant action of these drugs. Highlighted areas would allow this antioxidant activity.



Artigo 2: To be submitted

4.2 High levels of plasma ferritin and oxidative stress biomarkers show a systemic response in the Parkinson's disease

Carine C. Farias^a, Kamila L. Bonifácio^a, Chiara C. Bortolasci^a, André S. Nogueira^a, Francis F. Brinholi^a, Andressa K. Matsumoto^b, Matheus A. Nascimento^c, Lúcio B. Melo^d, Suzana L. Nixdorf^e, Edson Lopes Lavado^f, Estefânia G. Moreira^a, Décio S. Barbosa^{a*}.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive disorder that is characterized by chronic degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. There are several evidences that support the involvement of oxidative stress in the neurodegeneration present in PD. The aim of the present study was to investigate the levels of biochemical, immunological and oxidative stress parameters in PD patients. The population under study consisted of 56 PD patients recruited from the neurology ambulatory from the Clinical Hospital State University of Londrina whereas the control group consisted of 56 healthy individuals from Londrina. To obtain homogeneous groups, parameters such as age, gender and ethnicity were controlled and matched between groups and there was no statistical difference in the demographic characteristics. Compared to controls, PD patients presented significant increase in seric ferritin, markers of lipid peroxidation (lipid hydroperoxides and malondialdehyde) and in the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase. On the other hand, the activity of catalase and aspartate aminotransferase (AST) were decreased. No difference among groups was observed in uric acid, cholesterol, low-density protein (LDL), high density proteins (HDL), triglycerides, glucose, urea, creatinine, alanina aminotransferase (ALT), iron and C-reactive protein (CRP). These results confirm that pathological features of PD can also be detected peripherally.

Keywords: Parkinson disease. Iron. Ferritin. Oxidative stress.

^a Graduation Program in Health Sciences of State University of Londrina, Paraná, Brazil

^b Pharmacy Undergraduate Students of State University of Londrina, Paraná, Brazil

^c Department of Physical Education of State University of Londrina, Paraná, Brazil

^d Neurologist at Clinical Hospital State University of Londrina, Paraná, Brazil

^e Department of Chemistry of State University of Londrina, Paraná, Brazil

^f Department of Physiotherapy of State University of Londrina, Paraná, Brazil

* Corresponding author. Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Tel: 55 43 3371-2451; E-mail addresses: sabatini@uel.br (D.S. Barbosa)

1 Introduction

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD). The characteristic of PD is the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) leading to decreased availability of dopamine in the *striatum* and, consequently, motor and non-motor manifestations [1].

Reactive oxygen species (ROS) are generated in various cellular compartments as a consequence of normal metabolism and, under homeostatic conditions, are balanced by endogenous antioxidant defenses that include detoxifying enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Oxidative stress describes the pathologic condition in which the balance between oxidant generation and detoxification mechanisms is shifted towards a pro-oxidant state. In this situation, reactive species accumulate and damage to nucleic acids, proteins, and membrane lipids may occur [2].

The neurons from SNpc are particularly vulnerable to oxidative stress because dopamine oxidation by monoamine oxidase or auto-oxidation generates ROS, which, in the presence of high concentration of iron and decreased antioxidant capacity in this region favors the process of neurodegeneration [3]. ROS may also decrease energy metabolism in the SN affecting the mitochondrial complex I, alter protein processing and induce chronic neuroinflammation [4].

Evidences of oxidative damage in the PD are suggested by increased iron, increased or reduced levels of SOD, reduced levels of glutathione as well as lipid peroxidation, oxidative DNA and protein damage in the brain [3,5,6]. Moreover some studies have described products of oxidative damage in the blood of patients with PD, such as increased at lipid hydroperoxide (LOOH) and by-products of nitric oxide (NOx) as well as changes of antioxidant enzymes SOD and CAT [7,8,9,10,11]. But until now, there is no consense regarding which by markers are more suitable for to evaluation PD.

Considering the absence of biomarkers for diagnosis and monitoring of the PD, the aim of this study was to investigate the status of routine laboratory measures as well as biomarkers of oxidative stress in patients with Parkinson.

2 Casuistic and methods

2.1 Casuistic

The population under study consisted of 56 PD patients recruited from the neurology ambulatory at Clinical Hospital State University of Londrina. PD was diagnosed and staged according to the criteria of United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UKPD) and Hoehn and Yahr Scale for Parkinson's, respectively. Patients in the stages 1-3 were included. Control group consisted of 56 healthy individuals and to obtain homogeneous groups, parameters such as age, gender and ethnicity were matched between groups.

Patients with clinical or laboratory evidence of autoimmune, renal, heart, liver and other neurological diseases, as well as self declared users of tobacco, alcohol or antioxidant supplements were excluded from both the PD and control groups. PD patients were on drug treatment depending on the severity of symptoms and severity of disorder. The drugs were: levodopa and carbidopa, levodopa and benserazide, pramipexole, amantadine, selegiline, biperiden or entacapone.

Blood was collected aseptically from the antecubital vein. Informed consent was obtained from the PD patients and control subjects, according to the protocol (n° 222/2011) approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina.

2.2 Methods

2.2.1 Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)

TRAP was evaluated according to the method described by Repetto et al. [12] in microplate reader Victor X-3, Perkin Elmer® (Waltham, MA, USA). Experimental conditions were: running time of 25 minutes, response range from 300 to 620 nm and a temperature of 30°C. This method detects hydro and/or liposoluble antioxidants present in serum. The results were expressed in μM trolox.

2.2.2 Lipid hydroperoxides – spectrophotometric assay (FOX-LOOH)

Hydroperoxides (LOOH) were determined using the ferrous oxidation xylenol orange (FOX) using the technique described by Jiang et al. [13]. The reading was performed at 560 nm in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA). The concentration was expressed in mM.

2.2.3 Lipid hydroperoxides - chemiluminescence assay (CL-LOOH)

CL-LOOH were determined according to an adaptation of the technique described by Flecha et al. [14]. This test is based on the premise that there is an increase in chemiluminescence (CL) associated with oxidative stress leading to the consumption of the antioxidant defenses from the formation of hydroperoxides. The reading was conducted in a β -counter Beckman[®]LS 6000SC (Fullerton, CA, USA) in a non-coincident counting for 30 seconds with a response range between 300 and 620 nm. The entire experiment was conducted in the dark, in phosphorescence bottles at 30°C for 120 minutes. The results were measured in counts per minute (cpm).

2.2.4 Lipid peroxidation – malondialdehyde (MDA) assay

MDA was quantified according to the technique described by Bastos et al. [15] which measures the levels of MDA by complexation with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) using MDA estimation through high performance liquid chromatography (HPLC Alliance e2695, Waters[®], Barueri, SP, Brasil). Experimental conditions included the use of a column Eclipse XDB-C18, Agilent[®] (Santa Clara, CA, USA) mobile phase consisting of 65% phosphate buffer (50 nM pH 7.0) and 35% HPLC grade methanol; flow rate of 1.0 mL/minute; temperature of 30°C; wavelength of 532 nm. MDA concentration in the samples was quantified based on a calibration curve and are expressed in μmol of MDA/mg proteins.

2.2.5 Nitric oxide metabolites (NOx)

NO levels were assessed indirectly by determining the plasma nitrite concentration using an adaptation of the technique described Navarro-González et al. [16]. This method is based on the reduction of the nitrate present in the sample to nitrite by oxidation-reduction reactions mediated by the system cadmium-copper reagent. Thereafter, Griess reagent was added to induce diazotization, forming a colored complex and subsequent detection at 540 nm. The quantification of NOx was made in a microplate reader Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, USA). The nitric oxide concentration was expressed in μM .

2.2.6 Advanced oxidation protein products (AOPP)

To measure protein oxidation, AOPP in plasma was quantified using the method described by Witko-Sarsat et al. [17] in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic® (Waltham, MA, USA) at a wavelength of 340 nm. AOPP concentration was expressed in μM of equivalent chloramine T.

2.2.7 SOD assay

The activity of the antioxidant enzyme SOD in erythrocytes was determined using the pyrogallol method described by Marklund and Marklund [18]. This technique is based on the inhibition of pyrogallol self-oxidation by SOD in aqueous solution. The assay was conducted in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic® (Waltham, MA, USA) at 420 nm and 37°C. During 5 minutes, variation in optical density (OD) was recorded every minute. The level of SOD that inhibited 50% of the pyrogallol oxidation was defined as one unit of enzymatic activity. The results were expressed U/mg Hb.

2.2.8 Catalase assay

The analysis of catalase activity was evaluated by measuring the decay in the concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) and the generation of oxygen using the method described by Aebi [19]. Measurement of catalase activity was

estimated through the difference between the initial reading and the reading conducted 30 seconds after the addition of 200mM H₂O₂ 30% at 240 nm in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA) with the temperature maintained at 25°C. The catalase values were expressed as U/mgHb .

2.2.9 Sulfhydryl group (SH)

Sulfhydryl groups from proteins were evaluated by the method described by Hu [20] and is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2 nitrobenzoic acid (DTNB) with sulfhydryl groups. Determination was conducted in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA) at 412 nm. Results are expressed as μ M/mg of plasmatic protein.

2.2.10 Paraaxonase 1 (PON 1) activity

Total plasmatic activity of PON1 was determined by the method described by Richter *et al* [21]. The rate of hydrolysis of phenyl acetate was determined in a microplate reader EnSpire, Perkin Elmer[®] (Waltham, MA, USA) at 270 nm and the temperature maintained at 25°C. Measures were recorded for 4 minutes each 15 seconds. The activity was expressed in U/mL based on the phenyl acetate molar extinction coefficient of 1.31 mMol/L cm⁻¹.

2.2.11 Biochemical and immunological assays

Uric acid, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglycerides, glucose, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), ferritin, iron and immunological C-reactive protein (CRP) were determined by automated methods using Dimension[®]RxL, (Deerfield, IL, USA) and i2000SR Architect (Abbott, IL, USA).

2.3 Statistical Analysis

Kolgomorov-Smirnov and Bartlett tests were used to evaluate normality and homogeneity of variance, respectively. Due to violation of these

assumptions, data were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney test and are presented as median and minimum and maximum values. Categorical variables (gender and ethnicity) were analyzed by the Fisher exact test. A p value <0.05 was considered significant and all analyzes were performed in GraphPadInStat v. 3.10.

3 Results

The demographic characteristics of PD and controls are shown in Table 1. As expected, there was no difference between the individuals regarding to age ($p= 0.7129$), gender ($p= 0.7067$) and ethnicity ($p= 1.0000$). Biochemical and inflammatory plasmatic parameters are shown in Table 2. The patients with PD presented significant increase in ferritin ($p= 0.0383$) and decrease in AST ($p= 0.0256$) compared with the controls. The other parameters (uric acid, cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glucose, urea, creatinine, ALT, iron and CRP) were not significantly altered.

