



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA DOENÇA DE
PARKINSON:
ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO,
INFLAMATÓRIOS E DO METABOLISMO DO FERRO**

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA DOENÇA DE
PARKINSON:**
ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO,
INFLAMATÓRIOS E DO METABOLISMO DO FERRO

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

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Farias, Carine Coneglian de.

Alterações metabólicas na doença de Parkinson: análise de biomarcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e do metabolismo do ferro / Carine Coneglian de Farias. - Londrina, 2018.
78 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson - Tese. 2. Estresse oxidativo - Tese. 3. Inflamação - Tese. 4. Metabolismo do ferro - Tese. I. Barbosa, Décio Sabbatini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CARINE CONEGLIAN DE FARIAS

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA DOENÇA DE PARKINSON:
ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO,
INFLAMATÓRIOS E DO METABOLISMO DO FERRO**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Vanessa Suziane Probst
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Francis Fregonesi Brinholi
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Profa. Dra. Suhaila Mahmoud Smaili Santos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de Abril de 2018.

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.

Aos professores Célio, Francis, Suhaila e Vanessa da comissão examinadora pelas valiosas contribuições para a conclusão desse trabalho.

Aos professores Wanderlei Onofre Schmitz e Estefânia Gastaldello Moreira pelas colaborações, 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 Paula Michelin, Andressa Keiko, Alissana Camargo, Chiara Bortolasci, Denise Santiago, Francis Fregonesi, Geise Broto, Kamila Landucci, Karine Boll, Laura Semeão, Luciana Higachi, Marlene Bardi, Renata Martinez, aos amigos André de Souza Nogueira, Matheus Amarante, Vitor Obara, Walter Aquiles, 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 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.

“Grandes descobertas e progressos invariavelmente envolvem a cooperação de
várias mentes”

Alexander Graham Bell

Farias, Carine Coneglian de. **Alterações metabólicas na doença de Parkinson: análise de biomarcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e do metabolismo do ferro.** 2018. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem caracterizada pela perda progressiva e crônica dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. Estresse oxidativo, inflamação e alterações no metabolismo do ferro possuem um papel importante na fisiopatologia da DP. Alterações metabólicas decorrentes desta doença podem ser encontradas não só no cérebro dos pacientes como também sistemicamente. Os principais objetivos deste trabalho foram: a) Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo hidroperóxidos lipídios (LOOH), malondialdeído (MDA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), grupamento sulfidril (SH), atividade da catalase (CAT), atividade da superóxido dismutase (SOD), paraoxonase 1 (PON 1), capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) e inflamatórios, proteína C reativa (PCR) na DP e associar com a progressão da doença; b) avaliar biomarcadores do metabolismo do ferro, incluindo ferro (Fe), ferritina, capacidade total de ligação de ferro (TIBC), transferrina (Tf) e receptor solúvel de transferrina (RsTf), buscando associações com biomarcadores de estresse oxidativo, MDA e PON 1 e inflamatórios, haptoglobina (Hp), homocisteína (Hci), interleucina 6 (IL-6), receptor solúvel de interleucina 6 (RsIL-6) na DP. Participaram do estudo 56 pacientes com DP nos estágios 1-3 da Escala Hoehn e Yahr e 56 controles. A DP é caracterizada pelo aumento de LOOH, MDA e atividade da SOD e diminuição da atividade da CAT. Uma combinação de cinco biomarcadores de estresse oxidativo prevê significativamente DP, com uma sensibilidade de 94,5% e uma especificidade de 86,8% (ou seja, MDA, atividade da SOD, TRAP, SH e atividade da CAT). O biomarcador mais associado à DP é o MDA, enquanto LOOH e atividade da SOD estão significativamente associadas ao estágio tardio da DP, mas não ao estágio inicial da DP. Os medicamentos antiparkinsonianos não afetaram os biomarcadores de estresse oxidativo, mas levodopa + carbidopa aumentou significativamente a PCR. A DP foi associada a mudanças significativas nos níveis de Tf (diminuição), RsTf, ferritina, Hp, interleucina 6 e MDA (todos aumentados), enquanto houve tendência para uma associação negativa com PON 1. A regressão logística mostrou que os biomarcadores mais significativos da DP foram MDA, RsTf, Hp e ferritina. Além disso, os níveis de Fe foram associados negativamente com Hp e positivamente com PON 1, TIBC e Tf, enquanto a ferritina e o RsTf foram positivamente associados aos níveis de MDA. Novos tratamentos para DP podem ser direcionados para atingir as vias de estresse oxidativo, inflamação e metabolismo do ferro.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Estresse oxidativo. Inflamação. Metabolismo do ferro. Biomarcadores periféricos.

Farias, Carine Coneglian de. **Metabolic changes in Parkinson's disease**: analysis of oxidative stress, inflammatory and iron metabolism biomarkers. 2018. 78 p. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive and chronic loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta. Oxidative stress, inflammation and changes in iron metabolism play an important role in the physiopathology of PD. Metabolic changes resulting from PD can be found not only in patients' brains but also systemically. The main objectives of this work were: a) To evaluate oxidative stress biomarkers, including lipid hydroperoxides (LOOH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl group (SH), catalase activity (CAT), superoxide dismutase activity (SOD), paraoxonase 1 activity (PON 1), total plasma antioxidant capacity (TRAP) and inflammatory, C-reactive protein (CRP) in PD and associate them with disease progression; b) To evaluate biomarkers of iron metabolism, including iron (Fe), ferritin, total iron binding capacity (TIBC), transferrin (Tf) and soluble transferrin receptor (sTfR), looking for associations with oxidative stress biomarkers, MDA, PON 1, and inflammatory haptoglobin (Hp), homocysteine (Hcy), interleukin 6 (IL-6), soluble interleukin 6 receptor (sIL-6R) in PD. We recruited 56 healthy individuals and 56 PD patients in stages 1-3 of Hoehn and Yahr Scale. PD is characterized by increased LOOH, MDA and SOD activity and lowered CAT activity. A combination of five oxidative stress biomarkers highly significantly predicts PD with a sensitivity of 94.5% and a specificity of 86.8% (i.e., MDA, SOD activity, TRAP, SH-groups and CAT activity). The biomarker most associated with PD is MDA, while LOOH and SOD activity are significantly associated with late PD stage, but not early PD stage. Antiparkinson drugs did not affect oxidative stress biomarkers, but levodopa + carbidopa significantly increased CRP. PD was associated with significant changes in Tf (lowered), sTfR, ferritin, Hp, interleukin 6 and MDA (all increased) levels, while there was a trend towards a negative association with PON 1. Logistic regression showed that the most significant biomarkers of PD were MDA, sTfR, Hp and ferritin. Moreover, Fe levels were negatively associated with Hp and positively with PON 1, total iron binding capacity and Tf, while ferritin and sTfR were positively associated with MDA levels. New drug treatments for PD should target inflammatory and oxidative stress pathways and iron metabolism as well.

Keywords: Parkinson's disease. Oxidative stress, inflammation; iron metabolism; peripheral biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
DP	Doença de Parkinson
EO	Estresse oxidativo
Fe	Ferro
Hp	Haptoglobina
Hci	Homocisteína
IL-6	Interleucina 6
RslL-6	Receptor solúvel de interleucina 6
LOOH-FOX	Hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria
LOOH-QL	Hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MDA	Malondialdeído
NOx	Subprodutos do óxido nítrico
PCR	Proteína C-reativa
PON-1	Paraoxonase 1
SH	Grupamentos sulfidrila
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra pars compacta
SOD	Superóxido dismutase
Tf	Transferrina
RTf	Receptor de transferrina
TRAP	Capacidade antioxidante total do plasma
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	10
1.2	ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA DP	11
1.2.1	EO na DP	12
1.2.2	Inflamação na DP	13
1.2.3	Metabolismo do Fe na DP	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	ARTIGO 1: HIGHLY SPECIFIC CHANGES IN ANTIOXIDANT LEVELS AND LIPID PEROXIDATION IN PARKINSON'S DISEASE AND ITS PROGRESSION: DISEASE AND STAGING BIOMARKERS AND NEW DRUG TARGETS	16
2.1.1	Objetivo Geral.....	16
2.1.2	Objetivos Específicos	16
2.2	ARTIGO 2: PARKINSON'S DISEASE IS ACCOMPANIED BY INTERTWINED ALTERATIONS IN IRON METABOLISM AND ACTIVATED IMMUNE- INFLAMMATORY AND OXIDATIVE STRESS PATHWAYS	16
2.2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2.2	Objetivos Específicos	17
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	18
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	18
3.3	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	18
3.4	AVALIAÇÕES LABORATORIAIS	19
3.4.1	Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo	19
3.4.1.1	Determinação do TRAP.....	19
3.4.1.2	Determinação de LOOH-FOX.....	19
3.4.1.3	Determinação de LOOH-QL	20
3.4.1.4	Determinação de MDA	20
3.4.1.5	Determinação de NOx	20
3.4.1.6	Determinação da SOD	21
3.4.1.7	Determinação da CAT	21

3.4.1.8	Determinação do SH	21
3.4.1.9	Determinação da PON-1	21
3.4.2	Determinações bioquímicas e imunológicas.....	22
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3.5.1	Artigo 1	22
3.5.2	Artigo 2	23
4	RESULTADOS	24
4.1	ARTIGO 1	24
4.2	ARTIGO 2	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
	ANEXOS	46
	ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP/UEL 222/2011.....	47
	ANEXO B - Parecer consubstanciado do CEP/UEL 038/2014.....	48
	ANEXO C - Diagnóstico da DP segundo o banco de cérebros da sociedade de Parkinson do Reino Unido.....	49
	ANEXO D - Escala de classificação do estágio da DP.....	50
	APÊNDICES	51
	APÊNDICE A -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	52
	APÊNDICE B -Questionário para coleta de dados sócio-demográficos, clínicos e terapêuticos dos indivíduos inseridos no estudo	54
	APÊNDICE C -Determinação da Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)	57
	APÊNDICE D -Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (LOOH-FOX).....	60
	APÊNDICE E -Determinação hidroperóxidos por quimiluminescência (LOOH-QL).....	62
	APÊNDICE F -Determinação de malondialdeído (MDA)	64
	APÊNDICE G -Determinação de subprodutos do óxido nítrico (NOx).....	67

APENDICE H -Determinação da superóxido dismutase (SOD)	71
APENDICE I -Determinação da Catalase (CAT)	73
APENDICE J -Determinação do grupamento sulfidril (SH)	75
APENDICE K -Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1).....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP), descrita a primeira vez por James Parkinson como uma “paralisia agitante” em 1817 é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns e também é conhecida como um distúrbio do movimento. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente em todo o mundo depois da Doença de Alzheimer (ROCHA; MIRANDA; TEIXEIRA, 2015; CACABELOS, 2017). Ela pode acometer tanto o adulto com idade em torno de 40 a 50 anos, como também, com maior frequência, os idosos, com idade de 60 anos ou mais. A prevalência é de 1% na população com idade superior a 60 anos e 3% aos 80 anos de idade, ou seja, sua incidência e prevalência aumentam com o passar do tempo. Atinge todos os grupos étnicos, classes socioeconômicas e apresenta-se em ambos os gêneros (DI NAPOLI et al., 2007; DEXTER, JENNER, 2013).

No Brasil, o número de pessoas idosas tem crescido. No ano de 2005, os idosos representavam 9,8% no total da população e passaram, em 2015, a representar 14,3%. A expectativa de vida em 2015 foi de 75,5 anos. Para o ano de 2030, por exemplo, está estimada em 78,6 anos e para 2060, em 81,2 anos, e representará cerca de 33,7%. Diante destes dados espera-se, então, que doenças predominantemente nessa faixa etária apresentem maior prevalência (como a DP, por exemplo), podendo comprometer a qualidade de vida, pois apresentam morbidades, necessitam de cuidados domésticos e alterações em seus lares para sua maior conveniência e segurança. Também pode comprometer os serviços de saúde, através do impacto financeiro, pois necessitam de medicamentos para o resto da vida provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS), têm maior probabilidade de hospitalizações decorrentes da doença ou outros fatores correlacionados (IBGE, 2016; BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016).

A DP é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) no mesencéfalo resultando na redução de dopamina e disfunção da via nigroestriatal. A característica neuropatológica da DP são inclusões citoplasmáticas conhecidas como corpos de Lewy nos neurônios (marca histopatológica da DP). 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 (ROCHA, 2015; POETINI et al., 2018).

Segundo Teive (2003), na DP deve haver acima de 60% da perda neuronal da SNpc para que apareçam os primeiros sinais motores, que incluem bradicinesia, tremor de repouso, rigidez com roda denteada e anormalidades posturais, considerados as principais

manifestações clínicas e que são utilizados para o diagnóstico clínico da doença. Entretanto as alterações não são restritas à SNpc e podem estar presentes em outros locais como nas regiões do tronco encefálico como por exemplo, núcleos da rafe e locus ceruleus, bulbo olfatório, ou do sistema nervoso autonômico periférico, todos descritos como alvos precoces do processo degenerativo na DP. A presença de processo degenerativo além do sistema nigroestriatal pode explicar uma série de sinais e sintomas não motores como, alterações do olfato, distúrbios do sono, hipotensão postural, constipação, ansiedade, depressão, transtorno cognitivo leve até demência, entre outros, que podem estar presentes na fase descrita como pré-motora da DP, como também após o aparecimento dos sinais motores (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; CACABELOS, 2017).

Atualmente, a DP possui apenas tratamento para os sintomas e nada ainda pode ser feito para deter o processo de neurodegeneração da doença. Segundo o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da DP (2017), existem atualmente várias estratégias de intervenção medicamentosa para o controle dos sintomas motores: levodopa *standard* ou com formulações de liberação controlada, em associação com inibidor da levodopa descarboxilase, agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamino-oxidase B, inibidores da catecol-O-metiltransferase, anticolinérgicos e antiglutamatérgicos (BRASIL, 2017). Segundo Blandini et al. (2001) e Hu et al. (2013) a Levodopa, utilizada para tratamento da DP, em especial a longo prazo, pode paradoxalmente contribuir para danos neuronais através do seu catabolismo gerando radicais livres e levando à hiperhomocisteinemia que implica em maior risco para doença cardiovasculares e demência. Logo, as estratégias terapêuticas devem levar em consideração fatores como o estadiamento da doença, a sintomatologia presente, ocorrência de efeitos colaterais, idade do paciente e medicamentos em uso (YUAN et al., 2010).

Além o tratamento medicamentoso, a fisioterapia é importante no tratamento da DP e deve ser aplicada desde os primeiros momentos do diagnóstico da doença, pois proporciona exercícios que atuam diretamente nos sinais e sintomas da DP melhorando a qualidade de vida do indivíduo (ALMEIDA et al., 2015; SANTOS, et al., 2017). Na DP também existe a possibilidade de realização de cirurgia para implante de estimulador cerebral profundo para melhor controle da doença, mas não é considerado um procedimento curativo (ANDRADE, 2010).