Oxidative stress biomarkers are shown in Table 3. PD patients presented significant increase of blood oxidative stress as indicated by CL-LOOH ($p= 0.0083$), FOX-LOOH ($p< 0.0001$) and MDA ($p< 0.0001$). AOPP and NO levels were not different between groups ($p= 0.1159$ and $p= 0.1173$, respectively). Regarding the antioxidant status, PD patients showed lower activity of catalase ($p= 0.0025$) and higher activity of SOD ($p= 0.0003$). TRAP, SH and PON1 did not reach statistical significance ($p= 0.1335$, $p= 0.2920$ and $p= 0.0609$ respectively).

4 Discussion

Data from the present study support the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of PD, showing that oxidative stress markers may also be detected peripherally and is not restricted to the central nervous system (CNS). In the blood of PD patients it was observed increased serum levels of pro-oxidants and altered antioxidant defense when compared to control individuals.

Uric acid, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glucose, urea, creatinine, ALT, iron and CRP were not altered in PD patients. However a decrease in AST and an increase in ferritin levels were detected compared to control individuals. Excess of iron may trigger oxidative stress by conversing hydrogen

peroxide to hydroxyl radical [22,23] and elevation of labile iron concentration in the SN with increased ROS formation may play a role in the progression of PD. Intracellular free iron levels are controlled by seric ferritin, the main iron storage protein in the body [24]. Ikeda et al. [25] reported a significant association between PD and serum ferritin levels, which is corroborated by the results from the present study. Considering that the biosynthesis of ferritin is under transcriptional control and a post-transcriptional regulatory system, it could be suggested that the increased seric ferritin observed in PD patients may reflect a regulatory mechanism to compensate the increased availability of iron in tissues, particularly in the CNS. Thus, alterations in the molecular mechanisms that regulate ferritin content and limit iron challenge may contribute to the degeneration of dopaminergic neurons [26]. Regarding the decreased levels of AST observed in PD patients there is probably no relation to PD considering that its increase would indicate hepatic damage.

In the brain, rich in polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation gains importance. The increase of free radicals in the brain, especially hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) and lower level of antioxidants favours lipid peroxidation [27]. According to Sanyal et al. [9] and Agil et al. [28] there is oxidative stress in the CNS, parallels with oxidative processes at peripheral level in PD.

In this study, LOOH and MDA, which are indicators of lipid peroxidation, were significantly elevated in the blood of PD patients corroborating that these patients are under systemic oxidative stress. These findings are in agreement with other studies, showing increases in systemic oxidative stress, measured through blood lipid peroxidation levels [9,11,28].

The results of the present study revealed a slight increase in NO_x levels in PD patients relative to healthy controls but wasn't statistically significant. Similar result was found by Vinish et al. [10]. The nitric oxide could react with anion superoxide to form peroxynitrite (ONOO^-), a very strong oxidizing radical. This peroxynitrite increases oxidative stress, which might be causing loss of dopaminergic neurons [8].

Among the ROS-scavenging enzymes, SOD is considered the first defense against ROS formation. SOD is located in the cytoplasm (Cu,Zn-SOD) and in the mitochondria (Mn-SOD) and is responsible for catalytic dismutation of superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 [29]. Catalase is an antioxidant enzyme mainly responsible for catalyzing the decomposition of H_2O_2 to water and oxygen. $\text{O}_2^{\cdot-}$ is

constantly generated in the tissues and failure in its removal can initiate damage to polyunsaturated fatty acids and structural proteins of plasmatic membranes [7,10]. The present study showed increased activity of SOD and decreased activity of catalase in the erythrocytes from PD patients. The increased SOD possibly reflects a compensatory response to counteract increased superoxide radicals in these patients. The increase in SOD levels improves the remotion of $O_2^{\cdot-}$, however generates H_2O_2 , which in the presence of iron may become source of ROS. In this way, the decreased levels of CAT observed may reflect its consumption in order to decompose H_2O_2 . Increase of SOD and reduced CAT was described in some studies such as Sharma et al. [7] and Vinish, Anand and Prabhakar [10].

The level of antioxidants may play a crucial role in oxidative stress. However in this study TRAP, SH and PON levels did not reach statistical significance. Sharma et al. [7], Ikeda et al. [25], Buhmann et al. [30] have reported decreased levels of these biomarkers in the blood and this fact may be a consequence of oxidative stress in PD.

This study demonstrates that pathological features of PD can also be detected outside the CNS reinforcing the idea that PD is, in fact, a systemic disease. In conclusion, the results of this study confirmed an oxidative stress condition in PD patients and demonstrated that may be evaluated by some blood biomarkers. If these biomarkers, in particular the plasma ferritin, could be used to monitor disease progression or response to treatment is a subject that remains to be elucidated.

Author contributions

C.C.F. conducted the literature search and was responsible for manuscript preparation. C.C.F, K.L.B, C.C.B, F.F.B, A.K.M, M.A.N, S.L.N and L.B.M. were involved in execution of study. Statistical analysis was carried out by D.S.B and E.L.L. D.S.B and E.G.M were responsible for conception of study, review and critique of drafts and the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

None.

Funding

This work was supported by scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil to C.C.F.

Acknowledgments

We would like to thank our patients who graciously volunteered for this study.

References

- [1] Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2013;62(5): 803-19.
- [2] Golden TR, Patel M. Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(3):555-70.
- [3] Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(7):643-50.
- [4] Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013;62:132-44.
- [5] Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 2010;345(1-2):91-104.
- [6] Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:1-11.
- [7] Sharma A, Kaur P, Kumar B, Prabhakar S, Gill KD. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's patients in the Indian population. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14(1):52-7.
- [8] Nikam S, Nikam P, Ahaley SK, Sontakke AV. Oxidative stress in parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem* 2009;24(1):98-101.
- [9] Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, et al. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13(2):129-32.

- [10] Vinish M, Anand A, Prabhakar S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol* 2011; 58(2): 165-9.
- [11] Nikolova G, Mancheva V. Analysis of the parameters of oxidative stress in patients with Parkinson's disease. *Comp Clin Pathol* 2013;22:151-55.
- [12] Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996;255(2):107-17.
- [13] Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26(10):853-56.
- [14] Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10(2):93-100.
- [15] Bastos AS, Loureiro APM, Oliveira TF, Corbi SCT, Caminaga RMS, RossaCJr, Orrico SRP. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem* 2012;423(1):141-6.
- [16] Navarro-gonzález JA, García-benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44(3):679-681.
- [17] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int* 1996;49(5):1304-13.
- [18] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47(3):469-74.
- [19] Aebi HE. Catalase in vitro. In: Packer L, editor. *Methods Enzymology*. Elsevier, 1984.v.105, p.121-6.
- [20] HU ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI, (editors). *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 1994. p. 380-2.
- [21] Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1(2):147-52.
- [22] Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2011;118(6): 939-57.
- [23] Rouault TA. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2013;14(8):551-64.

- [24] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283(2-3):65-87.
- [25] Ikeda K, Nakamura Y, Kiyozuka T, Aoyagi J, Hirayama T, Nagata R, et al. Serological Profiles of Urate, Paraoxonase-1, Ferritin and Lipid in Parkinson's Disease: Changes Linked to Disease Progression. *Neurodegenerative Dis* 2011;8(4) :252-8.
- [26] Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hunot S, Hauw JJ, Agid Y, et al. Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantianigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;83(2):320-30.
- [27] Farooqui T, Farooqui AA. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011;2011:1-9.
- [28] Agil A, Durán R, Barrero F, Morales B, Araúzo M, Alba F, et al. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease Role of the l-dopa. *J Neurol Sci* 2006; 240(1-2):31-6.
- [29] Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(10):2013-54.
- [30] Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, et al. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol Dis* 2004;15(1):160-70.

Table 1 - Demographics characteristics of patients with PD and controls.

	PD Patients (n=56)	Controls (n=56)	p value
Gender ^a			0.7067
Female	29 (51.78%)	30 (55.55%)	
Male	27 (48.21%)	24 (44.44%)	
Ethnicity			1.0000
Caucasian	37 (66.07%)	35 (64.81%)	
No Caucasian	19 (33.92%)	19 (35.18%)	
Age (years) ^b	71 (53-85)	70(53-86)	0.7129

^aFisher's test, ^bMann-Whitney test. Data shown as median (min - max) for age.

Table 2 - Blood biochemical and inflammatory parameters in patients with PD and controls.

Biomarkers	PD Patients (n=56)	Controls (n=56)	p value	Reference value
Uricacid (mg/dL)	4.47 (2.62 - 8.24)	4.61 (2.85 - 7.50)	0.2996	3.70 - 7.20
Glucose (mg/dL)	94.00 (69.00 - 133.00)	94.50 (80.00 -116.00)	0.9214	70.00- 99.00
Total- cholesterol (mg/dL)	180.50 (104.00 - 260.00)	191.50 (128.00 - 267.00)	0.1904	<200.00
HDL- cholesterol (mg/dL)	48.00 (25.00 - 73.00)	49.00 (34.00 - 79.00)	0.2048	>60.00
LDL – cholesterol (mg/dL)	106.50 (48.00 - 188.00)	114.00 (59.00 -190.00)	0.4786	<130.00
Triglycerides (mg/dL)	105.50 (39.00 - 309.00)	109.00 (53.00 - 315.00)	0.1682	<150.00
Urea (mg/dL)	33.50 (15.00 - 61.00)	34.50 (23.00 - 66.00)	0.9809	15.00 - 38.00
Creatinine (mg/dL)	0.86 (0.55 - 1.60)	0.94 (0.60 - 1.56)	0.2764	0.80 - 1.30
Iron (mcg/dL)	87.50 (33.00 - 183.00)	94.50 (53.00 - 162.00)	0.0808	65.00 - 175.00
Ferritin (ng/mL)	140.49* (28.47 - 724.50)	120.28 (12.87 - 386.19)	0.0383	5.00 - 275.00
AST (U/L)	18.50* (12.00 - 37.00)	22.00 (14.00 - 68.00)	0.0256	15.00 -37.00
ALT (U/L)	35.00 (24.00 - 72.00)	38.00 (28.00 - 62.00)	0.1490	30.00 - 65.00
CRP (mg/L)	1.72 (0.17 - 52.90)	1.31 (0.17 - 6.89)	0.0857	until 3

Data are medians (min - max) and were evaluated by the Mann-Whitney test. LDL: low-density protein; HDL: high density proteins; ALT: alanine aminotransferase ; AST: aspartate aminotransferase; CRP: C-reactive protein.*p < 0.05.

Table 3 - Oxidative stress markers evaluated in PD patients and controls.