1.2 ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA DP

A DP idiopática é responsável por cerca de 90 a 95% dos casos da doença. Já a DP familiar (casos herdados) são 5 a 10% dos casos. A etiologia da DP idiopática possui vários fatores de susceptibilidade associados ao desencadeamento da neurodegeneração, por

exemplo, fatores ambientais (pesticidas e metais) e genéticos (mutações nos genes para alfa-sinucleína, parkin, superóxido dismutase, etc.) e ainda é uma questão em aberto na comunidade científica (JOMOVA et al., 2010; ANDERSON; MAES, 2014).

Entretanto, sabe-se que qualquer que seja a sua etiologia, a DP apresenta no sistema nervoso central (SNC) e em nível sanguíneo (periférico) alterações metabólicas associadas ao estresse oxidativo (EO), ativação imunoinflamatória e desregulação do metabolismo de ferro (Fe), que podem contribuir como evento primário na DP ou que podem ser secundários à neurodegeneração e levar, conseqüentemente, para exacerbação da morte celular (ANDERSON; MAES, 2014; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; POETINI et al., 2018).

1.2.1 EO na DP

O EO é um desequilíbrio entre a produção de substâncias pro-oxidantes (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) e antioxidantes proporcionando a geração de espécies químicas radicalares potencialmente prejudiciais para as células que geram danos a componentes celulares como lipídeos, proteínas e DNA levando a disfunções fisiológicas e morte celular. As espécies reativas de oxigênio incluem o ânion radical superóxido, radical hidroxila, radical alquila, alcóxila e peróxila. As espécies reativas de nitrogênio incluem o óxido nítrico. O peroxinitrito e o peróxido de hidrogênio não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares no organismo. Dentre os antioxidantes enzimáticos pode-se citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase e entre os não enzimáticos a glutationa, o ácido ascórbico, α -tocoferol e ácido úrico. As reações de oxidação e redução são catalisadas por metais de transição como o Fe, cobre, e manganês. Destes, o mais importante é o Fe, pois ele pode participar da reação de Fenton, gerando o radical hidroxila que é altamente reativo. Produtos do dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA e alterações na defesa antioxidante podem ser encontrados tanto em nível tecidual, no sangue, líquido, urina e podem ser biomarcadores do EO (UTTARA et al., 2009; JOMOVA, 2010).

É evidente que o EO indica implicações cruciais na DP. Para Migliore et al. (2002), Agil et al. (2006) e Choi et al. (2006), foi 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; COPPEDÉ, 2009). Dentre os biomarcadores para EO, pode-se citar 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (dano oxidativo ao DNA), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos avançados de oxidação proteica, subprodutos do óxido nítrico (NOx) e alterações das enzimas antioxidantes SOD,

CAT e glutathiona peroxidase (ABRAHAM et al., 2005; SHARMA et al., 2008; NIKAM et al., 2009; NIKOLOVA;MANCHEVA, 2013; HENCHCLIFFE, 2015).

O papel do EO está relacionado à DP, principalmente, pela vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos da SNpc ao dano oxidativo. Isto é devido à alta taxa metabólica (consumo de oxigênio) do cérebro, substratos oxidáveis como a dopamina, neuromelanina (rica em Fe), baixos níveis de antioxidantes, altas concentrações de Fe (SINGH et al., 2014).

1.2.2 Inflamação na DP

O processo neuroinflamatório e resposta imune inata e adaptativa estão presentes na DP. A resposta inflamatória inicial oferece uma proteção contra dano neuronal, no entanto, à medida que a resposta é intensificada ela é prejudicial e causa morte celular. A imunidade inata no SNC é principalmente mediada por células imunes residentes no SNC, células da glia como a micróglia, astrócitos e oligodendrócitos e envolvem mecanismos de defesa frente a qualquer insulto como, remoção de substâncias estranhas por fagocitose, recrutamento de células imunes para o local da infecção, produção de citocinas (proteínas que atuam como moléculas sinalizadoras durante a inflamação e várias atividades celulares, como crescimento e reparo), ativação da cascata do sistema complemento e apresentação de antígenos para ativação da imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa envolve a infiltração de linfócitos no cérebro e ativação das células da micróglia, astrócitos e produção de citocinas (CHAO; WONG; TAN, 2014; JOSHI; SINGH, 2018; KAUR, et al., 2017).

A micróglia é a primeira linha de resposta imunológica do SNC diante de um insulto e/ou condições patológicas. Na DP o processo inflamatório no SNC (ativação/ proliferação de micróglia, secreção de citocinas pró-inflamatórias e presença de radicais livres) pode ocorrer como um evento primário que leva ao processo neurodegenerativo, assim como pode ser um evento secundário a esse processo e, por sua vez, exacerbaria a progressão da morte celular. A micróglia ativada exerce seus efeitos neurotóxicos liberando citocinas pró-inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 β , interleucina 6 (IL-6), interferon gamma e radicais livres incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como mediadores inflamatórios como prostaglandinas E2, levando ao dano das células nigrais e à morte. Isso suporta o papel da micróglia na indução de efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes. Outras células como astrócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos também contribuem para a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos a efeitos inflamatórios e degenerativos. (TRAGER; TABRIZI, 2013; SU; FEDEROFF, 2014; WANG, et al., 2015).

Estudos têm demonstrado a ligação entre inflamação periférica e neurodegeneração na DP por intermédio de alterações no perfil inflamatório sanguíneo que estão relacionadas

alguns marcadores inflamatórios incluindo IL-1 β , interleucina 2, IL-6, interleucina 8, fator de necrose tumoral alfa e produção de proteínas de fase-aguda, como a proteína C reativa (PCR) e haptoglobina (Hp) (MOSLEY et al., 2006; ANDICAN et al., 2012; AHMED et al., 2012; IKEDA et al., 2013; DOHERTY, 2013). A IL-6 é uma citocina pró e anti-inflamatória e durante o processo inflamatório ela regula a produção hepática de proteínas relacionadas a resposta inflamatória, pelo aumento de proteínas de fase-aguda positiva como a PCR, Hp, ferritina e pela diminuição de proteínas de fase-aguda negativa como a transferrina (Tf) (BROCK, et al., 2011). Uma característica fundamental na regulação da resposta da IL-6 tem sido a identificação de um receptor solúvel de IL-6 (RsIL-6), que forma um complexo ligante-receptor com IL-6 e é capaz de estimular uma variedade de respostas celulares no processo inflamatório. Conseqüentemente, ao considerar o papel da IL-6 em uma doença, é igualmente importante considerar RsIL-6 (JONES et al., 2001).

1.2.3 Metabolismo do Fe na DP

O aumento de Fe no cérebro da DP tem sido relacionado à degeneração dos neurônios da SNpc. O Fe é um importante metal envolvido em muitos processos biológicos. No cérebro, inclui transporte de oxigênio, síntese de DNA, respiração mitocondrial, síntese de mielina e síntese e metabolismo de neurotransmissores. O próprio processo de envelhecimento leva a um acúmulo seletivo de Fe que ocorre em várias regiões cerebrais como na substância negra, putâmen, globo pálido, núcleo caudado e córtex, no entanto o acúmulo é maior em pacientes com DP. Esse acúmulo de Fe no cérebro de pacientes DP pode ser observado em exame histológico e de imagem (FRIEDLICH et al., 2009; YU, et al., 2018). Um dos principais locais de depósito é a SNpc, com Fe principalmente ligado à ferritina (proteína que armazena o ferro) e neuromelanina. Uma desregulação da homeostase do Fe implicaria nos mecanismos de EO, por induzir a formação de radicais livres pela reação de Fenton e causar neurotoxicidade (WARD et al., 2014; APOSTOLAKIS; KYPRAIOU, 2017; SHIN et al., 2018).

A desregulação da homeostase do Fe 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. Além disso, também há alteração da Tf, receptor de transferrina (RTf) responsável pelo transporte do ferro, aumento da permeabilidade ou disfunção da barreira hematoencefálica, acúmulo de Fe glial, induzindo um estado inflamatório por meio de uma liberação aumentada de citocinas e resultando em um ciclo de neuroinflamação e neurodegeneração (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012; FARHOUDI et al., 2012, WARD et al., 2014; COSTA-MALLEN et al., 2015).

Ikeda et al. (2013), Pichler et al. (2013), Hu et al. (2015), demonstraram que o Fe e uma desregulação no seu metabolismo também podem ser encontradas no sangue dos pacientes com DP. Para Medeiros et al. (2015) o Fe, considerado um fator de risco para a DP pelo seu nível aumentado no cérebro dos pacientes, apresenta-se no sangue periférico na DP em concentrações diminuídas. Sugerindo que esta acumulação não é dependente de uma sobrecarga de Fe, mas provavelmente devido à desregulação da homeostase do Fe.

Os estudos de biomarcadores sanguíneos pró-oxidantes e antioxidantes, inflamatórios e do metabolismo do Fe poderiam ser usados para uma melhor compreensão da patogênese e da sua heterogeneidade clínica. As alterações observadas sistemicamente poderiam ser úteis como indicadores de progressão da DP nestes pacientes. Em função disso, numa tentativa de se entender melhor a inter-relação entre o processo inflamatório, EO e metabolismo do Fe é que propomos este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 ARTIGO 1: HIGHLY SPECIFIC CHANGES IN ANTIOXIDANT LEVELS AND LIPID PEROXIDATION IN PARKINSON'S DISEASE AND ITS PROGRESSION: DISEASE AND STAGING BIOMARKERS AND NEW DRUG TARGETS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar pacientes com DP nos estágios 1 a 3, segundo a escala de Hoehn e Yahr em seus diferentes esquemas terapêuticos quantificando, os biomarcadores de EO e inflamatórios buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença.

2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os dados sócio-demográficos idade, gênero, etnia, índice de massa corporal, tabagismo (ex-fumante), estado civil, atividade física, uso de bebida alcoólica e dados clínicos como, estadiamento da doença (escala de Hoehn e Yarhr) e duração da doença.
- Dosear os níveis dos biomarcadores pró-oxidantes sanguíneos através dos testes de LOOH por *espectrofotometria* (LOOH-FOX) além de LOOH por quimiluminescência (LOOH-QL), malondialdeído (MDA), NOx, e o biomarcador inflamatório PCR.
- Analisar os biomarcadores antioxidantes sanguíneos através dos testes de capacidade antioxidante total do plasma (TRAP), grupamentos sulfidril (SH), atividade das enzimas SOD, CAT e atividade total da paraoxonase1 (PON-1).
- Analisar a associação dos biomarcadores sanguíneos de EO e inflamatório com os estágios da doença.

2.2 ARTIGO 2: PARKINSON'S DISEASE IS ACCOMPANIED BY INTERTWINED ALTERATIONS IN IRON METABOLISM AND ACTIVATED IMMUNE-INFLAMMATORY AND OXIDATIVE STRESS PATHWAYS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar pacientes com DP nos estágios 1 a 3, segundo a escala de Hoehn e Yarhr, em seus diferentes esquemas terapêuticos, os biomarcadores do metabolismo do Fe buscando associações com biomarcadores de EO e inflamatórios em pacientes com DP.

2.2.2 Objetivo Específicos

- Avaliar biomarcadores do metabolismo do Fe, incluindo Fe, ferritina, capacidade total de ligação de ferro (TIBC), Tf e receptor solúvel de transferrina (RsTf)
- Analisar os biomarcadores de estresse oxidativo MDA e PON-1 e inflamatórios Hp, homocisteína (Hci), IL-6, receptor solúvel de interleucina 6 (RsIL-6) na DP.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O delineamento refere-se a um estudo caso-controle.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, sob parecer Nº 222/2011, CAAE: 0175.0.268.000-11 (Anexo A) e parecer Nº 038/2014, CAAE:26325814.6.0000.5231 (Anexo B). 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 (Apêndice A).

3.3 POPULAÇÃO ESTUDADA

Os pacientes com DP incluídos no estudo foram provenientes do ambulatório de neurologia do Hospital de Clínicas 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 C) e selecionados os que estavam entre as fases 1 a 3 da escala de *Hoehn and Yahr* (avalia a incapacidade motora dos indivíduos com DP) (anexo D). Pacientes que apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimune, renais, cardíacas, hepáticas, outras doenças neurológicas ou utilizassem suplementos antioxidantes também foram excluídos do estudo.

Os pacientes com DP estavam sob 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 no protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença de Parkinson, 2017.

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 na forma mais homogênea possível, parâmetros como idade, gênero e etnia foram controlados e pareados.

Para a realização deste estudo, os dados sócio demográficos, clínicos e terapêuticos foram obtidos por meio de um formulário (Apêndice B) e pela consulta aos prontuários do AHC e para as avaliações laboratoriais foi coletado 28mL de sangue por punção venosa de todos os voluntários após jejum de 10h: 8 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo EDTA para determinação das atividades enzimáticas da SOD e CAT; 20mL de sangue tubos com vácuo (vacutainer®) sem anticoagulante para a realização de TRAP, SH, MDA, NOx, LOOH-FOX, LOOH-QL, PON 1, PCR, Fe, ferritina, Tf, RsTf, TIBC, Hp, Hci, IL-6, RsIL-6. 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.

3.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

3.4.1 Avaliação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo

3.4.1.1 Determinação do TRAP

Este teste avalia os antioxidantes hidro e lipossolúveis do sangue. A avaliação foi feita por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996) (Apêndice C). A metodologia é baseada na geração de radicais peroxila (RO_2^{\cdot}), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azoiniciador ABAP (dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)). 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.

3.4.1.2 Determinação de LOOH-FOX

Os LOOH foram determinados através da oxidação ferrosa do alaranjado de xilenol utilizando a técnica descrita Jiang *et al.* (1991) (Apêndice D). 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.

3.4.1.3 Determinação de LOOH-QL

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

3.4.1.4 Determinação do MDA

A quantificação de MDA foi realizada conforme a técnica descrita por Bastos et al. (2012) (Apêndice F), que consiste na medida dos níveis de MDA através da complexação com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizando para estimação 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.

3.4.1.5 Determinação de NOx

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez et al. (1998) (Apêndice G). 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 μ M.

3.4.1.6 Determinação da SOD

A atividade da enzima antioxidante SOD nas hemácias foi determinada usando o método do pirogalol descrita por Marklund e Marklund (1974) (Apêndice H). 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.

3.4.1.7 Determinação da CAT

A atividade da enzima antioxidante CAT foi através da medida do decaimento na concentração de H₂O₂ e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1984) (Apêndice I). 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.

3.4.1.8 Determinação de SH

O grupamento SH, que possui ação antioxidante, foi avaliado no plasma por espectrofotometria descrito previamente por Hu (1994) (Apêndice J). O método de análise é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico 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 μ M/mg proteína.

3.4.1.9 Determinação da PON-1

A atividade total da PON-1, que possui ação antioxidante, foi determinada pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink Furlong (2008) (Apêndice K). 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^o. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a 1,31mMol/Lcm⁻¹.

3.4.2 Determinações bioquímicas e imunológicas

As seguintes análises foram realizadas através de metodologias automatizadas. Fe e TIBC foram mensurados no aparelho Dimension®, RxL (Deerfield, IL, EUA) e PCR, Hp, Hci, ferritina and Tf no aparelho Architect i2000SR (Abbott, IL, EUA).