Biomarkers	PD patients (n=56)	Controls (n=56)	p value
FOX-LOOH (mM)	1.55* (1.02 - 2.55)	1.38 (0.75 - 1.79)	< 0.0001
CL-LOOH (cpm)	13,662.00* (1,293.00- 47,958.00)	9,760.00 (2,160.00- 30,600.00)	0.0083
MDA (μ M/mg Pt)	207.97* (141.40 - 274.09)	167.49 (137.87 - 212.59)	<0.0001
NO (μ M)	4.87 (1.86 - 38.14)	3.73 (1.43 - 16.77)	0.1173
AOPP (μ M)	120.53 (46.35 - 305.80)	128.33 (72.80 - 347.55)	0.1159
SOD (U/mg Hb)	4.19* (2.06 - 9.87)	3.23 (2.04 - 8.21)	0.0003
CAT (U/mg Hb)	5.33* (2.33 - 10.80)	6.63 (3.07 - 12.40)	0.0025
SH (μ M/mg Pt)	35.00 (22.00- 58.00)	38.00 (21.00- 60.00)	0.2920
TRAP (μ M trolox)	949.66 (756.54 - 1266.00)	994.16 (747.13 - 1280.00)	0.1335
PON 1 (U/mL)	193.46 (96.80 - 450.93)	220.96 (73.30 - 414.48)	0.0609

Mann-Whitney test. Data are expressed as median (min - max). TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; SH: Sulfhydryl group; MDA: malondialdehyde; NO: nitric oxide; FOX-LOOH: lipid hydroperoxides; CL-LOOH: lipid hydroperoxides by chemiluminescence; AOPP: Advanced oxidation protein products; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PON 1: total activity of paraoxonase 1. *p < 0.05

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo confirmam uma condição de estresse oxidativo em pacientes com DP e que esta pode ser avaliada por biomarcadores no sangue. Aparentemente a ferritina, um biomarcador utilizado em rotina laboratorial, sugere acompanhar o desenvolvimento da doença. Esse estudo também demonstrou que os medicamentos pramipexol e selegilina, mas não amantadina, possuem efeitos antioxidantes *in vitro*, sugerindo possíveis mecanismos neuroprotetores além de outros já conhecidos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S.; SOUNDARARAJAN, C.C.; VIVEKANANDHAN, S.; BEHARI, M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. **Indian Journal of Medical Research**, v.121, p. 111-115, 2005.
- AEBI, H.E. Catalase *in vitro*. in: PACKER, Lester. **Methods Enzymology**, Elsevier, v.105, p.121-126, 1984.
- AGIL, A.; DURÁN, R.; BARRERO, F.; MORALES, B.; ARAÚZO, M.; ALBA, F.; MIRANDA, M.T.; PRIETO, I.; RAMÍREZ, M.; VIVES, F. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's: Role of the L-dopa. **The Journal of Neuroscience**, v. 240, p. 31-6, 2006.
- AHMED, I.; TAMOUZA, R.; DELORD, M.; KRISHNAMOORTHY, R.; TZOURIO, C.; MULOT, C.; NACFER, M.; LAMBERT, J.C.; BEAUNE, P.; LAURENT-PUIG, P.; LORIOT, M.A.; CHARRON, D.; ELBAZ, A. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. **Movement Disorders**, v.27, n.9, p.1104-10, 2012.
- ANDICAN, G.; KONUKOGLU, D.; BOZLUOLCAY, M.; BAYÜLKEM, K.; FIRTIINA, S.; BURCAK, G. Plasma oxidative and inflammatory markers in patients with idiopathic Parkinson's disease. **Acta neurologica belgica**, v. 112, n.2, p.155-9, 2012.
- ARDUÍNO, M.D.; ESTEVES, A. R.; CARDOSO, M.S. Mitochondrial Fusion/Fission, Transport and Autophagy in Parkinson's Disease: When Mitochondria Get Nasty. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p.1-13. 2011.
- BASTOS, A.S.; LOUREIRO, A.P.M.; OLIVEIRA, T.F.; CORBI, S.C.T.; CAMINAGA, R.M.S.; ROSSA, C. Jr.; ORRICO, S.R.P. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, p.141-146, 2012.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.
- BOGDANOV, M.; MATSON, W.R.; WANG, L.; MATSON, T.; SAUNDERS-PULLMAN, R.; BRESSMAN, S.S.; FLINT BEAL, M. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain**, v.13, p.389-396, 2008.
- BRASIL, Portaria SAS/MS nº 228 de 10 de maio de 2010. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença de Parkinson. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_parkinson_republicado.pdf> Acesso em: 04/09/2011.
- CASSARINO, D.S.; FALL, C.P.; SMITH, T.S.; BENNETT, J.J.P. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. **Journal of Neurochemistry**, v.71, n.1, p.295-301, 1998.

CHOI, J.; SULLARDS, M.C.; OLZMANN, J.A, REES, H.D.; WEINTRAUB, S.T.; BOSTWICK, D.E.; GEARING, M, LEVEY, A.I.; CHIN, L.S.; LI L. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 10816-24, 2006.

DAUER, W.; PRZEDBORSK, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v.39, p. 889-909, 2003.

DATLA, P.K.; ZBARSKY, V.; RAI, D.; PARKAR, S.; OSAKABE , N.; ARUOMA, I.O.; DEXTER, T.D. SHORT-TERM Supplementation with Plant Extracts Rich in Flavonoids Protect Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, p.341-349, 2007.

DEXTER, T.D.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013. In press.

DI NAPOLI, M.; SHAH, I.M.; STEWART, A.D. Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 7, p.1693-1729, 2007.

DOHERTY, G.H. Homocysteine and Parkinson's Disease: A Complex Relationship. **Journal of Neurological Disorders**, v. 1, 2013.

GAD ELHAK, A.S.; GHANEM, A.A.A; ABDELGHAFAR, H.; EL DAKROURY, S.; SALAMA, M.M. Parkinson's Disease: Is It a Toxic Syndrome? **Neurology Research International**, v. 2010, p.1-10, 2010.

FLECHA, B.G.; ILESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p. 93-100, 1991.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, v.41, p.570-575, 2008.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a casual link? **Experimental Neurology**, v.193, p. 279-90, 2005.

HOEHN MM, YAHR MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. **Neurology**, v. 17, p. 427-42, 1967.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). **Methods in Enzymology**. California: Academic Press, p.380-382, 1994.

HUBER, K.; KRÖTZ-FAHNING, M.; HOCK, B. Respiratory burst as a biomarker for stress response. **Protoplasma**, v.229, p. 221-224, 2006.

IKEDA, K.; NAKAMURA, Y.; KIYOZUKA, T.; AOYAGI, J.; HIRAYAMA, T.; NAGATA, R.; ITO, H.; IWAMOTO, K.; MURATA, K.; YOSHII, Y.; KAWABE, K.; IWASAKI, Y. Serological Profiles of Urate, Paraoxonase-1, Ferritin and Lipid in Parkinson's Disease: Changes Linked to Disease Progression. **Neurodegenerative Diseases**, v. 8, p.252-258, 2011.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; Wolff, S.P, Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p. 853-856, 1991.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**,v. 345, p. 91-104, 2010.

KIM, J.S.; KIM, J.M.; O, J.J.; JEON, S.B. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and cell death by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.17, p. 1165-1168, 2010.

LANG, E.A. When and how should treatment be started in Parkinson disease? **Neurology**,v. 72, p. 39-43, Feb, 2009.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47 p. 469-471, 1974

MAZZIO, A.E.; CLOSE, F.; SOLIMAN, F.A.K. The Biochemical and Cellular Basis for Nutraceutical Strategies to Attenuate Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v.12, p.506-569, 2011.

MIGLIORE, L.; PETROZZI, L.; LUCETTI, C.; GAMBACCINI,G.; BERNARDINI,S.; SCARPATO,R.; TRIPPI,F.; BARALE, R.; FRENZILLI,G.; RODILLA,V.; BONUCCELLI, U. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. **Neurology**, v. 58, p. 1809-1815, 2002.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**, v.674, p.73-84, 2009.

MIZUNO, Y.; HATTORI, N.; KUBO, S.; SATO, S.; NISHIOKA, K. HATANO, T.; TOMIYAMA, H.; FUNAYAMA, M.; MACHIDA, Y.; MOCHIZUKI, H. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.363, p. 2215-2227, 2008.

MOSLEY, L.R.; BENNER, J.E.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, D.M.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, E.H. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, 261-281, 2006.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v.44 p. 679-681, 1998.

NIKAM, S.; NIKAM,P.; AHLEY, S.K.; SONTAKKE, A.V. Oxidative stress in parkinson's disease, **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.24, p. 98-101, 2009.

NIKOLOVA, G.; MANCHEVA, V. Analysis of the parameters of oxidative stress in patients with Parkinson's disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.22, p.151-155, 2013.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G .; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, 255, p.107-117, 1996.

RICHTER, R.J.; JARVINK, G.P.; FURLONG, C.E. Determination of Paraoxonase 1 status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. **Circulation-cardiovascular Genetics**, v. 1, p.147-152, 2008.

ROBERTS, A.R.; LASKIN, L.D.; SMITH, V.C.; ROBERTSON, M.F.; ALLEN, G.M.E.; DOORN, A.J.; SLIKKER, W. Nitrate and Oxidative Stress in Toxicology and Disease. **Toxicological sciences**, v.112, p. 4-16, 2009.

SÁNCHEZ-GONZÁLES, I.;JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**,v.90, n. 1-2, p.133-139, 2005.

SCHAPIRA, A.H.V. Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v.9, p. 7-14, 2002.

SHARMA,A.; KAUR, P.; KUMAR, B.; PRABHAKAR, S.; GILL, K.D. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's patients in the Indian population. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, p.52–57, 2007.

SHIN, J.Y.; PARK, H.J.; AHN, Y.H.; LEE, P.H. Neuroprotective effect of L-dopa on dopaminergic neurons is comparable to pramipexol in MPTP-treated animal model of Parkinson's disease: a direct comparison study. **Journal of neurochemistry**, v.111, n.4, p.1042-1050, 2009.

TAKAHATA, K.; SHIMAZU, S.; KATSUKI, H.; YONEDA, F.; AKAIKE, A. Effects of selegiline on antioxidant systems in the nigrostriatum in rat. **Journal of Neural Transmission**, v.113, n. 2, p.151-158, 2006.

TAYLOR, M.J.; MAIN, S.B.; CRACK, J.P. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease, **Neurochemistry International**, v.62 , p.803-819, 2013.

TSANG, H.K.A.; CHUNG, K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1792, p 643-650, 2009.

UTTARA, B.; SINGH, V.A.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A.T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, p.1304-1313,1996.