As análises de IL-6 and sIL-6R foram quantificadas pela metodologia de ELISA (Boster Immunoleader, Pleasonton, CA, USA) assim como sTfR (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Czech Republic). A leitura da reação foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 Artigo 1

Foi realizada análise de variância (ANOVAs) ou (ANCOVAs) para avaliar diferenças nos dados sócio-demográficos, clínicos e biomarcadores entre grupos DP e controle. O teste de Tukey foi utilizado para examinar múltiplas comparações entre os três grupos de estudo (controles e 2 subgrupos de DP). A análise de tabela de contingência (teste- χ^2) para avaliar as associações entre dados sócio-demográficos e clínicos e grupos de diagnóstico. As relações entre as variáveis foram avaliadas usando os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman. Foi utilizada a análise de modelo linear geral (MLG) univariados para examinar o efeito dos grupos de diagnóstico nos biomarcadores, ajustando as variáveis como gênero, idade e IMC. A análise MLG multivariada foi utilizada para examinar os efeitos das drogas nos biomarcadores. Os testes de homogeneidade de variância foram realizados sempre que apropriado (teste Levene). A análise do modelo linear generalizado (MLGe) foi utilizada para examinar os efeitos dos biomarcadores e dos dados sóciodemográficos sobre o índice de gravidade. As análises de regressão logística bivariada foram usadas para delinear os biomarcadores significativos com *odds ratio* e intervalos de confiança de 95% do grupo DP *versus* controle. O teste Hosmer-Lemeshow foi utilizado para testar se o modelo ajustou os dados. Todos os testes foram bi-caudal e um valor de p menor que 0,05 foi usado para significância estatística. As análises foram realizadas usando o software IMB-SPSS versão 22 para Windows.

3.5.2 Artigo 2-

Foi utilizada análise de variância (ANOVAs) para verificar diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos DP e controle. A análise de tabela de contingência (teste- χ^2) para avaliar as associações entre os grupos de diagnóstico e dados sócio-demográficos/clínicos. A análise MLG multivariada foi empregada para examinar os efeitos multivariados do diagnóstico em diferentes conjuntos de biomarcadores (metabolismo de Fe ou imune-inflamatórios e estresse oxidativo) ajustando as variáveis idade, sexo, IMC, uso de fármacos, uso do tabaco. Posteriormente foram utilizados testes para efeitos entre os sujeitos para avaliar os efeitos das variáveis preditoras na variáveis dependentes. A análise MLG multivariada também foi usada para examinar os efeitos multivariados e univariados de biomarcadores imune-inflamatórios e de estresse oxidativo (variáveis explicativas) no metabolismo do Fe (variáveis dependentes). Análise de regressão logística binária automática foi usada para determinar os biomarcadores significativos que estão associados com DP. A transformação Ln foi utilizada para normalizar a distribuição de dados de variáveis biológicas. A análise de poder mostrou que usando a ANCOVA com 2 grupos e 2-4 covariáveis em um tamanho de efeito de 0,28 e poder de 0,8 (bi-caudal, alfa=0.05) o tamanho da amostra deve ser cerca de 103. Todos os testes foram bi-caudal e um valor de p menor que 0,05 foi usado para significância estatística. As análises foram realizadas usando o software IBM-SPSS versão 22 para Windows.

4 RESULTADOS

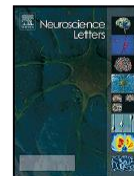
4.1 ARTIGO 1

Neuroscience Letters 617 (2016) 66–71



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research paper

Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets



Carine Coneglian de Farias^a, Michael Maes^{a,b}, Kamila Landucci Bonifácio^a, Chiara Cristina Bortolasci^a, André de Souza Nogueira^a, Francis Fregonesi Brinholi^a, Andressa Keiko Matsumoto^a, Matheus Amarante do Nascimento^c, Lúcio Baena de Melo^d, Suzana Lucy Nixdorf^e, Edson Lopes Lavado^f, Estefânia Gastaldello Moreira^a, Décio Sabbatini Barbosa^{a,*}

^a Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina (UEL), Paraná, Brazil^b School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia^c Department of Physical Education, UEL, Paraná, Brazil^d Clinical Hospital, UEL, Paraná, Brazil^e Department of Chemistry, UEL, Paraná, Brazil^f Department of Physiotherapy, UEL, Paraná, Brazil

HIGHLIGHTS

- Plasma MDA may serve as a highly sensitive and specific disease biomarker of PD.
- Plasma LOOH and SOD expression may serve as staging biomarkers of PD.
- New treatments for PD should target lipid peroxidation and lowered antioxidant defenses.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2015

Received in revised form 1 February 2016

Accepted 4 February 2016

Available online 6 February 2016

Keywords:

Parkinson disease

Oxidative stress

Antioxidants

Malondialdehyde

Staging

ABSTRACT

There is evidence that immune-inflammatory, stress of reactive oxygen and nitrogen species (IO&NS) processes play a role in the neurodegenerative processes observed in Parkinson's disease (PD). The aim of the present study was to investigate peripheral IO&NS biomarkers in PD. We included 56 healthy individuals and 56 PD patients divided in two groups: early PD stage and late PD stage. Plasma lipid hydroperoxides (LOOH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl (SH) groups, catalase (CAT) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, paraoxonase (PON)1 activity, total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) and C-reactive protein (CRP) were measured. PD is characterized by increased LOOH, MDA and SOD activity and lowered CAT activity. A combination of five O&NS biomarkers highly significantly predicts PD with a sensitivity of 94.5% and a specificity of 86.8% (i.e., MDA, SOD activity, TRAP, SH-groups and CAT activity). The single best biomarker of PD is MDA, while LOOH and SOD activity are significantly associated with late PD stage, but not early PD stage. Antiparkinson drugs did not affect O&NS biomarkers, but levodopa + carbidopa significantly increased CRP. It is suggested that MDA may serve as a disease biomarker, while LOOH and SOD activity are associated with late PD stage characteristic. New treatments for PD should not only target dopamine but also lipid peroxidation.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Graduation Program in Health Sciences, UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: sabbatini2011@hotmail.com, sabbatini@uel.br (D.S. Barbosa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>

0304-3940/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The characteristic of Parkinson's disease (PD) is damage to dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) leading to lowered levels of dopamine and, consequently, motor

Table 1
Socio-demographic, clinical data and inflammatory, oxidative stress biomarkers in patients with PD and normal controls.

Variables	Controls	PD	F	df	p	Eta
Age (years)	69.7 (8.8)	70.3 (8.9)	0.14	1/108	0.706	–
BMI (kg/m ²)	27.6 (5.0)	26.9 (5.1)	0.49	1/108	0.487	–
Sex (male/female)	24/30	27/29	0.16	1	0.692	–
Tobacco use (yes/no)	42/12	43/13	0.02	1	0.901	–
Ethnicity (Caucasian/non-Caucasian)	35/19	37/19	0.02	1	0.890	–
Marital status (married versus single + divorced + widower)	26/28	39/17	5.25	1	0.022	–
Physical activity (yes/no)	34/20	19/37	9.28	1	0.002	–
Alcohol use no consumption versus daily (5– times a week) or weekly (3 times or less a week) or sporadic consumption (1 time a month)	38/16	52/4	9.34	1	0.002	–
Duration of illness (years)	–	6.5 (4.2)	–	–	–	–
CL-LOOH (cpm)	11319 (±6132)	15370 (±8668)	7.23	1/104	0.008	0.065
FOX-LOOH (mM/L)	1.37 (±0.23)	1.66 (±0.36)	24.4	1/104	<0.001	0.190
MDA (uM/mg protein)	168.1 (±18.3)	210.6 (±27.5)	89.69	1/103	<0.001	0.465
NOx (µM/L)	4.43 (±2.58)	5.57 (±5.19)	1.99	1/104	0.161	0.019
TRAP (uM Trolox)	994.4 (±104.2)	960.3 (±121.4)	2.25	1/104	0.136	0.021
SH (mM/mg protein)	0.037 (±0.008)	0.036 (±0.008)	1.50	1/104	0.223	0.014
CAT (U/mg Hb)	6.93 (±2.29)	5.63 (±1.79)	10.49	1/103	0.002	0.092
SOD (U/mg Hb)	3.41 (±1.15)	4.53 (±1.74)	16.52	1/103	<0.001	0.138
PON 1 U/mL	229.9 (±68.6)	210.5 (±67.1)	2.50	1/104	0.117	0.023
CRP (mg/L)	1.99 (±1.78)	4.10 (±7.66)	4.87	1/99	0.030	0.049

Results are means (±SD). All results of GLM analyses with diagnostic groups, sex and tobacco use as factors and age and body mass index as covariates. CL-LOOH: Lipid hydroperoxides-chemiluminescence assay; FOX-LOOH: Lipid hydroperoxides-spectrophotometric assay; MDA: Malondialdehyde; NOx: Nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; SH: Sulfhydryl group; CAT: Catalase activity; SOD: Superoxide dismutase activity; PON 1: Paraoxonase 1 activity; CRP: C-reactive protein.

Table 2
Results of (automatic) binary logistic regression analysis with PD as dependent variable (normal controls as the reference group) and the biomarkers as explanatory variables.

Explanatory Variables	Wald	df	p	Odds ratio	Lower CI 95%	Upper CI 95%
SH mM/mg protein	6.79	1	0.009	0.25	0.09	0.71
TRAP uM Trolox	4.50	1	0.034	0.99	0.98	0.99
CAT U/mg Hb	10.49	1	0.001	0.39	0.23	0.69
SOD U/mg Hb	12.23	1	<0.001	3.63	1.76	7.48
MDA uM/mg protein	18.82	1	<0.001	1.12	1.07	1.18

CI 95%: 95% confidence interval; SH: Sulfhydryl group; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; CAT: Catalase activity; SOD: Superoxide dismutase activity; MDA: Malondialdehyde.

Table 3
Socio-demographic, clinical and inflammatory and oxidative stress data in controls and two groups of PD patients, i.e., early PD stage and late PD stage.

Variables	Controls ^A	Early PD stage ^B	Late PD stage ^C	F or χ^2	df	p
Age (years)	69.7 (±8.8)	68.6 (±8.7)	71.0 (±8.9)	0.50	2/107	0.611
Sex (male/female)	24/30	6/10	21/19	1.19	2	0.551
TU (yes/no)	42/12	13/3	30/10	0.27	2	0.87
BMI (kg/m ²)	27.6 (±5.0)	27.3 (±4.5)	26.7 (±5.3)	0.32	2/107	0.725
CRP (mg/L)	1.99 (±1.76)	5.96 (±12.84)	3.34 (±4.04)	2.54	2/98	0.084
FOX-LOOH (mM/L)	1.37 (±0.23) ^C	1.55 (±0.32)	1.70 (±0.37) ^A	13.48	2/103	<0.001
CL-LOOH (cpm)	11319 (±6132) ^C	13465 (±7942)	16132 (8922) ^A	4.13	2/103	0.019
NOx (µM/L)	4.43 (±2.58)	5.30 (±3.73)	5.68 (±5.71)	1.00	2/103	0.368
SH (mM/mg protein)	0.037 (±0.008)	0.038 (±0.009)	0.035 (±0.007)	1.59	2/103	0.204
TRAP (uM Trolox)	994.4 (±104.2)	936.4 (±106.3)	969.9 (±126.9)	1.68	2/103	0.192
PON 1 (U/mL)	229.9 (±68.6)	226.5 (±97.9)	204.0 (±50.2)	1.94	2/103	0.149
MDA (uM/mg protein)	168.1 (±18.3) ^{B,C}	201.9 (±18.9) ^A	214.1 (±29.7) ^A	47.48	2/102	<0.001
CAT (U/mgHb)	6.92 (±2.29) ^C	5.63 (±2.12)	5.62 (±1.67) ^A	5.20	2/102	0.007
SOD (U/mgHb)	3.41 (±1.15) ^C	4.07 (±1.77)	4.72 (±1.72) ^A	9.56	2/102	<0.001

All results are shown as mean (±SD). All results of GLM analyses with gender, BMI, age and tobacco use (TU) (TU) as additional explanatory variables. BMI: Body mass index; CRP: C-reactive protein; FOX-LOOH: Lipid hydroperoxides-spectrophotometric assay; CL-LOOH: Lipid hydroperoxides-chemiluminescence assay; NOx: Nitric oxide metabolites; SH: Sulfhydryl group; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; PON 1: Paraoxonase 1 activity; MDA: Malondialdehyde; CAT: Catalase activity; SOD: Superoxide dismutase activity. A, B & C in a row indicate that the mean values are statistically significant different at $p < 0.05$ (Tukey's test) from the means of the categories labelled as A, B or C.

and non-motor manifestations. Recent conceptualizations of PD have integrated the importance of immuno-inflammation and stress of reactive oxygen and nitrogen species (IO&NS) pathways in the pathophysiology of the disease. In physiological conditions, reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species are balanced by antioxidant compounds and enzymes. In situations with increased ROS/RNS accumulation and lowered antioxidant defenses, O&NS

is generated, which may damage lipids, proteins and DNA. The oxidation of dopamine by monoamine oxidase generates ROS, which, in the presence of lowered antioxidant defenses and high concentrations of iron may cause neurodegenerative processes in the SNpc [1].

Evidence of O&NS damage in PD is indicated by increased damage to lipids, proteins and DNA and lowered levels of

Table 4

Results of generalized regression analysis with a severity score based on progression of PD (i.e., 0 = controls; 1 = PD stage 1; 2 = PD stage 2; and 3 = PD stage 3) as dependent variable and the oxidative stress biomarkers and C-reactive protein as explanatory variables.

Parameters	B	F	df	p	ETA squared
Intercept	−2.12	10.08	1/102	0.002	0.090
FOX-LOOH (mM/L)	0.63	7.86	1/102	0.006	0.072
SH (mM/mg protein)	−27.63	9.45	1/102	0.003	0.085
MDA (uM/mg protein)	0.016	52.53	1/102	<0.001	0.340
CAT (U/mgHb)	−0.103	9.41	1/102	0.003	0.084
SOD (U/mgHb)	0.165	12.36	1/102	0.001	0.108

FOX-LOOH: Lipid hydroperoxides-spectrophotometric assay; SH: Sulfhydryl group; MDA: Malondialdehyde; CAT: Catalase activity; SOD: Superoxide dismutase activity.

glutathione in the brain [2]. Signs of O&NS are also observed in the peripheral blood of PD patients, including increased lipid hydroperoxides (LOOH), higher levels of by-products of nitric oxide (NOx) and changes in antioxidants [3]. The activity of catalase (CAT), one of the antioxidant enzymes, is reduced in the brain of PD patients [4]. Sulphydryl groups (-SH), which are part of the antioxidant system were found to be lowered in PD patients [5]. In PD, post mortem studies showed increased activity of encephalic superoxide dismutase (SOD), which converts superoxide to hydrogen peroxide (H₂O₂) in the cytoplasm and mitochondria and is a first line defense against increased ROS production [6].

Another antioxidant enzyme that has been studied in PD is paroxonase 1 (PON 1). It is bound to high-density lipoprotein and plays a key role in protecting both low- and high-density lipoproteins from oxidation. Lowered PON-1 activity increases risk to neurodegenerative diseases as well as other IO&NS-related pathologies [7]. PON 1 polymorphisms are associated with the development of PD [8]. Moreover, decreased plasma PON 1 was reported in patients with insecticide-induced PD [9].

In addition to the involvement of O&NS processes in PD, inflammatory mechanisms also contribute to the pathophysiology and staging of disease (chronicity and disease progression). Evidence of inflammatory events in PD include activated microglia and increased levels of inflammatory biomarkers such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6 and C-reactive protein (CRP) [10]. Since it is known that CRP can activate microglia, it could be expected that elevated CRP levels in PD take part in the neuro-inflammatory pathophysiology and thus in disease severity or progression [11].

The aim of this study was to examine systemic IO&NS biomarkers in PD. We expected to find that PD is accompanied by increased IO&NS biomarkers reminiscent of lipid peroxidation (lipid hydroperoxides, malondialdehyde), nitric oxide metabolism (NOx) and inflammation (CRP), lowered levels of most antioxidants (total radical trapping antioxidant parameter, CAT activity, SH-groups and PON 1), but elevated SOD activity.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

The study population consisted of 56 PD patients recruited from the neurology ambulatory at Clinical Hospital, State University of Londrina. PD was diagnosed according to the criteria of the United Kingdom PD Society Brain Bank (UKPD). Patients were included and classified into two groups: early PD stage (corresponding to stage 1 according to Hoehn-Yahr scale) with unilateral involvement and late PD stage (corresponding to stages 2 + 3 according to Hoehn-Yahr scale) with bilateral or midline involvement. The control group (n = 56), i.e., apparently healthy individuals, was matched for gender, age and ethnicity to the patients.

Patients with clinical or laboratory evidence of autoimmune, renal, heart, liver and other neurological diseases, including multiple sclerosis, stroke, Alzheimer's disorder, major depression

and chronic fatigue syndrome, alcohol dependence and use of antioxidant supplements were excluded from both the PD and control groups. Most PD patients were treated with drugs: levodopa and carbidopa (n = 13), levodopa and benserazide (n = 37), pramipexole (n = 30), amantadine (n = 12), biperiden (n = 7) and/or entacapone (n = 5). Twelve patients were taking antidepressants (amitriptyline or fluoxetine). Written informed consent was obtained from all patients and controls. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina (protocol n° 222/2011).

2.2. Methods

Blood was collected after an overnight fast (10 h). Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) [12], lipid hydroperoxides, i.e., FOX-LOOH [13] and CL-LOOH [14], MDA [15], NOx [16], SOD activity in erythrocytes [17], CAT activity in erythrocytes [18], SH groups [19], total plasmatic PON1 activity [20] were assayed by previously described methods. CRP was determined by an automated immunological method (i2000SR Architect, Abbott, USA). The inter-assay CV values for all analytes were <10%.

2.3. Statistical analysis

Differences in socio-demographic, clinical and biomarker data between PD cases and normal controls were checked with ANOVAs or ANCOVAs. Tukey tests were used to examine multiple comparisons between the three study groups (controls and 2 PD subgroups). We employed χ^2 test (analyses of contingency tables) to examine the associations between socio-demographic and clinical data and diagnostic groups. Relationships between variables were assessed using Pearson's product moment and Spearman's rank order correlation coefficients. Univariate general linear model (GLM) analyses were used to examine the effects of diagnostic groups on the biomarkers while adjusting for background variables, such as gender, age and BMI. Multivariate GLM analysis was used to examine the effects of drugs on the biomarkers. Tests for homogeneity of variance have been carried out where appropriate (Levene test). Generalized LM (GeLM) analysis was used to examine the effects of biomarkers and socio-demographic data on the severity index. We used bivariate logistic regression analyses to delineate the significant biomarkers with Odds ratio and 95% confidence intervals of PD versus controls. The Hosmer-Lemeshow test was used to test whether the model fitted the data. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance.

3. Results

Table 1 shows the socio-demographic, clinical and biomarker data. We did not use a Bonferroni p-correction to interpret the multiple statistical analyses on the socio-demographic and clinical data because the results of these univariate tests were employed to delineate the explanatory variables that were subsequently used in logistic regression analyses as determinants of independent

association with the diagnostic groups. There were no significant differences in age, BMI, sex ratio, tobacco use (TU, that is current tobacco use + previous use *versus* never smoking) and ethnicity between cases and controls. Without p-correction there were significant associations between PD and marital status (more married individuals), physical activity (lower in PD), and alcohol use (lower in PD).

Without p-correction, we found significant associations between age and SH groups ($r = -0.391$, $p < 0.001$, $n = 110$). There were significant correlations between BMI and CRP ($r = 0.255$, $p = 0.009$, $n = 105$), TRAP ($r = 0.307$, $p = 0.001$, $n = 110$) and CL-LOOH ($r = -0.214$, $p = 0.025$, $n = 110$). There were sex differences in SH groups ($F = 12.3$, $df = 1/108$, $p < 0.001$), LOOH ($F = 4.22$, $df = 1/108$, $p = 0.042$) and CAT activity ($F = 5.62$, $df = 1/107$, $p = 0.020$). Subjects with TU had significantly higher SOD activity values ($F = 4.68$, $df = 1/107$, $p = 0.033$). There were no significant associations between the biomarkers and alcohol abuse. Consequently, we have used sex, age, BMI and TU as additional explanatory variables in GLM analyses when examining the associations between PD and the biomarkers.

GLM analyses with diagnostic groups, sex and TU as factors and age and BMI as covariates showed significantly higher CL-LOOH, FOX-LOOH, MDA, SOD activity and CRP and lower CAT activity in PD as compared to controls. Diagnostic groups explained a large part of the variance in the biological markers, e.g., 46.5% of the variance in MDA and 19.0% of the variance in FOX-LOOH. Controlling for marital status, physical activity and alcohol use did not change any of these results.

TRAP was significantly predicted by sex ($F = 4.41$, $df = 1/104$, $p = 0.038$) and BMI ($F = 10.99$, $df = 1/104$, $p = 0.001$). CRP ($F = 21.21$, $df = 1/99$, $p < 0.001$) was significantly associated with BMI. SH groups were significantly predicted by sex ($F = 5.88$, $df = 1/104$, $p = 0.017$) and age ($F = 23.86$, $df = 1/104$, $p < 0.001$).

Table 2 shows that SOD activity and MDA were significantly and positively associated with PD, whereas TRAP, SH-groups and CAT activity were inversely associated with PD (results of automatic stepwise binary logistic regression analysis; $X^2 = 99.51$, $df = 5$, $p < 0.001$, Nagelkerke = 0.803). Using this regression equation 90.7% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 94.5% and a specificity of 86.8%. The Hosmer-Lemeshow test showed that this model fitted the data quite well ($X^2 = 4.51$, $df = 8$, $p = 0.808$).

Table 3 shows the characteristics of controls *versus* two patients groups divided according to early PD stage *versus* late PD stage. There were no significant differences in age, sex ratio, TU or BMI between the three study samples. GLM analyses showed that there were significant differences in FOX-LOOH, CL-LOOH, MDA, CAT activity and SOD activity between the subgroups. FOX-LOOH, CL-LOOH and SOD activity were significantly higher in late PD stage than in controls. MDA was significantly higher in both PD groups as compared to controls. CAT activity was significantly lower in late PD stage, whereas there was a trend toward significantly lower values in early PD stage ($p = 0.079$).

Table 4 shows the outcome of a GeLM analysis with a severity score based on PD progression (i.e., 0 = controls; 1 = PD stage 1; 2 = PD stage 2; and 3 = PD stage 3) as dependent variable and the IO&NS biomarkers as explanatory variables. 58.1% of the variance ($F = 28.27$, $df = 5/102$, $p < 0.001$) was explained by FOX-LOOH, MDA and SOD activity (positively associated) and SH groups and CAT activity (inversely associated) with this staging score.

In order to examine the effects of the drug state on the IO&NS biomarkers, we have performed multivariate GLM analyses with the IO&NS biomarkers as dependent variables, and the diagnostic classification, sex and the drug state as fixed factors and age and BMI as covariates. Diagnostic classification remained a significant explanatory variable after adjusting for the drug state. There were no significant (at the $p = 0.007$ Bonferroni

corrected level) effects of amantadine ($F = 1.37$, $df = 11/86$, $p = 0.201$), pramipexole ($F = 2.2$, $df = 11/86$, $p = 0.020$), biperiden ($F = 1.17$, $df = 11/86$, $p = 0.320$), entacapone ($F = 0.46$, $df = 11/86$, $p = 0.921$), levodopa+benserazide ($F = 2.41$, $df = 11/87$, $p = 0.012$) and antidepressants ($F = 0.77$, $df = 11/86$, $p = 0.665$). There was a significant effect of levodopa+carbidopa ($F = 2.63$, $df = 11/87$, $p = 0.006$). Tests of between-subject effects showed that levodopa+carbidopa had a significant stimulatory effect on CRP (adjusted mean \pm SE, no drugs = 2.15 ± 0.54 mg/L *versus* drugs 9.65 ± 1.60 mg/L; $F = 19.21$, $df = 1/97$, $p < 0.001$). Adjusting for the use of levodopa+carbidopa in univariate GLM analysis showed that CRP was no longer significantly increased in PD patients ($F = 0.40$, $df = 1/98$, $p = 0.529$).

4. Discussion

The first major finding of this study is that PD is positively associated with increased levels of oxidative biomarkers (LOOH and MDA) and SOD activity, and inversely with antioxidant defenses, such as TRAP, SH and CAT activity, and that a combination of different biomarkers significantly predicts PD with a sensitivity of 94.5% and a specificity of 86.8%. Thus, MDA and SOD activity increase risk toward PD, whereas TRAP, SH-groups and CAT activity displayed protective effects. The single best biomarker for PD was MDA showing that an amazing 46.5% of the variance in MDA levels was associated PD.

Our findings that LOOH and MDA, which are both indicators of lipid peroxidation, are elevated in the blood of PD patients are in agreement with those of other studies [3,21]. Sharma et al. [5], suggest three possible mechanistic explanations for the elevated lipid peroxidation in PD: (a) lower levels of antioxidants; (b) more substrates for oxidation; and (c) the presence of yet unidentified plasma pro-oxidants in patients with PD.

In our study no significant changes in NOx levels was detected in PD. In the CNS, however, PD is not only accompanied by lipid peroxidation, but also by an increased NO metabolism [22]. High levels of NO can nitrosylate proteins thereby modifying the activity of many proteins related to intracellular signaling and immune responses. This explains that NO generated by inducible nitric oxide synthase (iNOS) may cause inflammatory responses and apoptosis. In PD, the injury to dopaminergic neurons promotes microglial activation, upregulation of iNOS and increased NO production [23].

In this study we found that antioxidant biomarkers were inversely (TRAP, CAT and SH-groups) or positively (SOD activity) associated with PD. The decreased TRAP indicates reduced levels of hydrosoluble plasmatic antioxidants, including uric acid, glutathione, bilirubin and ascorbic acid [24]. Decreased levels of plasma antioxidants associated with markers of oxidative stress in PD patients have also been reported [5,24]. Moreover, our results that SH is lowered in PD patients are in agreement with those of [5]. Although we could not find lowered PON1 activity in our patients previous research reported reduced plasma PON-1 activity in PD patients [7].

Our CAT and SOD activity findings are in agreement with the results of previous studies [3,5]. Increased SOD activity may constitute a compensatory mechanism to counteract increased production of superoxide radicals. The increase in SOD activity improves the scavenging of $O_2^{\cdot-}$, however generates H_2O_2 , which in the presence of iron may become an additional source of ROS. In this way, decreased CAT activity may reflect increased consumption in order to decompose H_2O_2 . Sharma et al. [5] found that increased SOD activity may be ascribed to the effects of various ROS, which are produced during chronic oxidative stress in these patients. However, there are also some contradictory results in PD showing decreased SOD activity in the peripheral blood [25,26].

Another major finding of this study is that some biomarkers are associated with early or late staging of illness. LOOH and SOD activity are significantly increased in late PD stage, but not in early PD stage, while MDA is increased in early and late PD stages. These findings suggest that with progression of illness (from early stage to late stage) there is a gradual increase in LOOH and SOD activity. Thus, while MDA is a highly significant biomarker of PD *per se*, changes in LOOH and SOD activity are more associated with disease progression. Our results may suggest that lipid peroxidation with the formation of neoepitopes like MDA is a key phenomenon of PD that further drives adaptive changes in SOD and CAT activity.

The results of the present study show that pathophysiological features of PD are detectable in the peripheral blood and that increased LOOH and SOD activity, but not MDA, are additionally biomarkers of disease progression. Lowered levels of TRAP, SH-groups and CAT activity may increase susceptibility to inflammation and damage by O&NS and lipid peroxidation [23]. Previously, we have discussed the pathways that translate peripheral IO&NS signals to central neuro-inflammatory responses, including vagus nerve signaling and blood-brain-barrier permeability pathways. Microglia-associated neuro-inflammation with increased levels of pro-inflammatory mediators and ROS may play a role in the neuronal degeneration in PD [27]. Peripheral and central IO&NS processes occur in the prodromal stage of the disease and may sustain disease progression [28]. Therefore it may be concluded that the interplay between peripheral and central IO&NS processes is a key component in the pathophysiology of PD which is associated with the onset as well as progression of PD.

In this study, we found that the antiparkinson drugs used did not affect the O&NS biomarkers, which support *in vitro* and clinical studies showing that levodopa treatment does not increase oxidative damage [29,30]. Adjusting our results for the effects of levodopa + carbidopa showed that the increased CRP levels in PD were no longer significant and that patients who were taking levodopa + carbidopa had significantly higher CRP levels. Previously, increased CRP levels in 17 individuals taking carbidopa + levodopa was reported to the USFDA (<http://www.ehealthme.com/print/ds18298141>). Although increased CRP in PD may be an artifact of the drug state of the patients, there are reports showing increased levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-6 (which mediates CRP plasma levels) in the plasma and brain of PD patients [11]. All in all, the antiparkinson drugs used in our study did not attenuate the systemic O&NS processes, while levodopa + carbidopa even increased the inflammatory state. Since O&NS processes appear to be important in the pathophysiology of PD it may be suggested that treatments using the current antiparkinson drugs should be combined with drugs targeting lipid peroxidation and lowered antioxidant levels.

This study has some limitations and strengths that must be considered when interpreting the data. The limitations are: (1) as this is a cross-sectional case-control study, we cannot draw firm conclusions on causality; (2) the smaller number of participants in the PD and control groups; and (3) indicators of neuro-inflammation were not measured. Strengths are that all our results are controlled for possible effects of intervening variables, including gender, age, BMI, tobacco and alcohol use, the drug state of the patients, other medical illnesses and use of antioxidant supplements.

In conclusion, plasma MDA may serve as a highly sensitive and specific disease biomarker, while plasma LOOH and SOD activity may serve as staging biomarkers of PD. These pathophysiological hallmarks of PD can be measured in the peripheral blood. New treatments for PD should not only target dopaminergic pathways but also lipid peroxidation and lowered antioxidant defenses.