WU, D.; TEISMANN, P.; TIEU, K.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; ISCHIROPOULOS, H.; PRZEDBORSKI, S. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 6145-6150, 2003.

YUAN, H.; ZHANG, Z.; LIANG, L.; SHEN, Q.; WANG, X.; REN, S.; MA, H.; JIAO, S.; LIU, P. Treatment strategies for Parkinson's disease. **Neuroscience Bulletin**, v.26, n.1, p.66-76, 2010.

YUAN, R.Y.; WU, M.Y.; SHENE-PIN, H. Antioxidant status in patients with Parkinson's disease. **Nutrition Research**, v. 20, p. 647-652, 2000.

YOKOZAWA, T.; Cho, E.; Hara, Y.; Kitani, K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5068-5073, 2000.

ZHAO, B. Natural Antioxidants Protect Neurons in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **Neurochemical research**, v.34, n.4, p. 630-638, 2009.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI S.S. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 93-104, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de aprovação de pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	222/2011
CAAE:	0175.0.268.000-11
Processo:	19897/2011
Folha de Rosto:	446588
Pesquisador(a):	Carine Coneglian de Farias
Unidade/Órgão:	CCS - Departamento de Farmácia

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

“Avaliação do Estresse Oxidativo e Verificação da Ação Antioxidante de Drogas Utilizadas na Doença de Parkinson”

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 25 de outubro de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alexandrina Maciel Cardelli'.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido

Avaliação do estresse oxidativo e verificação da ação antioxidante de drogas utilizadas na doença de Parkinson.

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa “Avaliação do estresse oxidativo e verificação da ação antioxidante de drogas utilizadas na doença de Parkinson”, realizada no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar os marcadores pró-oxidantes e antioxidantes nos (nas) pacientes com DP e também em pacientes sem essa patologia e a possível ação antioxidante das drogas de escolha para o tratamento da doença de Parkinson. A sua participação é muito importante e ela se daria pela doação de 40 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 20mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em uma única etapa, em apenas um momento, sendo todos os materiais usados descartáveis. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa permita verificar os níveis de estresse oxidativo na fisiopatologia da DP, contribuindo assim no acompanhamento da patologia.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa ((43) 3371-2451), Biomedica Carine Conegliande Farias (67) 9991-6624)), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de

Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490, email cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2013.

Carine Coneglian de Farias

(RG: 001.638.774)

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

ANEXO C

Diagnósticos da DP segundo o banco de cérebros da sociedade de Parkinson do Reino Unido

1. Critérios necessários para diagnóstico de DP

- Bradicinesia
- E pelo menos um dos seguintes sintomas abaixo:
 - Rigidez muscular
 - Tremor de repouso (4-6 Hz) avaliado clinicamente
 - Instabilidade postural não causada por distúrbios visuais, vestibulares, cerebelares ou proprioceptivos

2. Critérios negativos (excludentes) para DP

- História de AVC de repetição
- História de trauma craniano grave
- História definida de encefalite
- Crises oculogíricas
- Tratamento prévio com neurolépticos
- Remissão espontânea dos sintomas
- Quadro clínico estritamente unilateral após 3 anos
- Paralisia supranuclear do olhar
- Sinais cerebelares
- Sinais autonômicos precoces
- Demência precoce
- Liberação piramidal com sinal de Babinski
- Presença de tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante
- Resposta negativa a altas doses de levodopa
- Exposição a metilfeniltetraperidínio

3. Critérios de suporte positivo para o diagnóstico de DP (3 ou mais são necessários para o diagnóstico)

- Início unilateral
- Presença de tremor de repouso
- Doença progressiva
- Persistência da assimetria dos sintomas

- Boa resposta a levodopa
- Presença de discinesias induzidas por levodopa
- Resposta a levodopa por 5 anos ou mais
- Evolução clínica de 10 anos ou mais

ANEXO D

Escala de classificação do estágio da DP

Escala de Hoehn e Yahr

1. Só envolvimento unilateral, geralmente com incapacidade funcional mínima ou nenhuma.
 2. O envolvimento bilateral ou mediana sem comprometimento do equilíbrio.
 3. Doença bilateral, incapacidade funcional leve a moderada, com reflexos posturais prejudicados, fisicamente independente.
 4. Severamente incapacitante, ainda capaz de andar ou ficar sem assistência.
 5. Confinamento para a cama ou cadeira de rodas a menos que ajudado.
-

Fonte: Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*. 1967; 17:427–42

ANEXO E

Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo

Data da coleta: ___/___/___

I- IDENTIFICAÇÃO

Nome:			
RG:			
Idade:	Data de Nascimento:/...../.....	Sexo: ()M ()F	
Endereço:		Nº:	Apto:
Bairro:	CEP:	Cidade:	
Fone Residencial:		Celular:	
Etnia: () Branco () Negro () Pardo () Amarelo () Indígena			
Estado Civil: () solteiro () casado () divorciado () viúvo			
E-mail:			
Ocupação:			
Médico/UBS:			

Jejum para coleta de sangue () SIM () NÃO

OBS: _____

Já tomou algum medicamento hoje antes da coleta de sangue?

() SIM () NÃO

Se a resposta for sim, qual medicamento _____

Peso atual (Kg): _____ Altura (m): _____

IMC (kg/m²): _____ Circunferência da cintura: _____

II- ESCOLARIDADE

- () Ensino Fundamental I (1º ao 5º ano) completo
- () Ensino Fundamental I (1º ao 5º ano) incompleto
- () Ensino Fundamental II (6º ao 9º ano) completo
- () Ensino Fundamental II (6º ao 9º ano) incompleto
- () Ensino Médio (1º ao 3º ano) completo
- () Ensino Médio (1º ao 3º ano) incompleto
- () Ensino Superior Completo () Ensino Superior Incompleto
- () Especialização () Mestrado () Doutorado

III- HÁBITOS PESSOAIS

1. Pratica Atividade Física?*

() Sim () Não

*Obs.: Consideram-se atividade física, os exercícios extras que são praticados de forma regular e que não fazem parte da atividade diária, com tempo de duração mínimo de 30 minutos e a frequência igual ou superior a duas vezes por semana.

2. Com relação ao Tabagismo, você:

() Nunca fumou

() Ex-fumante (fumou mas não fuma atualmente)

Há quanto tempo deixou de fumar _____

3. Bebida Alcoólica*

() Não consome

() Consumo diário (5 a 6 vezes ou mais por semana)

() Consumo semanal (3 vezes ou menos por semana)

() Consumo esporádico (1 vez ao mês)

*Obs: Independentemente do tipo de bebida e da quantidade de consumo.

IV- CONDIÇÕES DE SAÚDE

1. Classificação do estado do Parkinson baseado na escala de Hoehn e Yahr

() I () II () III () IV () V

2. Qual a idade de início da DP?

3. Há quanto tempo está com DP?

4. Alguem na família possui DP?

5. Medicamentos já utilizados para o tratamento da DP.

(Nome/ Posologia/ Tempo de tratamento)

6. Medicamentos em uso para tratamento da DP.

(Nome/ Posologia/ Tempo de tratamento)

7. Possui outras doenças?

8. Medicamentos em uso para tratamento de outras doenças

(Nome/ Posologia/ Tempo de tratamento)

*suplementos vitamínicos (cápsulas de vitaminas e/ou minerais)

9. Realizou alguma cirurgia nos últimos dez anos? () SIM () NÃO

Se a resposta for sim, qual foi o motivo da cirurgia? _____

ANEXO F

Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP)

Reagentes

1. ABAP 200mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Preparo no dia de uso
Pesar 216,96mg de ABAP e dissolver em 4mL H₂O destilada
Agitar no vórtex
Proteger com papel alumínio
2. Luminol (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Pesar 3,98mg de Luminol e dissolver em 10mL H₂O destilada
Agitar em vórtex
Forma corpo de fundo
Proteger com papel alumínio
Conservar em geladeira
3. Luminol - Solução de trabalho
Preparar no dia do uso
A partir da Solução Mãe, agitar o tubo e pipetar 400μL LUMINOL – SOL. MÃE e diluir com 3600μL de H₂O destilada
Proteger com alumínio
Agitar em vórtex
4. TROLOX - Solução mãe (20μM) (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Pesar 5mg e dissolver em 10mL Tampão Glicina pH=8,6
Proteger com papel alumínio
Agitar em vórtex
Conservar em geladeira
5. TROLOX - Solução de trabalho
Preparo no dia de uso
Agitar e pipetar 8μL TROLOX SOL. MÃE e diluir com 1592μL de Tampão Glicina

pH = 8,6

Agitar em vórtex

6. Tampão glicina (Synth[®], Brasil)

Pesar 3,75g de glicina dissolver com + 400mL H₂O destilada em béquer de vidro

Acertar pH em 8,6 com KOH 1M

Transferir o tampão para balão volumétrico de 500mL e completar o volume

Transferir o tampão para frasco de vidro identificado e conservar em geladeira.

Procedimento

- ✓ Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

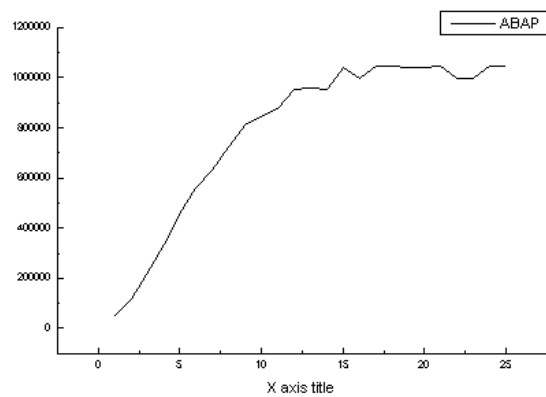
Curva ABAP

Tampão Glicina _____ 171µL

Luminol _____ 9,5µL

ABAP _____ 9,5µL

Homogeneizar bem.



Curva Trolox (fazer pelo menos em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171µL

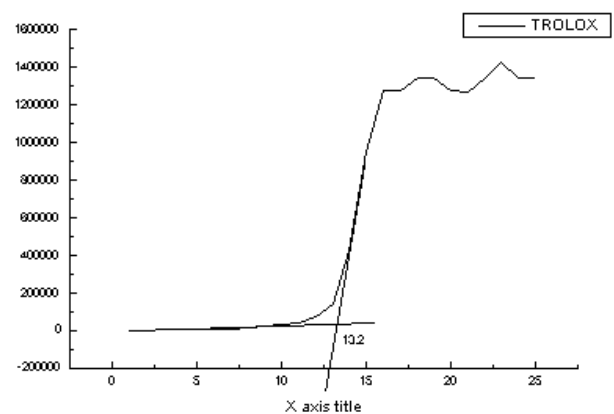
Luminol _____ 9,5µL

Trolox _____ 9,5µL

ABAP _____ 9,5µL

Tempo da curva Trolox entre 12 e 14 min

Homogeneizar bem.