Conflicts of interest

None.

Funding

C.C.F. was supported by a Master Fellowship from CAPES. E.G.M and D.S.B. receives senior research fellowships from Fundação Araucária. M.M. is supported by a CNPq PVE fellowship at the Health Sciences Graduation Program.

Acknowledgments

To our patients who volunteered for this study.

References

- [1] G. Anderson, M. Maes, Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins, *Mol. Neurobiol.* 49 (2014) 771–783, <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-013-8554-z>.
- [2] S. Gandhi, A.Y. Abramov, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012), <http://dx.doi.org/10.1155/2012/428010>.
- [3] S. Nikam, P. Nikam, S.K. Ahaley, A.V. Sontakke, Oxidative stress in Parkinson's disease, *Indian J. Clin. Biochem.* 24 (2009) 98–101.
- [4] C. Zhou, Y. Huang, S. Przedborski, Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008 (2016) 93–104, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1427.023>.
- [5] A. Sharma, P. Kaur, B. Kumar, S. Prabhakar, K.D. Gill, Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population, *Parkinsonism Relat. Disord.* 14 (2008) 52–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkrel.2007.06.009>.
- [6] J.M. Taylor, B.S. Main, P.J. Crack, Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease, *Neurochem. Int.* 62 (2013) 803–819, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.016>.
- [7] K. Ikeda, Y. Nakamura, T. Kiyozuka, J. Aoyagi, T. Hirayama, R. Nagata, et al., Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: changes linked to disease progression, *Neurodegener. Dis.* 8 (2011) 252–258, <http://dx.doi.org/10.1159/000323265>.
- [8] A.C. Belin, C. Ran, A. Anvret, S. Paddock, M. Westerlund, A. Håkansson, et al., Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism in Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 522 (2012) 30–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.007>.
- [9] L. Benmoyal-Segal, T. Vander, S. Shifman, B. Bryk, R.P. Ebstein, E.-L. Marcus, et al., Acetylcholinesterase/paraoxonase interactions increase the risk of insecticide-induced Parkinson's disease, *FASEB J.* 19 (2005) 452–454, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-2106fje>.
- [10] G. Andican, D. Konukoglu, M. Bozulucay, K. Bayülkem, S. Firtina, G. Burcak, Plasma oxidative and inflammatory markers in patients with idiopathic Parkinson's disease, *Acta Neurol. Belg.* 112 (2012) 155–159, <http://dx.doi.org/10.1016/s13760-012-0015-3>.
- [11] S. Hassin-Baer, O.S. Cohen, E. Vakil, N. Molshazki, B.A. Sela, Z. Nitsan, et al., Is C-reactive protein level a marker of advanced motor and neuropsychiatric complications in Parkinson's disease? *J. Neural Transm.* 118 (2011) 539–543, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-010-0535-z>.
- [12] M. Repetto, C. Reides, M.L. Gomez Carretero, M. Costa, G. Griemberg, S. Llesuy, Oxidative stress in blood of HIV infected patients, *Clin. Chim. Acta* 255 (1996) 107–117.
- [13] Z.Y. Jiang, A.C.S. Woollard, S.P. Wolff, Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method, *Lipids* 26 (1991) 853–856, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02536169>.
- [14] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100, [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).
- [15] A.S. Bastos, A.P.D.M. Loureiro, T.F. De Oliveira, S.C.T. Corbi, R.M.S. Caminaga, C. Rossa, et al., Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method, *Anal. Biochem.* 423 (2012) 141–146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.016>.
- [16] J.A. Navarro-González, C. García-Benayas, J. Arenas, Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids, *Clin. Chem.* 44 (1998) 679–681.
- [17] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.
- [18] H. Aebi, [13] catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [19] M.L. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 380–385, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33044-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33044-1).

- [20] R.J. Richter, G.P. Jarvik, C.E. Furlong, Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1 (2008) 147–152, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>.
- [21] J.A. Serra, R.O. Domínguez, E.S. De Lustig, E.M. Guareschi, A.L. Famulari, E.L. Bartolomé, et al., Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients, *J. Neural Transm.* 108 (2001) 1135–1148, <http://dx.doi.org/10.1007/s007020170003>.
- [22] X. Su, H.J. Federoff, Immune responses in parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014), <http://dx.doi.org/10.1155/2014/275178>.
- [23] S. Moylan, M. Berk, O.M. Dean, Y. Samuni, L. Williams, A. O'Neil, et al., Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neurosci Biobehav. Rev.* 45 (2014) 46–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.05.007>.
- [24] J.A. Serra, R.O. Domínguez, E.R. Marschoff, E.M. Guareschi, A.L. Famulari, A. Boveris, Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging, *Neurochem. Res.* 34 (2009) 2122–2132, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-009-9997-5>.
- [25] R.Y. Yuan, M.-Y. Wu, S.-P. Hu, Antioxidant status in patients with Parkinson's disease, *Nutr. Res.* 20 (2000) 647–652, [http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00154-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00154-8).
- [26] S. Abraham, C.C. Soundararajan, S. Vivekanandhan, M. Behari, Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease, *Indian J. Med. Res.* (2005) 111–115.
- [27] G. Morris, M. Maes, Oxidative and nitrosative stress and immune-inflammatory pathways in patients with myalgic encephalomyelitis (ME)/chronic fatigue syndrome (CFS), *Curr. Neuropharmacol.* 12 (2014) 168–185, <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X11666131120224653>.
- [28] R. Niranjan, The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes, *Mol. Neurobiol.* 49 (2014) 28–38, <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-013-8483-x>.
- [29] B.Y. Zeng, R.K. Pearce, G.M. MacKenzie, P. Jenner, Chronic high dose L-dopa treatment does not alter the levels of dopamine D-1, D-2 or D-3 receptor in the striatum of normal monkeys: an autoradiographic study, *J. Neural Transm.* 108 (2001) 925–941, <http://dx.doi.org/10.1007/s007020170013>.
- [30] C.M. Chen, J.L. Liu, Y.R. Wu, Y.C. Chen, H.S. Cheng, M.L. Cheng, et al., Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.* 33 (2009) 429–435, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.011>.

RESEARCH ARTICLE



Parkinson's Disease is Accompanied by Intertwined Alterations in Iron Metabolism and Activated Immune-inflammatory and Oxidative Stress Pathways



Carine Coneglian de Farias¹, Michael Maes^{1,2,3,4,*}, Kamila Landucci Bonifácio¹, Andressa Keiko Matsumoto¹, Chiara Cristina Bortolasci¹, André de Souza Nogueira¹, Francis Fregonesi Brinholi¹, Helena Kaminami Morimoto⁵, Lúcio Baena de Melo⁶, Estefânia Gastaldello Moreira¹ and Décio Sabbatini Barbosa¹

¹Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina (UEL), Paraná, Brazil; ²School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia; ³Department of Psychiatry, Medical University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria; ⁴Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ⁵Department of Pathology, Clinical and Toxicological analysis, UEL, Paraná, Brazil; ⁶Clinical Hospital, UEL, Paraná, Brazil

Abstract: Background: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a complex interplay between peripheral and central inflammatory and oxidative stress pathways.

Objective: To investigate immune-inflammatory and oxidative stress pathways in relation to iron metabolism in peripheral blood of PD patients and healthy controls.

Method: We recruited 56 healthy individuals and 56 PD patients in stages 1-3 of Hoehn and Yahr Scale. Plasma haptoglobin (Hp), homocysteine, interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, iron (Fe), ferritin, total iron binding capacity, transferrin (Tf), soluble transferrin receptor (sTfR), malondialdehyde (MDA) and paraoxonase 1 (PON1) were measured.

Results: PD was associated with significant changes in Tf (lowered), sTfR, ferritin, Hp, interleukin 6 and MDA (all increased) levels, while there was a trend towards a negative association with PON1. Logistic regression showed that the most significant biomarkers of PD were MDA, sTfR, Hp and ferritin. Moreover, Fe levels were negatively associated with Hp and positively with PON1, total iron binding capacity and Tf, while ferritin and sTfR were positively associated with MDA levels.

Conclusion: Our study indicates a state of systemic inflammation and oxidative stress in PD patients coupled with alterations in Fe metabolism. Chronic inflammation and oxidative pathways in PD may in part determine changes in iron metabolism. New drug treatments for PD should target inflammatory and oxidative stress pathways and iron metabolism as well.

ARTICLE HISTORY

Received: September 01, 2016
Revised: November 18, 2016
Accepted: January 19, 2017

DOI:
10.2174/1871527316666170223161004

Keywords: Inflammation, iron metabolism, oxidative stress, Parkinson's disease, Peripheral biomarkers, Systemic disease.

1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is an age-related, incurable and progressive neurodegenerative disorder. Motor symptoms include bradykinesia, gait disturbance, tremor, rigidity and postural instability, whereas non-motor symptoms, which can precede the motor symptoms, include hyposmia, olfactory and autonomic dysfunction (e.g., constipation) as well as sleep and cognitive disturbances [1, 2].

PD has a complex etiology. Besides aging, other susceptibility factors may be involved, such as environmental toxicants (e.g., pesticides and metals) and genetic (e.g., mutations in the genes for alpha-synuclein, parkin, superoxide dismutase, etc). Susceptibility factors trigger or exacerbate the pathways underpinning PD, including oxidative and nitrosative stress (O&NS), mitochondrial dysfunction, inflammation and iron (Fe) metabolism imbalances [3]. These processes may contribute as primary event in the pathology of PD or they may be secondary to the neurodegenerative process leading to exacerbation of cell death [3, 4].

*Address correspondence to this author at the Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; E-mail: dr.michaelmaes@hotmail.com

In PD there is an activation of immune-inflammatory (as indicated by increased levels of cytokines, chemokines and acute phase reactants) and oxidative stress pathways (as indicated by increased lipid peroxidation) both in the central nervous system (CNS) and in the peripheral blood of PD patients [2, 5, 6]. Activated microglial cells and increased levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF- α , and IL-6, have been described in postmortem substantia nigra (SN) from PD patients [7, 8]. In PD, similar changes in blood cytokines, produced by peripheral blood mononuclear cells subpopulations, can be found in cerebrospinal fluid, indicating a strong relationship between peripheral and central immune pathways [9]. Inflammatory processes may be triggered by IL-6, which is one of the most important cytokines orchestrating the acute phase response in the liver [10] that is characterized by increased levels of positive acute-phase proteins (e.g., C-reactive protein or CPR, haptoglobin and ferritin) and a decrease in negative acute-phase proteins (e.g., transferrin) and enzymes, including paraoxonase 1 (PON1) [10, 11]. The pro-inflammatory effects of IL-6 are mediated through its soluble receptor (sIL-6R) and increased IL-6 trans-signaling (IL6/sIL-6R) [12]. Studies that evaluated blood IL-6 levels in PD patients reported no changes [13, 14], elevated levels [9, 15-18] and even reduced levels [19], whereas the only study that quantified sIL-6R [20] reported a reduction in this biomarker.

In PD patients, brain and systemic changes in Fe metabolism have been observed [21, 22]. Increasing age is accompanied by Fe accumulation in the SN of healthy controls, whilst this accumulation is significantly increased in PD patients [23]. In PD brains, reduced concentrations of ferritin, transferrin (Tf) and its receptor, and increased iron deposition were found [22, 23], while circulating Fe, ferritin, and Tf, total iron-binding capacity and transferrin saturation were decreased [24, 25]. Such findings indicate defects in Fe metabolism in the brain and liver of patients with PD.

Besides its effect on acute-phase proteins, IL-6 also modulates Fe metabolism inducing the main Fe regulatory hormone hepcidin and resulting in iron mobilization from its stocks [26, 27]. Regarding Fe metabolism markers and acute-phase proteins, the literature is also controversial and limited. One meta-analysis study concluded that there is a lack of association between seric Fe and PD and suggested that Fe should be considered together with iron proteins [28]. Some studies reported a lack of association between PD and ferritin [25, 29, 30] and serum iron-binding capacity [30], while other studies reported a significant increase in ferritin [31], but a decrease in transferrin in PD [25, 32]. A meta-analysis study suggested that haptoglobin (Hp) may be a potential marker of PD disease because this protein is increased in PD and is involved with inflammatory response and regulation of Fe homeostasis [33-35].

The aim of this study was to examine immune-inflammatory (Hp, IL-6, sIL-6R), oxidative stress (MDA: malondialdehyde, PON1) and Fe metabolism (Fe, ferritin, TIBC: total iron binding capacity, Tf, sTfR: soluble transferrin receptor) biomarkers in peripheral blood of PD patients versus healthy controls. To our knowledge, this is the first study to analyze such a diverse number of iron metabolism markers looking for associations with immune-inflammatory

and oxidative stress markers in PD. We also examined homocysteine (Hcy), because it has been used as a marker of prognosis and treatment with levodopa [36-38].

2. SUBJECTS AND METHOD

2.1. Subjects

Fifty-six PD patients recruited from the neurology ambulatory at Clinical Hospital, State University of Londrina (UEL) were enrolled. PD was diagnosed according to the criteria of the United Kingdom PD Society Brain Bank (UKPD) and Hoehn and Yahr Scale for Parkinson's. Patients in stages 1-3 were included. The healthy control group was composed of 56 apparently healthy individuals who were matched for gender, age and ethnicity to the patients.

Subjects with clinical or laboratory evidence of autoimmune, renal, heart, liver and other neurological diseases, including multiple sclerosis, stroke, Alzheimer's disorder, major depressive disorder, chronic fatigue syndrome, alcohol dependence and use of antioxidant supplements were excluded from both groups. PD patients were treated with the following drugs: levodopa and carbidopa (n=13), levodopa and benserazide (n=37), pramipexole (n=30), amantadine (n=12), biperiden (n=7) and/or entacapone (n=5). Twelve patients were taking antidepressants (amitriptyline or fluoxetine). Written informed consent was obtained from all patients and controls. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the UEL CAAE: 26325814.6.0000.5231.

2.2. Method

Blood was collected after an overnight fast (10 h). IL-6 and sIL-6R were quantified by ELISA (Boster Immuno-leader, Pleasonton, CA, USA) as well as sTfR (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Czech Republic). Fe and TIBC concentrations were measured on Dimension[®], RxL (Deerfield, IL, EUA). Hp, Hcy, ferritin and Tf were measured on Architect i2000SR (Abbott, IL, EUA). MDA was determined according to the technique described by [39] and total serum activity of PON1 according to [40]. The inter-assay CV values for all analyses were <10%.

2.3. Statistical Analysis

We used analyses of variance (ANOVAs) to check the differences in continuous variables between study groups. Analyses of contingency tables (χ^2 tests) were employed to assess the associations between diagnostic groups and socio-demographic/clinical data. Multivariate GLM analyses were employed to examine the multivariate effects of diagnosis on different sets of biomarkers (either Fe metabolism or immune-inflammatory and oxidative stress) while controlling for background variables, including, age, sex, body mass index (BMI), drug state of the patients, tobacco use. Subsequently, we used tests for between-subject effects to delineate the univariate effects of significant predictors on the dependent variables. Multivariate GLM analysis was also used to examine the multivariate and univariate effects of immune-inflammatory and oxidative stress biomarkers (explanatory variables) on Fe metabolism (dependent variables). Automatic stepwise bivariate logistic regression analysis was

used to determine the significant biomarkers that are associated with PD. Ln transformation were used to normalize data distribution of biological variables. Power analysis showed that using an ANCOVA with 2 groups and 2-4 covariates, at an effect size of 0.28 and power 0.8 (two-tailed, $\alpha=0.05$), the sample size should be around 103. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All analyses were performed using SPSS, version 22, for Windows.

3. RESULTS

Table 1 shows the socio-demographic and biomarker data. There were no significant differences in age, gender ratio, tobacco use and BMI between the study groups. Univariate tests without p-correction for multiple testing showed no differences in Fe, TIBC, Tf, Hcy, IL-6, sIL-6R, sTfR and PON1 between PD patients and controls. Ferritin, Hp and MDA were significantly higher in PD patients than in controls. We did not use p-corrections to assess the multiple univariate analyses shown in Table 1 because these statistical results (and the inter-correlation matrix among all variables) were used to define the explanatory variables that were employed as determinants of independent association with the dependent variables (*i.e.* PD, Fe metabolism and immune-inflammatory biomarkers) in the ultimate multivariate GLM and binary logistic regression analyses.

Table 2 shows the results of multivariate GLM analysis with the Fe metabolism biomarkers as dependent variables and diagnosis and sex as explanatory variables. We found significant multivariate effects of diagnosis and sex on the 5 iron variables. Tests for between-subject effects showed that diagnosis was associated with Tf and sTfR levels and that

part of the variance in ferritin levels was explained by diagnosis and sex. The same Table shows the estimated marginal mean (SE) values of the significant biomarkers. Thus, Tf was significantly lower while sTfR and ferritin levels were significantly higher in PD than in controls. Forced entry of other putative predictors (entered separately together with diagnosis and sex yielding 3 predictors) showed that these were not significant and additionally did not change the impact of diagnosis and sex on the Fe metabolism biomarkers, including age ($F=0.18$, $df=4/79$, $p=0.947$), tobacco use ($F=0.39$, $df=5/78$, $p=0.855$), BMI ($F=0.96$, $df=5/78$, $p=0.447$), education ($F=1.21$, $df=5/78$, $p=0.317$), alcohol use ($F=1.43$, $df=5/78$, $p=0.221$), ethnicity ($F=1.10$, $df=15/234$, $p=0.359$), and use of medications, including levodopa ($F=0.31$, $df=5/72$, $p=0.905$), levodopa + benserazide ($F=0.19$, $df=5/72$, $p=0.967$), amantadine ($F=0.83$, $df=5/72$, $p=0.535$), pramipexole ($F=0.79$, $df=2/72$, $p=0.561$), biperiden ($F=1.51$, $df=2/72$, $p=0.199$) and entacapone ($F=1.55$, $df=2/72$, $p=0.187$).

Table 3 shows the results of multivariate GLM analysis with the immune-inflammatory and oxidative biomarkers as dependent variables and diagnosis, tobacco use and sex as explanatory variables. We found significant multivariate effects of diagnosis, sex and tobacco use on the 6 biomarkers. Tests for between-subject effects showed significant associations between diagnosis and Hp, IL-6, and MDA, while the sIL-6R and IL-6 x sIL-6R (a surrogate index for IL-6 trans-signaling) were associated with tobacco use. There was a trend towards lowered PON1 values in PD as compared to controls ($F=3.91$, $df=1/74$, $p=0.052$). The same Table shows also estimated marginal mean (SE) values of the significant biomarkers. Hp, IL-6, and MDA were significantly higher in PD patients than in healthy controls, whereas there was a trend towards lower PON1 values in

Table 1. Socio-demographic, clinical and inflammatory, oxidative stress biomarkers data in patients with Parkinson's disease (PD) and normal controls.

Variables	Controls	PD	F	df	p
Age (years)	69.70 (± 8.76)	70.34 (± 8.86)	0.14	1/108	0.706
Sex (M/F)	24/30	27/29	0.16	1	0.692
Tobacco use (Y/N)	42/12	43/13	0.02	1	0.902
BMI (Kg/m ²)	27.56 (± 4.97)	26.90 (± 5.06)	0.49	1/108	0.487
Hp (g/L)	1.20 (± 0.43)	1.58 (± 0.54)	16.47	1/105	<0.001
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	12.61 (± 4.25)	15.71 (± 11.88)	3.24	1/105	0.075
IL-6 (pg/mL)	3.41 (± 2.93)	4.13 (± 3.09)	1.10	1/79	0.297
sIL-6R (pg/mL)	32120.99 (± 10081.60)	31130.48 (± 8283.61)	0.25	1/85	0.618
Fe ($\mu\text{g/dL}$)*	97.85 (± 24.27)	89.82 (± 29.99)	3.63	1/108	0.059
Ferritin (ng/mL)*	137.13 (± 92.56)	188.05 (± 134.95)	5.48	1/108	0.021
TIBC ($\mu\text{g/dL}$)	298.02 (± 54.19)	295.18 (± 44.95)	0.09	1/108	0.765
Tf (g/L)	2.30 (± 0.34)	2.23 (± 0.30)	1.29	1/105	0.258
sTfR ($\mu\text{g/mL}$)	0.75 (± 0.13)	0.83 (± 0.21)	3.26	1/85	0.075
MDA ($\mu\text{M/mg pt}$)*	168.1 (± 18.3)	210.6 (± 27.5)	138.97	1/107	<0.001
PON1 (U/mL)	229.9 (± 68.6)	210.5 (± 67.1)	2.50	1/104	0.117

Results are means (\pm SD). M: male; F: female; Y: yes; N: no; BMI: body mass index; Hp: haptoglobin; Hcy: homocysteine; IL-6: interleukin 6; sIL-6R: soluble IL-6 receptor subunit alpha; Fe: iron; TIBC: total iron binding capacity; Tf: transferrin; sTfR: soluble Tf receptor; MDA: malondialdehyde; pt: protein; PON1: paraoxonase 1. *These data were processed in Ln transformation.

Table 2. Result of multivariate analysis with the iron metabolism data as dependent variables and diagnosis Parkinson's disease (PD) and sex as explanatory variables.

Analyses	Dependent Variables	Significant Explanatory Variables	F	df	P
Multivariate	Fe, Tf, TIBC, Ln sTfR, Ln ferritin	Diagnosis	5.12	5/79	<0.001
		Sex	2.94	5/79	0.018
Between subject effects	Tf	Diagnosis	4.30	1/83	0.041
	Ln sTfR	Diagnosis	6.52	1/83	0.012
	Ln Ferritin	Diagnosis	7.30	1/83	0.008
		Sex	4.36	1/83	0.040

Fe: iron, Tf: transferrin, TIBC: total iron binding capacity; sTfR: soluble Tf receptor. Diagnosis: entered as PD versus controls.

Estimated Marginal Means (SE).

	Controls	PD
Tf (g/L)	2.36 (0.54)	2.22 (0.04)
sTfR (ng/mL)	0.76 (0.03)	0.84 (0.02)
Ferritin (ng/mL)	126.4 (19.5)	189.0 (15.7)

Tf: transferrin, sTfR: soluble Tf receptor.

Table 3. Results of multivariate GLM analysis with the 6 immune-inflammatory and oxidative biomarkers as dependent variables and diagnosis (Parkinson's disease versus controls), tobacco use (TU) and sex as explanatory variables.

Analysis	Dependent Variables	Significant Explanatory Variables	F	df	P
Multivariate	Ln IL-6, Ln sIL-6R, Ln IL6xsIL6R, Hp, PON1, Ln MDA	Diagnosis	23.77	5/70	<0.001
		TU	3.90	5/70	0.004
		Sex	3.66	5/70	0.005
Between subject effects	Hp	Diagnosis	16.30	1/74	<0.001
		Sex	10.52	1/74	0.002
	Ln IL-6	Diagnosis	5.02	1/74	0.028
	Ln MDA	Diagnosis	103.93	1/74	<0.001
	Ln sIL-6R	TU	13.33	1/74	<0.001
	Ln IL6xsIL6R	TU	5.91	1/74	0.017

IL-6: interleukin 6; sIL-6R: soluble IL-6 receptor subunit alpha; Ln IL6xsIL6R: IL-6 trans-signalling; Hp: haptoglobin; PON1: Paraoxonase 1; MDA: malondialdehyde; pt: protein.

Estimated Marginal Means (SE).

	Controls	PD
Hp (g/L)	1.18 (0.09)	1.62 (0.08)
IL-6 (pg/mL)	3.46 (0.55)	4.39 (0.44)
MDA (μM/mg pt)	166.4 (5.01)	211.3 (4.1)
PON1 (U/mL)	227.0 (12.2)	198.8 (9.7)

Hp: haptoglobin; IL-6: interleukin 6; MDA: malondialdehyde; pt: protein; PON1: Paraoxonase 1.

PD. Forced entry of other possible independent variables showed that these variables were not significant and did not change the impact of diagnosis on the biomarkers: age ($F=0.72$, $df=5/69$, $p=0.608$), BMI ($F=1.37$, $df=5/69$, $p=0.248$), education ($F=1.45$, $df=5/69$, $p=0.219$), alcohol use ($F=1.38$, $df=5/69$, $p=0.244$), ethnicity ($F=1.17$, $df=15/207$, $p=0.298$), and use of medication, including levodopa ($F=2.08$, $df=5/69$, $p=0.078$), amantadine ($F=0.93$, $df=5/69$, $p=0.470$), pramipexole ($F=1.64$, $df=5/69$, $p=0.162$), biperiden ($F=0.22$, $df=5/69$, $p=0.954$), entacapone ($F=1.07$, $df=5/69$, $p=0.383$) and levodopa + benserazide ($F=1.08$, $df=5/69$, $p=0.377$).

In order to delineate the most significant biomarker risk factors for PD we carried out a stepwise automatic binary regression analysis with PD as dependent variable (and controls as reference group) and all the biomarkers and socio-demographic data shown in Table 1 as independent variables. Table 4 shows the results of this stepwise automatic binary logistic regression analysis. We found that 4 variables significantly ($X^2=71.15$, $df=4$, $p<0.001$) increased risk towards PD, namely MDA, sTfR, ferritin and Hp. 90.7% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 92.3% and a specificity of 88.2% (Nagelkerke=0.762).

In order to examine the effects of immune-inflammatory and oxidative biomarkers on Fe metabolism variables we carried out a multivariate GLM analysis with the 5 Fe metabolism variables as dependent variables and the biomarkers and sex as explanatory variables (Table 5). We found that 3 biomarkers had significant multivariate effects together with sex on the 5 Fe metabolism variables, namely Hp, PON1 and MDA. Tests for between subject effects showed that Fe levels were significantly predicted by Hp (inversely) and PON1 (positively); TIBC was predicted by PON1 (positively); Tf was associated with PON1 (positively) and sex; sTfR levels were predicted by MDA (positively) and sex; and ferritin was predicted by MDA (positively) and sex.

4. DISCUSSION

Our first major finding is the significant association between PD diagnosis and three Fe metabolism variables (Tf, sTfR and ferritin levels) observed when controlling the data for sex and other putative explanatory variables, including BMI, drug state of the patients, tobacco use, etc. PD patients showed increased ferritin and sTfR and decreased Tf levels. Intracellular free Fe levels are modulated by serum ferritin,

the main Fe storage protein in the body. However, since ferritin is an acute-phase protein and is elevated in response to inflammation and/or a variety of diseases, sTfR is considered to provide a better estimate of body Fe over a wide range of normal and altered Fe stores [41]. Increased sTfR and decreased transferrin observed in PD patients indicate Fe dysregulation and corroborate studies that reported significant associations between PD and ferritin [31] or Tf [25, 32].

This study found significantly increased inflammatory (Hp and IL-6) and oxidative stress (MDA) biomarkers in PD, and a trend towards lowered levels of PON1 after controlling the data for sex, tobacco use and the drug state of the patients [42, 43]. These results corroborate those of previous studies [9, 15-18, 25, 38, 39, 44]; moreover they are in accordance with our a priori hypothesis because increased Hp and IL-6 indicate an inflammatory response, while the increased MDA levels indicate oxidative damage by lipid peroxidation.

Reduced PON1 total activity in PD was also described by [31]. The lowered PON1 levels may be explained by different processes that are co-occurring in PD patients. First, this enzyme is considered a negative acute-phase protein which hepatic synthesis is inhibited by inflammatory responses [45]. Secondly, PON1 activity is affected by oxidative stress and there is an inverse relationship between lipid peroxidation and PON1 [46]. Thirdly, lowered PON1 activity may cause a lowered anti-inflammatory potential [47] leading to inflammation and oxidative stress.

Our results of binary logistic regression analysis show that a combination of MDA, sTfR, Hp and ferritin allowed a correct classification of 91% of the patients with a specificity of 88.2%. These findings support the concept that blood biomarkers can be used to externally validate the clinical diagnosis of PD.

Our study also examined the effects of inflammatory and oxidative stress markers on the Fe metabolism markers and showed a strong association between inflammation and oxidative stress and systemic Fe metabolism in PD. Fe levels were negatively associated with Hp and positively with PON1 corroborating hypoferrinemia as a common response to systemic inflammatory disorders [27, 48]. In addition, some studies have indicated that the blood Hp phenotype Hp2-1 is a contributor to Fe levels abnormalities in PD [34, 35]. TIBC and Tf were positively associated with PON 1, probably as function of an inflammatory effect in PD that has influence on Fe metabolism. Ferritin and sTfR levels were positively

Table 4. Results of stepwise automatic binary logistic regression analysis with Parkinson's disease as dependent variable and controls as reference group.

Significant Explanatory Variables	Wald	df	p	Odds Ratio	CI 95%
MDA	16.35	1	<0.001	1.10	1.05 - 1.15
sTfR	5.97	1	0.015	1.87	1.12 - 3.10
Hp	7.81	1	0.005	1.38	1.10 - 1.74
Ferritin	6.08	1	0.014	1.01	1.00 - 1.02

MDA: malondialdehyde; sTfR: soluble transferrin receptor; Hp: haptoglobin. CI 95%: 95% confidence intervals with lower and upper limits.

Table 5. Results of multivariate GLM analysis with the iron metabolism variables as dependent variables and the immune-inflammatory and oxidative biomarkers as explanatory variables.