Reação com Soro (fazer em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171µL

Luminol _____ 9,5µL

Soro diluído 1 :20 com H₂O__ 5µL

ABAP _____ 9,5µL

Homogeneizar bem.

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30 °C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm). O cálculo do valor de TRAP foi realizado seguindo a equação:

$$\text{TRAP}(\mu\text{M Trolox}) = D_4 \times \tau_{\text{amostra}} / \tau_{\text{Trolox}}$$

Onde D_4 é o fator de diluição da amostra (780), τ_{amostra} , é o tempo de indução da amostra e τ_{Trolox} , é o tempo de indução provocada pela adição de 1µM Trolox. Os resultados foram expressos em µM Trolox.

ANEXO G

Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (FOX-LOOH)

Reagentes

1. H₂SO₄ 250mM (Merck[®], Germany)

Em um balão de 10mL colocar um pouco de água (em torno de 2mL). Adicionar 245µL de H₂SO₄ e completar o resto do balão com de água.

2. Padrão: 1,1,3,3 tetraethoxypropane (TEP) 4mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Em um balão de 50mL colocar um pouco de água (em torno de 20mL). Adicionar 48µL de TEP e completar o resto do balão com de água.

3. Reagente de FOX

Em um frasco que comporte 100mL adicionar os reagentes na seguinte ordem: primeiro colocaremos 90mL metanol (Vetec[®], Brasil) puro e adicionaremos em seguida 10mL de H₂SO₄ 250mM (preparado conforme item acima). Após esta fase colocaremos o 88mg BHT (Vetec[®], Brasil) seguido de 7,6mg de xylenol orange (Acros[®], Bélgica). Para terminar o reagente adicionamos 9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado (Synth[®], Brasil). O reagente deve ser armazenado em geladeira e ao abrigo da luz. O reagente só pode ser utilizado por até 2 dias.

Curva de calibração

REAGENTES	BRANCO	P1	P2	P3	P4	P5
Concentração (mM)	-	4,0	2,0	1,0	0,500	0,250
H ₂ O deionizada (µL)	-	-	100	100	100	100
Padrão TEP (µL)	-	-	100	100	100	100
Reagente de FOX (µL)	900	900	900	900	900	900

Procedimento - amostra

REAGENTES	BRANCO	AMOSTRA
Amostra (μL) (triplicata)	-	100
Reagente de FOX (μL)	900	900

A reação da curva foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos e a reação da amostra também foi incubada durante esse mesmo período e depois centrifugada durante 10 minutos a 3000rpm e em seguida feita a leitura em espectrofotômetro Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 560 nm. A concentração de FOX foi expressa em mM.

Cálculo do fator:

$$\text{Fator} = \frac{\text{concentração do padrão}}{\text{leitura do espectrofotômetro}}$$

Obs.: Fator +/- 6

Cálculo da concentração da amostra:

$$\text{Concentração} = \text{fator} \times \text{leitura da amostra}$$

ANEXO H

Determinação de hidroperóxidos por quimiluminescência (QL-LOOH)

Reagente

1. Diluição do T-butil

Diluir 386 μ L de t-butil + 9614 μ L de água destilada deionizada. O t-butil deve ficar na geladeira e ao abrigo da luz.

Procedimento

Programação do aparelho contador β marca Beckman[®] LS 6000 (Fullerton, CA, EUA)

Manter a temperatura do aparelho (OUT) entre 29 e 31° C

- ✓ Main Menu – sel Review and Edit User Program
- ✓ Review/Edit – sel Luminescencia
- ✓ Review/Edit – sel Counting time: 0,5min
 - Edit Other Parameters
- ✓ Edit Other Parameters – sel Data Calculation
- ✓ Data Calculation – sel number of data points: 5
 - sel count time/data point: 0,10
 - sel count sample set: 1
 - sel factor: 1
- ✓ Voltar ao menu principal
- ✓ Automatic start (quando a rack já estiver dentro do aparelho)

Colocar os tubos na rack (vazios) para fazer a pré-leitura e escolher os melhores frascos (12) – aqueles com leituras basais parecidas. Manipular os frascos no escuro.

Reação

- 6 primeiros frascos : Estimulados
 - ✓ 1730 μ L de tampão fosfato KCl
 - ✓ 250 μ L de plasma
 - ✓ 20 μ L de T-butil (diluído)
- 6 últimos frascos : Brancos
 - ✓ 1730 μ L de tampão fosfato KCl
 - ✓ 250 μ L de plasma

Cálculo

- Em cada leitura: Calcular a média de cada paciente desprezando o 1º valor, calcular a média dos tubos brancos, desprezando o 1º valor também
 - Diminuir a média dos tubos brancos dos tubos estimulados correspondentes
 - Calcular a média das 12 leituras.
- O resultado é expresso em com.

ANEXO I

Determinação de malondialdeído (MDA)

Reagentes

Para todas as soluções usar água Milli-Q.

1. BHT 0,2% (Vetec[®], Brasil)

Pesar 0,1g de BHT e diluir em 50mL de etanol (Synth[®], Brasil). Armazenar em um tubo falcon a temperatura ambiente

2. TCA 7,2% (Synth[®], Brasil) + KI 1% (sol. Água) (Merck[®], Germany)

Pesar 1g de KI e 7,2g de TCA e diluir em 100mL de água. Armazenar ao abrigo da luz e na geladeira.

3. TBA 0,6% (sol. Água) (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar 0,6g de TBA e diluir em 100mL de água. Esquentar para dissolução!!! 60°C + peixinho no agitador.

4. NaOH 10N (Nuclear[®], Brasil)

Pesar 1,2g de NaOH e diluir em 3mL de Água MiliQ - validade de 1 semana. Armazenar na geladeira.

5. H₂SO₄ 1% (Merck[®], Germany)

2ml Ác. Conc. + 198mL de ÁguaMiliQ

6. Tampão fosfato (Fase móvel)

Pesar 5,3g de KH₂PO₄ (Nuclear[®], Brasil) e 10,62 de K₂HPO₄ (Êxodo científica[®], Brasil), dissolver em 2L de Água Milli-Q.

Acertar o pH = 7,0.

Filtrar o tampão.

Colocar no ultrassom por 10 min. Armazenar em geladeira.

7. Preparo da Fase Móvel

Tampão fosfato 50nM pH 7,0 (65%) + metanol grau HPLC (35%) (Panreac®, Espanha)

Preparo da Curva de Calibração

Solução padrão de MDA (Acros®, Bélgica)

Diluir 22µL de MDA em 10mL de H₂SO₄ 1% em um balão de 10 mL.

Deixar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas.

Após, armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Solução de MDA diluída (300x)

Em um eppendorf, diluir 5µL da solução diluída de MDA em 1495µL de H₂SO₄ 1%.

Armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Leitura da solução diluída em espectrofotômetro

Fazer a leitura da solução diluída em 245 nm com cubeta de quartzo. Usar H₂SO₄ 1% como branco.

A D.O. da solução deve estar entre 0,6-0,7

(Variação aceitável de um dia para outro → 15%)

Utilizar a D.O. obtida para calcular a concentração real de MDA na solução:

$$C = A / \xi \quad (\text{sendo } C = [\text{MDA}], A = \text{absorbância e } \xi = 13700)$$

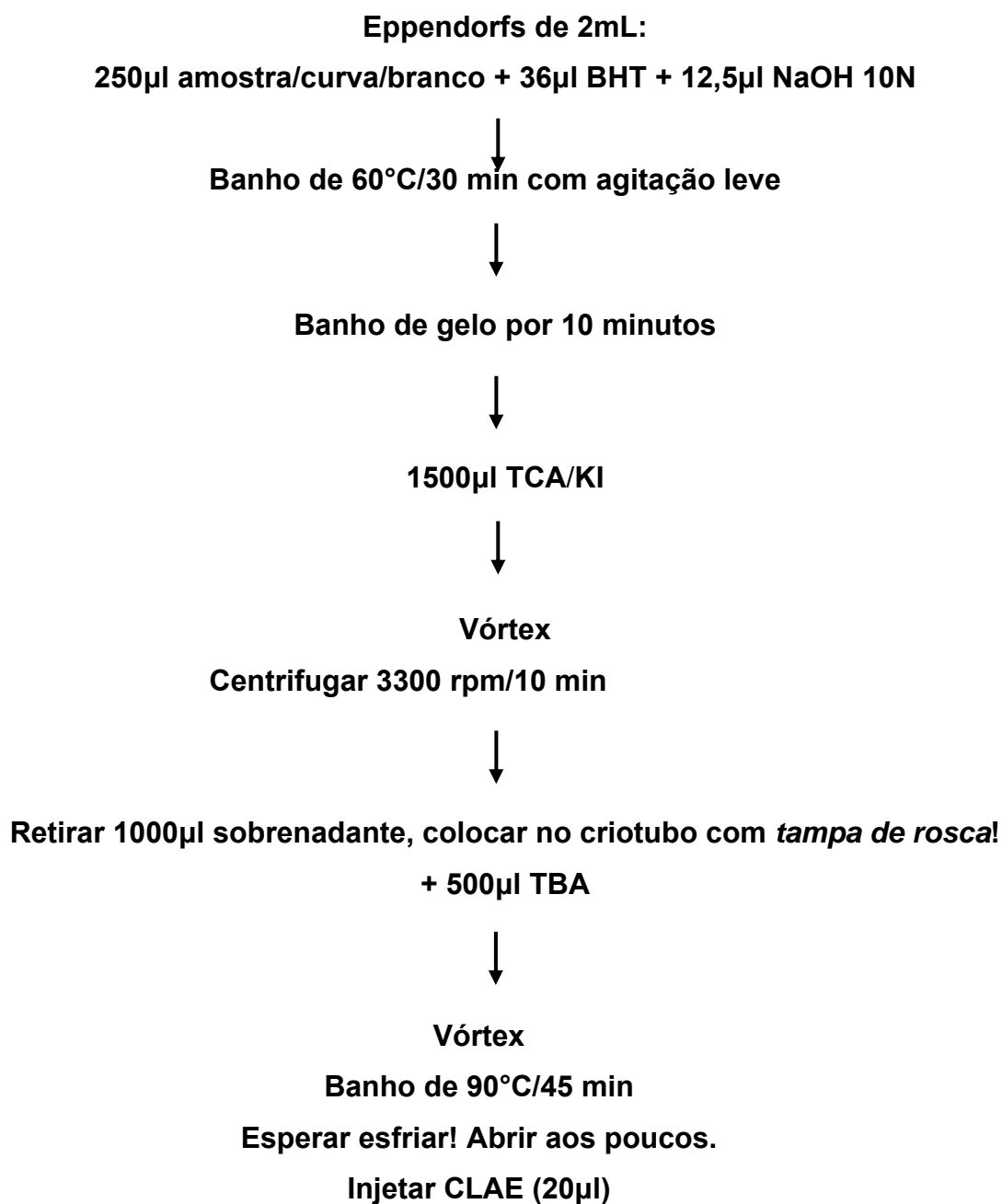
Obtida a concentração real da solução diluída de MDA, calcular as diluições necessárias para obter as concentrações de 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 1,5; 2,00. Manter o volume final de 250µL.

Os pontos da curva de calibração devem ser preparados a partir da solução diluída de MDA e devem ser diluídos em um pool de plasma de 6 indivíduos saudáveis. Fazer um branco contendo 250µL de pool de plasma. Seguir os passos para o preparo de amostras também para a curva de calibração e para o branco.

Preparo das Amostras/Curva de Calibração

Para não ocorrer interferência devido à presença de fibrina, é preciso centrifugar as amostras antes de qualquer etapa! (10000 rpm/5 min).

As amostras podem ser preparadas no dia anterior à injeção no CLAE (armazenar em geladeira).



Para a realização das análises do aduto TBA-MDA-TBA é utilizado um sistema de CLAE Alliance e2695, Waters® (Barueri, SP, Brasil) com uma coluna Eclipse

XDB-C18 4,6mm x 250mm 5 μ m, Agilent[®] (Santa Clara, CA, EUA) e uma fase móvel composta por 65% tampão fosfato (50nM pH 7,0) e 35% metanol grau HPLC, com a taxa de fluxo de 1,0 mL de fase móvel por minuto, mantendo a coluna em uma temperatura constante de 30°C. A leitura é realizada com um comprimento de onda fixado em 532 nm.

Para análise dos dados é utilizada a curva de calibração preparada com a solução de MDA em suas diferentes concentrações traçando medidas de área de pico a 532 nm contra a concentração. A concentração de MDA nas amostras é quantificado com base na curva de calibração e expressas em μ mol de MDA/mg de proteínas.

ANEXO J

Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Reagentes

1. Sulfato de Zinco 75mmol/L (CAAL[®], Brasil)

2,156g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 2,156g de Sulfato de Zinco, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

2. Hidróxido de Sódio 55mmol/L (Nuclear[®], Brasil)

220mg _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 220mg de Hidróxido de Sódio, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

3. Tampão Glicina (45g/L, pH 9,7) (Synth[®], Brasil)

4,5g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 4,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

4. Tampão Glicina (15g/L, pH 9,7) (Synth[®], Brasil)

1,5g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 1,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Acertar o pH em 9,7 utilizando hidróxido de sódio.

Armazenar em geladeira.

5. Sulfato de cobre 5mmol/L (Synth[®], Brasil) em Tampão Glicina (15g/L, pH 9,7)

62,42mg _____ 50mL de tampão Glicina-NaOH

Pesar 62,42mg de Sulfato de cobre, adicionar em balão volumétrico de 50mL, dissolver com um pouco de tampão glicina 15g/L e completar o volume para 50mL.

Preparado no dia de uso.

6. Ácido Sulfúrico 100mmol/L (Merck[®], Germany)

1,4mL H₂SO₄ _____ 250mL H₂O destilada

Adicionar um pouco de água destilada em um balão volumétrico de 250mL, pipetar 1,4mL de Ácido sulfúrico e completar o volume para 250mL.

Preparar o reagente em capela.

Armazenar em temperatura ambiente.

7. Sol. Estoque Padrão NaNO₂ 100mM (Synth[®], Brasil)

69,00mg _____ 10mL H₂O destilada

Pesar 69mg de NaNO₂ e adicionar em um tubo de vidro. Adicionar 10 mL de água destilada. Tampar tudo com parafilm e verter para dissolver.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

8. Reagente 1 – Sulfanilamida (Acros[®], Bélgica)

2,0g Sulfanilamida _____ 100mL de Ácido Fosfórico 5%

Pesar 2g de Sulfanilamida, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de ácido fosfórico 5% e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

9. Reagente 2-N-naphthylethylenediaminedihydrochloride (NEDD)

(Sigma Aldrich[®], EUA)

200mg NEDD _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 200mg de NEDD, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

Desproteinização

Adicionar, em eppendorf, em triplicata, 60µL de amostra + 60µL de 75mmol/L ZnSO₄;

Agitar 30sec no vórtex;

Centrifugar por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente;

Após centrifugar, adicionar 70µL de 55mmol/L NaOH;

Agitar 30sec no vórtex (não precisa quebrar o sedimento)

Centrifugar por 5min a 10000rpm a temperatura ambiente;

Transferir 150µL do sobrenadante para tubo de ensaio de vidro pequeno (sobrenadante não deve estar turvo);

Adicionar 50µL de tampão glicina (45g/L, pH 9,7).

Ativação dos grânulos de cádmio (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Para esta técnica utiliza-se 3 grânulos pequenos.

Grânulos ficam estocados em H₂SO₄ 100mmol/L

Em capela, lavar os grânulos que serão utilizados com H₂O destilada 3 vezes (com auxílio de um béquer e uma peneira)

Colocar a solução de CuSO₄ 5mmol/L em um pote e adicionar os grânulos previamente lavados. São então, deixados em contato por 5min.

Os grânulos ativados devem então ser usados dentro de 10min.

Retirar os grânulos da solução e adicionar a quantidade necessária em cada vial.

Após o uso, os grânulos são lavados e estocados em 100mmol/L de H₂SO₄.

Os grânulos que ficarem pretos mesmo após serem lavados com H₂SO₄ devem ser descartados.

Redução do nitrato a nitrito

3 grânulos são adicionados ao tubo de ensaio contendo a amostra e o tampão glicina.

Procurar utilizar os grânulos com tamanhos próximos!

Deixar em agitação contínua por 10min em agitador tipo Kline;

Transferir 100µL de cada amostra para a microplaca para a determinação de nitritos.

Curva de calibração (triplicata)

Fazer a diluição dos padrões na própria microplaca antes de adicionar qualquer reagente.

1. Preparar a Solução de Uso NaNO_2 125 $\mu\text{mol/L}$ (P5): Em um balão volumétrico de 100mL dissolver 125 μL de Solução Estoque Padrão NaNO_2 100mM
2. Adicionar 100 μL de água destilada nos poços A1, A2, A3 (brancos)
3. Adicionar 100 μL Solução de Uso NaNO_2 125 $\mu\text{mol/L}$ no poço B1, B2, B3 (primeiro ponto)
4. Adicionar 100 μL de água destilada nos poços C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3
5. Adicionar 100 μL Solução de Uso NaNO_2 125 $\mu\text{mol/L}$ no poço C1 e homogeneizar com a própria pipeta.
6. Transferir 100 μL da solução C1 para o poço D1 e homogeneizar com a própria pipeta.
7. Transferir 100 μL da solução D1 para o poço E1 e homogeneizar com a própria pipeta.
8. Transferir 100 μL da solução E1 para o poço F1 e homogeneizar com a própria pipeta.
9. Retirar 100 μL do poço F1 e descartar.
10. Repetir o mesmo procedimento (a partir do passo 5) para as outras duas curvas de calibração (Coluna 2 e 3)

Quantificação do teor de nitritos

Após a adição das amostras e da diluição seriada do padrão na microplaca, adiciona-se 50 μL do Reagente 1 e 50 μL do Reagente 2 a cada poço. Incubar por 10min a temperatura ambiente. A leitura é realizada em uma leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, EUA), 540nm.

Importante: Toda solução que entrou em contato com o cádmio deve ser descartada como resíduo tóxico (armazenar em potes de plástico para descarte adequado)

Cálculo do fator:

$$\text{Fator} = \frac{\text{concentração do padrão}}{\text{leitura do espectrofotômetro}}$$

Obs.: Fator +/-70

Cálculo da concentração da amostra:

$$\text{Concentração} = \text{fator} \times \text{leitura da amostra}$$

ANEXO K

Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)

Reagentes

1. Iodeto de Potássio 1,16M (Merck[®], Germany)

Pesar reagente 0,962g _____ 5mL de H₂O destilada

2. Padrão Estoque Cloramina T 1mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar o padrão 28,17mg _____ 100mL H₂O deionizada

3. Ácido Acético (Vetec[®], Brasil)

Amostras

Plasma diluído 1:5 com PBS, em tubos diluir as amostras da seguinte maneira, 200uL de plasma + 800uL de PBS (triplicata)

Procedimento

Diluição do padrão (padrão estoque): 500µL padrão estoque + 4,5ml PBS

Realizar curva em triplicata.

REAGENTES	BRANCO	P1	P2	P3	P4	P5	AMOSTRA
[] Mm	-	100	50	25	12,5	6,25	-
PBS (µL)	1000						-
Padrão (µL)	-	1000	1000	1000	1000	1000	-
Amostra (µL)	-	-	-	-	-	-	1000
Ác Acético (µL)	100	100	100	100	100	100	100
KI (µl)	50	50	50	50	50	50	50

A reação foi lida em espectrofotômetro Helios α , Thermo Spectronic® (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 340 nm.

Cálculo do fator:

Fator= $\frac{\text{concentração do padrão}}{\text{leitura do espectrofotômetro}}$

Obs.: Fator +/-70

Cálculo da concentração da amostra:

Concentração= fator x leitura da amostra. A concentração de AOPP foi expressa em $\mu\text{mol/L}$ de equivalente de cloramina T.

ANEXO L

Determinação da superóxido dismutase (SOD)

Colher amostra de sangue com EDTA. Lavar as hemácias 3x com solução fisiológica para obter papa de hemácia necessária ao preparo do hemolisado (5 minutos à 300rpm em tubo Falcon).

Preparo do Hemolisado

Solução de hemácias diluídas a 1/20 em água destilada (50µl de papa de hemácia pré-lavada + 950µl de água destilada). Determinar a hemoglobina com essa mesma diluição utilizando solução salina.

Reagentes

1- Pirogallol (Merck[®], Germany)

6,3 mg de pirogallol + 5 ml de HCL 0,001N

Manter ao abrigo da luz. Preparar no dia.

2- Tampão Tris (Hidroximetil) aminometano

Pesar 12,12 g TRIS (Sigma-Aldrich[®], EUA) + 0,186g EDTA (Synth, Brasil) – Os reagentes foram dissolvidos em 60 mL de água destilada, acertado o pH com HCl puro e completado o volume para 100 mL com água destilada.

Manter na geladeira.

3- Ácido clorídrico 0,12N (Merck[®], Germany)

1,20 mL de HCL + 100 mL de água destilada ou

A temperatura do fotômetro deve ser estabilizada em 37°C e a leitura realizada em 420 nm, durante 5 minutos anotando a variação de D.O. a cada minuto.