Analysis	Dependent Variables	Explanatory Variables	F	df	P
Multivariate	Fe, TIBC, Tf, Ln sTfR, Ln ferritin	Hp	2.66	5/77	0.034
		PON1	3.44	5/77	0.007
		MDA	2.97	5/77	0.017
		Sex	3.10	5/77	0.013
Between subject effects	Fe	Hp (-)	9.69	1/81	0.003
		PON1 (+)	7.86	1/81	0.006
	TIBC	PON1 (+)	8.48	1/81	0.005
		Tf	PON1 (+)	12.01	1/81
	Ln sTfR	Sex (F>M)	4.14	1/81	0.045
		MDA (+)	4.52	1/81	0.037
	Ln ferritin	Sex (F>M)	4.08	1/81	0.047
		MDA (+)	4.12	1/81	0.046
	Sex (M>F)	5.50	1/81	0.021	

Fe: iron; TIBC: total iron binding capacity; Tf: transferrin, sTfR: soluble Tf receptor; PON1: Paraoxonase 1; MDA: malondialdehyde; Hp: haptoglobin; F: female; M: male (+): indicates a positive association; (-): indicates a negative association.

associated with MDA which may be a homeostatic attempt to reduce Fe availability after its release from cells that were oxidatively damaged. As a matter of fact, ferritin is described to be correlated with biomarkers of cell damage and with the presence and/or severity of numerous diseases [41].

A first limitation of the study is that all biomarkers evaluated here are not specific to PD because they may be detected in other medical and neurological disorders. Nevertheless, it may be that a combination of different markers is specific. Future research should examine these biomarkers in different medical disorders, including PD, multiple sclerosis, bipolar disorder, in order to delineate a more specific biomarker combination. Secondly, this is a case-control study and therefore we cannot draw firm conclusions on causality. Thus, we cannot conclude whether changes in the biomarkers are associated with the onset of PD or are secondary to ongoing toxic events in the brain or periphery. Future research should examine a prospective study delineating these biomarkers at the onset of disorder and during later stages of the disorder.

CONCLUSION

In conclusion, our study indicates a state of systemic inflammation and oxidative stress, which is accompanied by alterations in Fe metabolism, in patients with PD. We hypothesize that systemic IL-6 induces the liver towards an increased production of Hp, ferritin and sTfR and a lower production of PON1. Increased serum MDA levels indicate that lipid peroxidation may be associated with this metabolic imbalance. The understanding of the nature of the chronic

inflammatory responses and increased lipid peroxidation in PD and their association with Fe metabolism offers insights into the pathophysiology of PD and may indicate new drug targets in that disorder.

LIST OF ABBREVIATIONS

BMI	=	Body Mass Index
Fe	=	Iron
Hcy	=	Homocysteine
Hp	=	Haptoglobin
IL-6	=	Interleukin 6
IL6/sIL-6R	=	IL-6 Trans-Signaling
MDA	=	Malondialdehyde
PD	=	Parkinson's Disease
PON1	=	Paraoxonase 1
sIL-6	=	Soluble IL-6 Receptor
sTfR	=	Soluble Transferrin Receptor (sTfR)
Tf	=	Transferrin
TIBC	=	Total Iron Binding Capacity

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

C.C.F. was supported by a doctorate fellowship from CAPES. D.S.B. receives senior research fellowship from Fundação Araucária. M.M. is supported by a CNPq PVE fellowship at the Health Sciences Graduation Program.

REFERENCES

- Dexter DT, Jenner P. Parkinson's disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 132-44.
- Su X, Federoff HJ. Immune responses in Parkinson's disease: Interplay between central and peripheral immune systems. *Biomed Res Int* 2014; 2014.
- Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: Interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. *Mol Neurobiol* 2014; 49: 771-83.
- Miller DB, O'Callaghan JP. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism* 2015; 64: S40-6.
- Song I-U, Chung S-W, Kim J-S, Lee K-S. Association between high-sensitivity C-reactive protein and risk of early idiopathic Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2011; 32: 31-4.
- Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From biomarkers to anti-inflammatory based therapies. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 628192.
- Reale M, Iarlori C, Thomas A, et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 55-63.
- Fenari CC, Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis* 2011; 2011: 436813.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett* 2008; 441: 158-62.
- Brook M, Trenkmann M, Gay RE, Gay S, Speich R, Huber LC. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes. *J Biol Chem* 2011; 286: 40142-50.
- Silveira PAS, Schwegler E, Montagner P, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows. *Vet J* 2015; 205: 101-3.
- Rose-John S. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 1237-47.
- Hofmann KW, Schuh AFS, Saute J, et al. Interleukin-6 serum levels in patients with parkinson's disease. *Neurochem Res* 2009; 34: 1401-4.
- Da Silva DJ, Borges AF, Souza PO, et al. Decreased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 7/8-induced cytokines in Parkinson's disease patients. *Neuroimmunomodulation* 2016; 23: 58-66.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 90-5.
- Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010; 468: 56-8.
- Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-Motor symptoms in patients with parkinson's disease- correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One* 2012; 7.
- Tang P, Chong L, Li X, et al. Correlation between serum RANTES levels and the severity of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014.
- Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2015; 283: 50-7.
- Teunissen CE, Lütjohann D, Von Bergmann K, et al. Combination of serum markers related to several mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 893-902.
- Logroscino G, Marder K, Graziano J, et al. Dietary iron, animal fats, and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13 (Suppl 1): 13-6.
- Morris CM, Candy JM, Omar S, Bloxham CA, Edwardson JA. Transferrin receptors in the Parkinsonian midbrain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 468-72.
- Faucheux BA, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. The density of [125I]-transferrin binding sites on perikarya of melanized neurons of the substantia nigra is decreased in Parkinson's disease. *Brain Res* 1997; 749: 170-4.
- Pichler I, Del Greco M F, Gögele M, et al. Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: A Mendelian randomization study. *PLoS Med* 2013; 10: e1001462.
- Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, et al. Iron and oxidative stress in Parkinson's disease: An observational study of injury biomarkers. *PLoS One* 2016; 11: 1-12.
- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-3.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1271-6.
- Mariani S, Ventriglia M, Simonelli I, et al. Fe and Cu do not differ in Parkinson's disease: A replication study plus meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 632-3.
- Farhoudi M, Taheraghdam A, Farid GA, et al. Serum iron and ferritin level in idiopathic Parkinson. *Pakistan J Biol Sci* 2012; 15: 1094-7.
- Madenci G, Bilen S, Arli B, Saka M, Ak F. Serum iron, vitamin B12 and folic acid levels in parkinson's disease. *Neurochem Res* 2012; 37: 1436-41.
- Ikeda K, Nakamura Y, Kiyozuka T, et al. Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: Changes linked to disease progression. *Neurodegener Dis* 2011; 8: 252-8.
- Hu Y, Yu SY, Zuo LJ, et al. Investigation on abnormal iron metabolism and related inflammation in Parkinson disease patients with probable RBD. *PLoS One* 2015; 10: 1-13.
- Alberio T, Bucci EM, Natale M, et al. Parkinson's disease plasma biomarkers: An automated literature analysis followed by experimental validation. *J Proteomics* 2013; 90: 107-14.
- Costa-Mallen P, Zabetian CP, Agarwal P, et al. Haptoglobin phenotype modifies serum iron levels and the effect of smoking on Parkinson disease risk. *Park Relat Disord* 2015; 21: 1087-92.
- Delanghe JR, Buyzere ML De, Speeckaert MM, Langlois MR. Parkinsonism and related disorders Haptoglobin phenotype and Parkinson disease risk. *Park Relat Disord* 2016; 22: 108-9.
- Siniscalchi A, Mancuso F, Gallelli L, Ibbadu GF, Mercuri NB, De Saro G. Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients. *Pharmacol Res* 2005; 52: 367-75.
- Helane Doherty G. Homocysteine and Parkinson's disease: A complex relationship. *J Neurol Disord* 2013; 01: 1-9.
- Hu X-W, Qin S-M, Li D, Hu L-F, Liu C-F. Elevated homocysteine levels in levodopa-treated idiopathic Parkinson's disease: A meta-analysis. *Acta Neurol Scand* 2013; 128: 73-82.
- Bastos AS, Loureiro APDM, Oliveira TF De, et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem* 2012; 423: 141-6.

- [40] Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1: 147-52.
- [41] Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics* 2014; 6: 748-73.
- [42] Kumudini N, Uma A, Prameela Devi Y, *et al.* Association of Parkinson's disease with altered serum levels of lead and transition metals among South Indian subjects. *Indian J Biochem Biophys* 2014; 51: 121-6.
- [43] Song I-U, Kim Y-D, Chung S-W, Cho H-J. Association between serum haptoglobin and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Intern Med* 2015; 54: 453-7.
- [44] de Farias CC, Maes M, Bonifácio KL, *et al.* Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. *Neurosci Lett* 2016; 617: 66-71.
- [45] Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998; 139: 307-15.
- [46] Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1304-16.
- [47] Brinholi FF, Noto C, Maes M, *et al.* Lowered paraoxonase 1 (PON1) activity is associated with increased cytokine levels in drug naïve first episode psychosis. *Schizophr Res* 2015; 166: 225-30.
- [48] Bionaz M, Trevisi E, Calamari L, Librandi F, Ferrari a, Bertoni G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1740-50.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

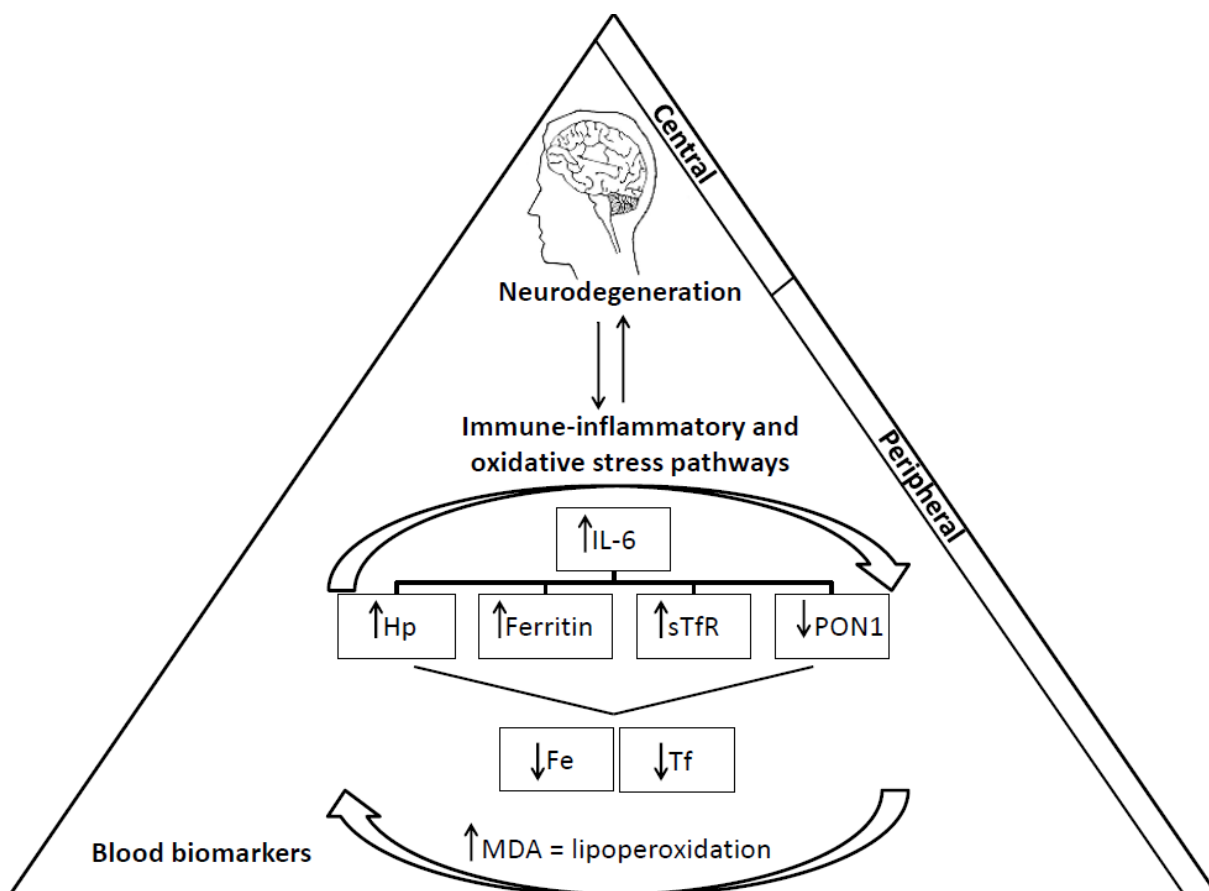
O diagnóstico da DP é essencialmente clínico, no entanto alterações metabólicas decorrentes da doença podem ser encontradas não só no cérebro destes pacientes como também sistemicamente. Até o momento, não são utilizados biomarcadores para o auxílio no diagnóstico, identificação da progressão da doença ou acompanhamento farmacológico, fato que está muito relacionado à variabilidade de alterações metabólicas e também à dificuldade pela presença de uma fase pré-motora e motora da DP.

Com a finalidade de identificarmos biomarcadores associados com a DP e entendermos melhor a inter-relação entre o processo inflamatório, EO e metabolismo de Fe escolhemos biomarcadores sanguíneos que pudessem estar relacionados às alterações metabólicas da DP descritas na literatura previamente. Utilizamos a escala de estadiamento da DP no intuito de identificarmos variações nos níveis de biomarcadores nos diferentes estágios da doença.

Nossos achados propõem que o MDA plasmático é um biomarcador de doença altamente associado, enquanto que LOOH e atividade da SOD plasmática podem servir como biomarcadores de estadiamento da DP. Além disso, encontramos um estado de inflamação sistêmica e de EO, que é acompanhado por alterações no metabolismo do Fe nos pacientes com DP. Isto leva a hipotetizamos que a IL-6 sistêmica induz o fígado a aumento da produção de Hp, ferritina e Rstf e menor produção de PON 1. O aumento dos níveis séricos de MDA indicam que a peroxidação lipídica pode estar associada a este desequilíbrio metabólico (figura 1).

Isso sugere que depois de feito o diagnóstico clínico, esses biomarcadores podem ser úteis para informar sobre a fisiopatologia da doença e para monitorar possíveis intervenções terapêuticas na tentativa de alterar a progressão da DP. Assim como novos alvos para o tratamento da DP pode ser investigados.

Figura 1- Biomarcadores sanguíneos na DP indicam um estado de inflamação sistêmica e EO em pacientes com DP, juntamente com alterações no metabolismo do Fe.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. et al. 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. et al. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's: Role of the L-dopa. **The Journal of Neuroscience**,v. 240, p. 31-6, 2006.

AHMED, I. et al. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. **Movement Disorders**, v.27, n.9, p.1104-10, 2012.

ALMEIDA, I.A. et al. Efeito imediato da fisioterapia na marcha em indivíduos com doença de Parkinson. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 247-253, maio/ago. 2015.

ANDRADE, L.A.F. **O tratamento cirúrgico da doença de Parkinson**. In: CARDOSO, et al. Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento. 1ed. São Paulo, Editora Omnifarma, 2010.

ANDERSON, G.; MAES, M. Neurodegeneration in Parkinson's Disease: Interactions of Oxidative Stress, Tryptophan Catabolites and Depression with Mitochondria and Sirtuins. **Molecular Neurobiology**. v.49, n.2, p.771-783, abr. 2014.

ANDICAN, G. et al. Plasma oxidative and inflammatory markers in patients with idiopathic Parkinson's disease. **Acta neurologica belgica**, v. 112, n.2, p.155-9, 2012.