Curva do pirogallol

REAGENTES	BRANCO	REAÇÃO
Água destilada	880 µl	860µl
Tampão tris	100 µl	100 µl
Pirogallol	-	15 µl

Curva da reação

REAGENTES	BRANCO	REAÇÃO
Água destilada	880 µl	860 µl
Tampão tris	100 µl	100 µl
Amostra (he a 1/20)	Usar com 10, 20 e 30 µl	Usar com 10, 20 e 30 µl
Pirogallol	-	15 µl

Cálculo da concentração da amostra

Foi realizada a razão:

$$r = \frac{a}{b}$$

a = variação da densidade óptica da amostra 4 minutos (DO com 5 minutos, subtraída da DO no minuto 1) ÷ 4 para ser em minuto

b = variação da densidade óptica do pirogallol em 4 minutos (DO com 5 minutos, sub- traída da DO no minuto 1) ÷ 4 para ser em minuto.

No programa Origin, coloco à esquerda os volumes da amostra utilizados para plotar a curva e à direita a razão de cada um deles. Os volumes foram: 0 que equivale ao ponto máximo da curva, ou seja 1. 10, 20 e 30 µl, com as suas respectivas razões. De posse destes valores obtivemos uma tabela de semilog (log 10 de 0,1 a 1) para obtermos uma reta. Nesta curva analise o ponto de interceção do eixo y com a curva e deste ponto, o equivalente a 50% dele. O valor de X equivalente a este 50%, equivale a uma unidade SOD em microlitros. O resultado final é expresso em USOD/mg de hemoglobina/minuto.

ANEXO M

Determinação da catalase

Colher amostra de sangue com EDTA. Lavar as hemácias 3x com solução fisiológica para obter papa de hemácia necessária ao preparo do hemolisado (5 minutos à 300rpm em tubo Falcon).

Preparo do hemolisado

A partir de papa de hemácia lavada, foi feito na proporção de 1/200 com água destilada (10 μ L de hemácia lavada + 1990 μ L de água destilada). Determinar a hemoglobina com diluição da SOD.

Reagentes

1- Tampão TRIS/HCl - 1M EDTA 5 mM PH 8,0

Pesar 12,12 g TRIS (Sigma-Aldrich[®], EUA) + 0,186g EDTA (Synth[®], Brasil) – Os reagentes foram dissolvidos em 60mL de água destilada, acertado o pH com HCl puro e completado o volume para 100mL com água destilada.

2- Solução H₂O₂ 200mM (Synth[®], Brasil)

220 μ L tampão tris EDTA pH 8,0 + 2mL de água destilada + 60 μ L H₂O₂ 30%.

Procedimento

Após o preparo da solução de H₂O₂ 200 mM, foi realizada uma leitura a 240 nm, temperatura de 25°C para padronização. A leitura da D.O. deve estar em torno de 0,500 (0,480 a 0.520). Caso esta leitura não seja obtida, fazer a correção, aumentando ou diminuindo a quantidade de H₂O₂ 30%.

REAGENTES	BRANCO	REAÇÃO
Água destilada	200 μ L	200 μ L
Tampão Tris/HCL EDTA pH 8,0	1790 μ L	1690 μ L
H ₂ O ₂ 30% 200mM	-	100 μ L

Uma vez padronizada a solução de H₂O₂ 30% 200mM, a reação foi realizada conforme protocolo descrito na tabela seguinte:

AMOSTRA/REAGENTES	BRANCO	REAÇÃO
Água destilada	200 µL	200 µL
Tampão Tris/HCL EDTA pH 8,0	1790 µL	1690 µL
Amostra (Hemolisado 1/200)	5 µL	5 µL
*H ₂ O ₂ 30% 200mM	-	100 µL

O comprimento de onda utilizado foi de 240nm e a temperatura de 25°C. Acrescentamos o H₂O₂ 30% 200mM e disparamos o cronômetro, marcando o valor da D.O em um segundo e em 30 segundo.

Cálculo da concentração da amostra

A cálculo da medida da atividade da catalase foi realizada com a diferença do tempo inicial, antes da adição e após trinta segundo da adição de H₂O₂ 30% 200mM. O resultado foi expresso em segundos e corrigido por gramas de hemoglobina (s/mg Hb).

ANEXO N

Determinação do grupamento sulfidrila (SH)

Reagentes

1. Tampão Tris base 0,25M (Sigma-Aldrich[®], EUA) e EDTA 20mM (Synth[®]), Brasil-pH 8.2

Pesar 3,028g Tris base, 0,7445g EDTA e diluir em 100mL H₂O (qsp). Ajustar o pH para 8.2.

2. DTNB 10mM

Pesar 39,635mg DTNB (Sigma-Aldrich[®], EUA) e diluir em 10mL de metanol (Vetec[®], Brasil) (qsp).

Armazenar na geladeira ao abrigo da Luz. Pode ser utilizado até por 2 semana.

Procedimento

Reagentes	Branco	Amostra
Tampão Tris-EDTA (μL)	1000	1000
Plasma (μL)	-	50

Agitar e realizar leitura em espectrofotômetro em 412 nm (leitura A1)

Em seguida, adicionar

Reagentes	Branco com DTNB	Amostra
DTNB 10mM (μL)	20	20

Esperar 15 minutos a temperatura ambiente. Ler em 412 nm (leitura A2).

Realizar também uma leitura do branco só com DTNB 10mM.

Cálculo:

Concentração de SH total (mM) = (A2 - A1 - B com DTNB) x 1,57mM

Corrigir essa concentração pela quantidade de proteínas totais no plasma. O resultado é expresso em $\mu\text{M}/\text{mg Pt}$.

ANEXO O

Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1)

1. Preparo da Solução de Estoque de Tampão TRIS-HCl 1M

Pesar 39,41g e diluir em 250mL de H₂O deionizada.

Ajustar o pH para 8,0 e armazenar em geladeira. Corrigir o pH todos os dias antes do uso – para o uso, o pH poderá variar entre 8,0 e 8,5

2. Preparo da Solução de Estoque de CaCl₂ 1M

Pesar 7,35g e diluir em 50mL de H₂O.

Filtrar a solução em papel de filtro após o preparo e armazenar em geladeira.

3. Preparo do Tampão A – Preparar no dia do uso

Para 100mL de H₂O: 2mL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0
100µL Solução Estoque de CaCl₂

4. Preparo do Tampão B – Preparar no dia do uso

Para 50mL de H₂O: 450µL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0
45µL Solução Estoque de CaCl₂

Preparo das amostras:

Antes de diluir as amostras, os tubos/criotubos de armazenamento deverão ser centrifugados a 10000 RPM, por 5min e refrigerados a 10°C.

Procedimento

Diluir a amostra 1:80 – 5µL da amostra e 395µL do Tampão A

As amostras, após serem diluídas, deverão ser processadas em até 30min.

Preparo do Substrato de PA-*No Salt*:

Diluir 10mL do Tampão B + 5µL do Reagente PA (fenil-acetato)

Esta solução de substrato deve ser preparada em Tubo tipo *Falcon*, ao abrigo de luz, NO MOMENTO DO USO e não deverá ser utilizada após 2 horas de seu preparo.

Agitar vigorosamente por 30 segundos.

Reação:

Adicionar 20µL da amostra diluída 1:80 nos poços em que ocorrerá a reação.

Ao fim, adicionar 200µL da solução do Substrato de PA-*No Salt* e proceder a leitura.

Parâmetros de leitura – Utilizar modelo pré-definido no leitor de microplacas EnSpire, Perkin Elmer® (Waltham, MA, EUA).

Leitura cinética a 25°C – 16 leituras, em 270nm, com intervalo de 15 segundos entre as leituras; o tempo total da reação é de 4min.

Após as leituras cinéticas, serão realizadas mais duas leituras (em 900nm e 977nm) para a correção do *path length* (caminho ótico);

Análise dos resultados

Os resultados das 16 leituras em todas as reações deverão ser corrigidos da mesma forma. A primeira etapa é a correção por *baseline correction*, esta correção deverá ser feita para realizar a comparação da atividade da cinética enzimática;

As amostras cujas replicatas variarem mais de 10% ou que apresentarem um valor de r^2 inferior a 0,99 deverão ser reprocessadas.

Somente a primeira porção linear da curva deverá ser utilizada na análise final. A análise deverá ser feita em mDO, e o valor das médias das leituras deverá ser utilizado na fórmula de cálculo de atividade (expresso em U/mL).

Fórmula

$$A_{295} = \frac{mDO \times Vol. total da reação (mL) \times Fator de diluição}{\epsilon \times Volume da amostra (\mu L)}$$

Onde:

$\epsilon \rightarrow$ Coeficiente de extinção molar

Para o produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) = 1,31 mMol/Lcm⁻¹

Correção do caminho ótico (*Path length correction*)

Greiner bio-one. Application Note: UV/VIS Spectroscopy in Microplates UV-Star[®],

μ Clear[®], MICROLON[®] and

CELLSTAR[®] <http://www.greinerbioone.com/en/row/articles/literatures/application_notes/>

Correção pela geometria da placa – para placas com poços cilíndricos de fundo chato:

Utilizando as especificações do fabricante quanto ao diâmetro dos poços, fazer o seguinte cálculo:

$$h = \frac{4 \times V}{\pi \times d^2}$$

Onde:

h = fator de correção para a placa

V = volume final que será utilizado

d = média dos diâmetros especificados

ANEXO P
Burst Respiratório

Reagentes

1. Albumina 5%

Diluir 6,25mL de albumina em 25mL de água deionizada.

2. Glicose 10% (Nuclear[®], Brasil)

Diluir 2,5g de glicose em 25mL de água deionizada.

3. Tampão PBS

Pesar 8,0g Cloreto de sódio (NaCl) (Alphatec[®], Brasil), 0,2g de cloreto de potássio (KCl) (Synth[®], Brasil), 0,62g fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) (Nuclear[®], Brasil), 1,14g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) (Synth[®], Brasil), 20mL de glicose 10%, 20mL de albumina 5% e dissolver em 1L de água deionizada. Ajustar o pH em 7,3.

4. Preparo da solução de acetato de forbol miristato - solução estoque (5mM)
(PMA: Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar 1mg de PMA e diluir em 325µL de DMSO. Estocado à -70°C, em eppendorfs contendo 10µL.

5. Preparo da solução de PMA - solução uso (5µM)

Diluir 10µL da solução estoque PMA em 10mL de PBS, aliquotar este em eppendorfs e congelar à -70°C.

6. Preparo do Luminol - solução estoque (200mM) (Sigma-Aldrich[®], EUA),

Pesar 3,98mg de luminol e diluir em 10mL de água deionizada. Armazenar em geladeira ao abrigo da luz.

7. Preparo do Luminol - solução uso (20mM)

Diluir 50 μ L de luminol em 450 μ L de água deionizada. Armazenar ao abrigo da luz.

8. Preparo do Azul de Tripán (0,4%) (Matheson Coleman Bell[®], EUA)

Pesar 400 mg de azul de tripan para 100mL de PBS. Filtrar (em papel de filtro) e aliquotar em eppendorfs.

Procedimentos

Isolamento e separação dos Neutrófilos

Coletar 16mL sangue de um voluntário saudável utilizando tubos com vácuo (vacutainer[®]), contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). e iniciar o procedimento de separação de células imediatamente.

Em um tubo, tipo Falcon de 15mL, colocar 2,0mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich[®], EUA) com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, adicionar lentamente pela parede do tubo 2,0mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich[®], EUA) (deve formar duas camadas distintas). A temperatura ambiente deve ser controlada 20°C \pm 1. Os reagentes devem estar à temperatura ambiente.

Adicionar 6 a 7 mL de sangue total lentamente pelas paredes do tubo com uma pipeta Pasteur. Em uma centrífuga refrigerada (Excelsa 4 280-R, Fanem[®], São Paulo, Brasil) centrifugar os tubos Falcon (sem tampar) durante 30 minutos à 1000 rpm com temperatura de 20°C. Em seguida retirar a interface dos neutrófilos com uma Pipeta Pasteur e colocar em um tubo Falcon limpo. Adicionar o dobro do volume de PBS com glicose e albumina e misturar lentamente. Centrifugar por 10 minutos à 1000 rpm com temperatura de 20°C. Desprezar o sobrenadante. Adicionar

de 5 mL de PBS, misturar e centrifugar por 2 minuto à 1000 rpm, com temperatura de 20°C.

Desprezar o sobrenadante. Acrescentar 2 a 3mL água deionizada e agitar lentamente por inversão durante aproximadamente 30 segundos. Adicionar cerca de 4 mL de PBS e centrifugar por 2 minuto à 1000 rpm, com temperatura de 20°C.

Desprezar o sobrenadante. Re-suspender o pellet em 1mL de PBS.

Para analisar a viabilidade celular, em um tubo de ensaio, adicionar 240µL de tripan blue 0,5% e 10µL de neutrófilos. Preencher a câmara de Neubauer e focar em microscópio na objetiva de 40x. A viabilidade celular é avaliada em toda a câmara e é considerado viável a celular que estiver azul. A contagem celular é realizada no quadrante central, contando apenas as células viáveis. O cálculo da concentração de células é realizado da seguinte forma:

Nº de células contadas: **y**

$$y \frac{\text{_____}}{0,1\mu\text{L}}$$

$$x \frac{\text{_____}}{1000\mu\text{L}}$$

$$x = z \text{ cls/mL}$$

$$z \times 25 \text{ (diluição)} = w \text{ cls/mL}$$

Para a reação de quimiluminescência, ajusta-se a concentração das células para $2,5 \times 10^6 \text{ cls/mL}$

$$w \text{ cls/mL} \frac{\text{_____}}{1000\mu\text{L}}$$

$$2,5 \times 10^6 \text{ cls/mL} \frac{\text{_____}}{x}$$

x = volume necessário de células para uma concentração de $2,5 \times 10^6 \text{ cls/mL}$

$1000 - x$ = volume de PBS necessário para volume final de 1mL.

O meio de reação, em microplaca, é composto por:

Controle200µL de células ($2,5 \times 10^6$ cls/mL)

50µL de luminol 1mM

50µL de PMA 5µM

Amostra200µL de células ($2,5 \times 10^6$ cls/mL)

50µL de luminol 1mM

10µL de amostra

50µL de PMA 5µM

A leitura é realizada em um leitor de microplaca (Victor X3, Perkin Elmer[®], EUA), por quimiluminescência, em uma amplitude de resposta entre 300-620 nm, durante 60 min (uma leitura/min), sob uma temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados são expressos como unidades arbitrárias de quimiluminescência (cpm). Cada análise experimental é composta por pelo menos 14 repetições. Para a análise estatística, o valor máximo de cada curva foi utilizada, independentemente do tempo em que ocorreu.

ANEXO Q

Determinação da capacidade doadora de átomos de hidrogênio (DPPH*)

Reagentes

1. Ácido acético 30%

Diluir 14,3mL de ácido acético (Vetec[®], Brasil), em 50mL de água deionizada.

2. Tampão de acetato 0,1M (pH= 5,5)

Pesar 6,804g de acetato de sódio (Synth[®], Brasil) e diluir em 500mL de água deionizada. Acertar o pH para 5,5 com solução de ácido acético. Armazenar na geladeira.

3. Solução de DPPH 250µM

Primeiramente preparar uma solução de DPPH 500µM (Sigma-Aldrich[®], EUA) (solução estoque). Pesar 9,8mg DPPH e diluir em 50mL de etanol. Colocar no ultrasson ± 2 minutos. Armazenar em geladeira em frasco de vidro âmbar. No dia do uso preparar uma diluição de 1:1 (5mL de DPPH 500 µM + 5mL de etanol) para obter uma concentração 250µM.

4. Etanol absoluto (Synth[®], Brasil)

Procedimento

REAGENTES	BRANCO	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE DA AMOSTRA	AMOSTRA
Tampão acetato 0,1M	1 mL	1mL	1mL	1mL
Etanol absoluto	1,5mL	1mL	1,5mL	1mL
DPPH 250 µM	-	500µL	-	500µL
DMSO	-	10 - 150µl	-	-
Medicamentos (DMSO)	-	-	10 - 150µL	10 - 150 µL

Toda reação deve ser feita ao abrigo da luz e realizadas em triplicata. A reação é incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e a leitura é realizada em espectrofotômetro (Helios alfa, Thermo Spectronic®), em 517 nm. A D.O do controle positivo deve estar entre 0,5 - 0,6 nm.

Realizar o ensaio em triplicata.

Cálculo

Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade pela seguinte equação:

% de atividade = $[1 - (\text{amostra absorbância}/\text{absorbância de controle})] \times 100$.

ANEXO R

Determinação da atividade de remoção do radical ABTS⁺

Reagentes

1. Solução ABTS

Pesar 192mg de ABTS (Sigma-Aldrich[®], EUA), e 33,11mg de persulfato de potássio (J.T.Baker[®], EUA), e dissolver em 50mL de água deionizada. Colocar a solução em frasco âmbar e deixar por 16 horas em temperatura ambiente antes do uso. Após às 16 horas armazenar em geladeira. No momento do uso homogeneizar vigorosamente (para solubilizar o corpo de fundo) e utilizar em temperatura ambiente.

2. Tampão fosfato pH 7,4

Fosfato de Potássio Monobásico Anidro (KH₂PO₄) 20mM (Synth[®], Brasil),
Pesar 0,54436g e diluir em 200mL de água deionizada.

Hidróxido de Potássio (KOH) 20mM (Merck[®], Germany),
Pesar 0,1122g e diluir em 100mL de água deionizada.

Misturar 50mL de KH₂PO₄ 20mM + 39,1mL KOH 20mM e diluir em 200mL de água deionizada. Se o pH não atingir 7,4 adicionar aos poucos cada uma das soluções (KH₂PO₄ 20mM ou KOH 20mM) necessária até ajustar.

3. Solução ABTS⁺ - tampão fosfato

Diluir a solução preparada de ABTS com tampão fosfato (pH=7,4) até atingir uma absorbância de 0,7- 0,8 a 730 nm. (500µL de ABTS em 20mL de tampão fosfato)

Procedimento

REAGENTES	BRANCO	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE DA AMOSTRA	AMOSTRA
Tampão fosfato	4mL	-	4mL	-
Solução de ABTS ⁺	-	4mL	-	4mL
DMSO	-	5 - 150µl	-	-
Medicamentos	-	-	5 - 150µL	5 -150 µL

A reação é incubada por 6 minutos em temperatura ambiente e a leitura é realizada em espectrofotômetro (Helios alfa, Thermo Spectronic®) em 730 nm.

Realizar o ensaio em triplicata

Cálculo

Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade pela seguinte equação:

$$\% \text{ de atividade} = [1 - (\text{amostra absorvância}/\text{absorvância de controle})] \times 100.$$

ANEXO S

Determinação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

Reagentes

1. Tampão Acetato 0,3mM

Pesar 0,020g de acetato de sódio (Synth[®], Brasil) e diluir em 500mL de água deionizada. Preparar uma solução 80% de ácido acético triidratado (Vetec[®], Brasil) e adicionar aos poucos para ajustar o pH para 3,6.

2. TPTZ 10mM em HCl 40Mm

Pesar 0,0312g de TPTZ (Sigma-Aldrich[®], EUA) e adicionar 40 μ L de HCl (Merck[®], Germany) e completar o volume com água para 10mL. Fazer no dia de uso.

3. Cloreto de Ferro Hexahidratado 20Mm

Pesar 0,054g cloreto de ferro hexahidratado (Synth[®], Brasil) e diluir em 10mL água deionizada. Fazer no dia de uso.

4. Reagente de FRAP

Misturar 2,5mL da solução de TPTZ (10mM) e HCl (40mM) + 2,5mL da solução cloreto de ferro e 25mL de tampão acetato. Incubar a solução à 37°C por 30 minutos. Obs: Fazer no dia

Preparo do padrão:

Pesar 0,0125g de trolox (Sigma-Aldrich[®], EUA) e diluir em 25mL de etanol (Synth[®], Brasil). Diluir esta solução (2mM) em etanol para as seguintes concentrações: 0,4; 0,8; 1,0; 1,25; 2,0mM Trolox. Quando adicionada no tubo de reação as concentrações finais serão: 4; 8; 10; 12,5 e 20 μ M e estas concentrações devem ser utilizadas quando os dados para cálculo da curva padrão forem inseridos.

Procedimento

REAGENTES	BRANCO	PADRÃO	CONTROLE POSITIVO	AMOSTRA
Trolox	-	10 μ L	-	-
FRAP	900 μ L	1mL	900 μ L	900 μ L
Água deionizada	100 μ L	-	90 μ L	90 μ L
Amostra	-	-	-	10 - 180 μ L

A reação é incubada à 37°C por 30 minutos. A leitura é realizada em espectrofotômetro (Helios alfa, Thermo Spectronic®) em 595 nm.

Realizar o ensaio em triplicata

Cálculo do poder redutor:

O resultado sairá diretamente da curva com diferentes concentrações de equivalente de Trolox (4.0-20.0 μ M) (TEAC- capacidade antioxidante equivalente ao Trolox). Utilizar a equação da reta obtida quando realizada a curva padrão do ensaio. O resultado é expresso em μ mol/L equivalente de trolox/mg/mL da amostra.