APOSTOLAKIS, S.; KYPRAIOU, A.M. Iron in neurodegenerative disorders: being in the wrong place at the wrong time? **Reviews in the neurosciences**, v.28, n.8, p. 893-911, 2017.

BASTOS, A.S. et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**,v. 423, p.141-146, 2012.

BLANDINI, F. et al. Plasma homocysteine and l dopa metabolism in patients with Parkinson disease. **Clinical Chemistry**. v. 47, n.6, p.1102-1104, 2001.

BOGDANOV, M. et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain**, v.13, p.389-396, 2008.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A.C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (São Paulo)**, v.14, n.3, p.7-9, jul-set. 2016.

BRASIL, 2017. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença de Parkinson. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/14/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-de-Parkinson.pdf>> Acesso em: 11/01/2018.

BROCK, M. et al. MicroRNA-18a Enhances the Interleukin-6-mediated Production of the Acute-phase Proteins Fibrinogen and Haptoglobin in Human Hepatocytes. **The journal of biological chemistry**, v. 286, n.46, p. 40142-40150, Nov. 2011.

CACABELOS, R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. International. **Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.3, p.551, mar. 2017.

CHAO, Y.; WONG, S.C.; TAN, E.K. Evidence of Inflammatory System Involvement in Parkinson's Disease. **BioMed Research International**, p.1-9, 2014.

CHOI, J. et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 10816-24, 2006.

COSTA-MALLEN, P. et al. Haptoglobin phenotype modifies serum iron levels and the effect of smoking on Parkinson disease risk. **Parkinsonism and related disorders**, v.21, n.9, p.1087-1092, 2015.

DEXTER, T.D.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v.62, p. 132-144, set. 2013.

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.

FARHOUDI, M. et al. Serum iron and ferritin level in idiopathic Parkinson. **Pakistan journal of biological sciences**. v.15, n.22, p. 1094-7, 2012.

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.

FRIEDLICH, A. L. et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **The Open Pathology Journal**, v.3, p.38-42, 2009.

HENCHCLIFFE, C. Blood and cerebrospinal fluid markers in Parkinson's disease: current biomarker findings. **Current Biomarker Findings**, v.5, p.1-11, 2015.

HU XW.; Q.I.N S.M.; LI D.; HU LF.; LIU CF. Elevated homocysteine levels in levodopa-treated idiopathic Parkinson's disease:a meta-analysis. **Acta Neurologica Scandinavica**. v.128, n.2, p.73-82, 2013.

HU, Y. et al. Investigation on Abnormal Iron Metabolism and Related Inflammation in Parkinson Disease Patients with Probable RBD. **PLOS ONE**, v.10, n.10, 2015.

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.

IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/12/em-10-anos-cresce-numero-de-idosos-no-brasil>>. Acesso em: 10/01/18.

IKEDA, K. et al. 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 Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p. 853-856, 1991.

JOHNSON, E.E; Wessling-Resnick, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes and Infection**. v.14, n.3, p. 207-216, mar. 2012.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, p. 91-104, 2010.

JONES, S.A. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. **The FASEB Journal**, v.15, 2001.

JOSHI, N.; SINGH, S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. **Journal of Neuroscience Research**, v.96, p.379-390, 2018.

KAUR, K. et al. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 381, p.308-314, 2017.

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.

MEDEIROS, M.S. et al. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers. **PLoS ONE**, v. 11, n.1, 2016.

MIGLIORE, L. et al. 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.

MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.64, n.3, p. 40-46, mar. 2015.

MOSLEY, L.R. et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, 261-281, 2006.

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

- NIKAM, S. et al. 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.
- PICHLER, I. et al. Serum Iron Levels and the Risk of Parkinson Disease: A Mendelian Randomization Study. **PLOS Medicine**, v. 10, n.6, Jun. 2013.
- POETINI, M.R. et al. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 177-186, jan. 2018.
- REPETTO, M. et al. 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.
- ROCHA, N.P.; DE MIRANDA, A.S.; TEIXEIRA, A.L. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. **BioMed Research International**, 2015.
- SANTOS, S.M. et al. Balance versus resistance training on postural control in patients with Parkinson's disease: a randomized controlled trial. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine**, v.53, n.2, p.173-83, Apr. 2017.
- SHARMA, A. et al. 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, C. et al. Non-Motor Symptom Burdens Are Not Associated with Iron Accumulation in Early Parkinson's Disease: a Quantitative Susceptibility Mapping Study. **Journal of Korean Medical Science**. v.33, n.13, Mar. 2018.

SINGH, N. et al. Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms To Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.21, n.3, p. 471-484, 2014.

SU, X.; Federoff, H.J. Immune Responses in Parkinson's Disease: Interplay between Central and Peripheral Immune Systems. **BioMed Research International**, 2014.

TEIVE, A.G.H. **Etiopatogenia da doença de Parkinson**. In: MENEZES, M.S e TEIVE, H.A.G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2003.

TRAGER, U.; TABRIZI, S.J. Peripheral inflammation in neurodegeneration. **Journal of Molecular Medicine**. v.91, n.6, p.673-681, Jun. 2013.

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 Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**. v.4, n.19, 2015.

WARD, R.J. et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **The lancet neurology**, v. 13, 2014.

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.

YU, S.Y. et al. Clinical features and dysfunctions of iron metabolism in Parkinson disease patients with hyper echogenicity in substantia nigra: a cross-sectional study. **BMC neurology**, v.18, n.9, 2018.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer consubstanciado do CEP/UEL 222/2011



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.

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

ANEXO B- Parecer consubstanciado do CEP/Uel 038/2014



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 5231

Parecer CEP/Uel:	038/2014
CAAE:	26325814.6.0000.5231
Data da Relatoria:	03/07/2014
Pesquisador(a):	Carine Coneglian de Farias
Unidade/Órgão:	CCS – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA DE PARKINSON SEGUNDO A ESCALA DE HOEHN E YARHR CORRELACIONANDO ESQUEMA TERAPÊUTICO COM MARCADORES BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE."

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, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 04 de julho de 2014.

Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini
 Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina



ANEXO C- Diagnóstico 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

APÊNDICES

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido**Pesquisa:**

Avaliação da progressão da doença de Parkinson segundo a escala de Hoehn e Yahr correlacionando esquema terapêutico com marcadores bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo.

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa “Avaliação da progressão da doença de Parkinson segundo a escala de Hoehn e Yahr correlacionando esquema terapêutico com marcadores bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo”, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar pacientes com DP nos estágios 1 a 5, segundo a escala de Hoehn e Yahr em seus diferentes esquemas terapêuticos quantificando marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo, inflamatórios e genéticos buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença assim como também em pacientes sem essa patologia. A sua participação é muito importante e ela se daria pela doação de 36 mL de sangue por punção venosa (12 mL de sangue com EDTA, 20 mL de soro e 4 mL 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 se os marcadores bioquímicos, de estresse oxidativo, inflamatórios e genéticos propostos são interessantes no sentido de verificar se algum deles pode contribuir no acompanhamento tanto na terapêutica como na evolução da doença de Parkinson.

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), Biomédica Carine Coneglian de Farias ((43) 9678-8444)), 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 2016.

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: _____

APÊNDICE B- Questionário para coleta de dados sócio-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. Prática 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?** _____

APÊNDICE C- 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

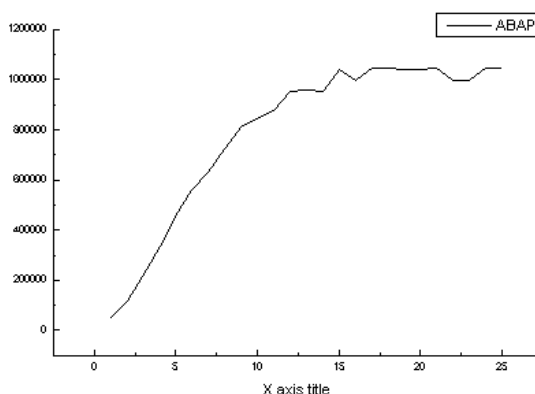
Curva ABAP

Tampão Glicina _____ 171μL

Luminol _____ 9,5μL

ABAP _____ 9,5μL

Homogeneizar bem.



Curva Trolox (fazer pelo menos em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171μL

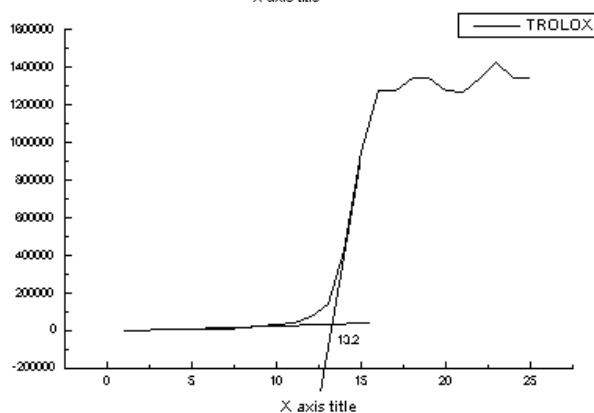
Luminol _____ 9,5μL

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), $\tau_{amostra}$, é o tempo de indução da amostra e τ_{Trolox} , é o tempo de indução provocada pela adição de 1 μ M Trolox. Os resultados foram expressos em μ M Trolox.

APÊNDICE D- Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (LOOH- FOX)**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 xylene 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:

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

APÊNDICE E- Determinação de hidroperóxidos por quimiluminescência (LOOH-QL)

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^o 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 1^o valor, calcular a média dos tubos brancos, desprezando o 1^o valor também
 - Diminuir a média dos tubos brancos dos tubos estimulados correspondentes
 - Calcular a média das 12 leituras.
- O resultado é expresso em com.

APÊNDICE F - 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 22 μ L 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 5 μ L da solução diluída de MDA em 1495 μ L 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 \rightarrow 15%)

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

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

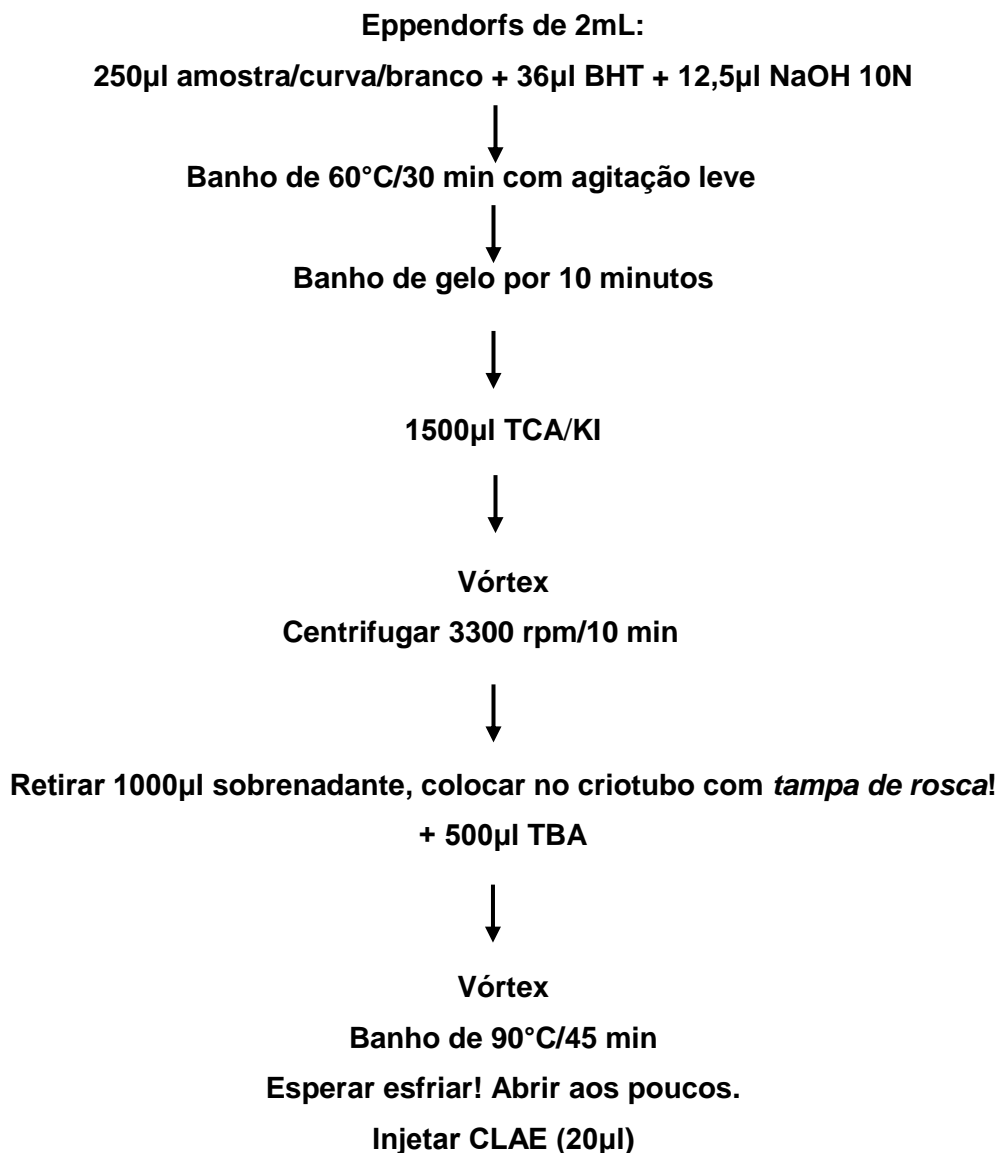
Obtida a concentração real da solução diluída de MDA, calcular as diluições necessárias para obter as concentrações de 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 1,5; 2,00. Manter o volume final de 250 μ L.

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 250 μ L 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 5µm, 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 µmol de MDA/mg de proteínas.

APÊNDICE G- Determinação de subprodutos do óxido nítrico (NO_x)**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 NaNO_2 100mM (Synth[®], Brasil)

69,00mg _____ 10mL H_2O destilada

Pesar 69mg de NaNO_2 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-naphthylethylenediaminedihydrochoride (NEDD)

(Sigma Aldrich[®], EUA)

200mg NEDD _____ 100mL H_2O 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.

Desproteíntização

Adicionar, em eppendorf, em triplicata, 60 μL de amostra + 60 μL de 75mmol/L ZnSO_4 ;

Agitar 30sec no vórtex;

Centrifugar por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente;

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

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

Centrifugar por 5min a 10000rpm a temperatura ambiente;

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

Adicionar 50 μL 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 H_2SO_4 100mmol/L

Em capela, lavar os grânulos que serão utilizados com H_2O destilada 3 vezes (com auxílio de um béquer e uma peneira)

Colocar a solução de CuSO_4 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 H_2SO_4 .

Os grânulos que ficarem pretos mesmo após serem lavados com H_2SO_4 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 100 μL 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: Concentração= fator x leitura da amostra

APÊNDICE H- 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, subtraída 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.

APÊNDICE I- 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).

APÊNDICE J- Determinação do grupamento sulfidril (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 μM/mg Pt.

APÊNDICE K- 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

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

Onde:

ϵ → 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®, µClear®, 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