



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIO BAENA DE MELO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, DE
ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DA PERCEPÇÃO
OLFATIVA EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE
PARKINSON**

Londrina
2021

LUCIO BAENA DE MELO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, DE
ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DA PERCEPÇÃO
OLFATIVA EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE
PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2021

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

M528 Melo, Lucio Baena de .
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DA PERCEPÇÃO OLFATIVA EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE PARKINSON / Lucio Baena de Melo. - Londrina, 2021.
62 f. : il.

Orientador: Decio Sabbatini Barbosa.
Coorientador: Marco Aurelio Fornazieri.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson - Tese. 2. Olfato - Tese. 3. Estresse Oxidativo e Nitrosativo - Tese. I. Barbosa, Decio Sabbatini. II. Fornazieri, Marco Aurelio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 61

LUCIO BAENA DE MELO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, DE
ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E DA PERCEPÇÃO
OLFATIVA EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE
PARKINSON**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª. Dra. Carine Coneglian de Farias
Instituto Federal do Espírito Santo –
IFES Via Velha

Londrina, 12 de fevereiro de 2021.

AGRADECIMENTOS

A Ele que no princípio era o Verbo, que criou todas as coisas e que, sem Ele, nada do que foi feito se fez

A meus queridos pais e irmãos que me deram a base do que sou e um norte a buscar.

A minha UEL. Escola amada a que tudo devo e por onde passei e passo os melhores anos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Decio Sabbatini Barbosa, grande timoneiro desse barco que é a nossa Universidade. Obrigado por sua infinita paciência para com este aprendiz e pelo seu zelo para com a nossa veneranda instituição.

A meus amigos Dr. Thiago Hissnauer Leal Baltus e Dra. Nayara Rampazzo Morelli. Amigos mais que especiais e inesquecíveis que a UEL me deu. Minha sempiterna gratidão.

Aos colegas do Setor de Neurologia Clínica do Departamento de Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde da UEL: Prof. Dr. Luís Sidônio Teixeira da Silva. Prof^a. Dra. Mônica Marcos de Souza e Prof^a. Ms. Aline Vitali da Silva Antonucci, mestres que elevam o bom nome da Neurologia-UEL.

Aos neurologistas Icaro Bertechini Soler Lopes, Maria Caroline Martins de Araújo, Milena Gerke Sampaio e Taimara Zimath pelo apoio na aquisição dos dados clínico-laboratoriais.

Às funcionárias e pós-graduandas do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL (LPG) pelo seu incomensurável trabalho no processamento laboratorial.

Aos pacientes que depositam confiança em nosso trabalho: a eles nossos esforços na tentativa de minimizar os revezes da vida.

À Laura e Alexandre, meus amados filhos, vocês me tornam um ser humano melhor.

E à Fernanda, um oásis no deserto de minha vida.

Melo, Lucio Baena de. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos, de estresse oxidativo/nitrosativo e da percepção olfativa em indivíduos com a doença de Parkinson.** 2021. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem de alta prevalência sendo a segunda causa mais comum de doença neurodegenerativa. Esta tem sido descrita com a presença de quatro sinais clínicos motores que caracterizam a doença, a saber: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Sabe-se, todavia, que alguns anos antes dos fenômenos motores clássicos da doença, os pacientes costumam apresentar alterações não motoras, dentre elas, alterações da esfera olfativa (hiposmia em diferentes graus e anosmia). Dentre vários fatores etiológicos, é conhecido o envolvimento do estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN). O objetivo deste estudo foi recrutar pacientes com DP, avaliar sua função olfatória, analisar biomarcadores bioquímicos e de EO/EN com o intuito de se obter possíveis correlações e associações, pois há carência de estudos que averiguem olfato em pacientes com DP e EO/EN concomitantemente. Neste estudo foram avaliados 53 pacientes parkinsonianos acompanhados no Ambulatório de Neurologia, do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O diagnóstico foi realizado seguindo as diretrizes da *Movement Disorders Society* e todos os pacientes se encontravam em escala 2 de Hoehn-Yahr. Os pacientes foram submetidos a teste de avaliação de função olfatória (UPSIT) e à coleta de amostra de sangue para a avaliação dos seguintes biomarcadores bioquímicos e do EO/EN: colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicérides (TAG), ácido úrico (AU), hidroxiperoxídeos lipídicos (LOOH), capacidade antioxidante total do plasma (TRAP), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), grupamentos sulfidril (SH), metabólitos do óxido nítrico (NOx) e atividade da paraoxonase 1 (PON-1). O grupo controle consistiu em 22 indivíduos não portadores de DP que realizaram as mesmas avaliações. Em nosso estudo todos os portadores de DP apresentaram alterações olfatórias. Biomarcadores bioquímicos (TAG e AU) e os biomarcadores de perfil antioxidante (SH e PON-1) estavam reduzidos no grupo DP assim como LOOH (pro-oxidante) aumentada. No grupo DP verificou-se correlação positiva entre TAG e AOPP, e entre PON-1 e AU. Houve também correlação positiva entre PON-1 e SH, e inversa entre SH e LOOH. Em análise de regressão múltipla observamos associação inversa entre a PON-1 e AOPP. Entre os grupos anosmia e hiposmia verificamos diferença numérica (mas não estatisticamente significativa) em LOOH e PON-1 que sugeriu-nos a possibilidade de que estes marcadores possam estar relacionados ao olfato (pois o grau de acometimento clínico é o mesmo e em tese o EO/EN seria semelhante entre os grupos). É possível que estas alterações de EO/EN tenham papel no bulbo olfatório ocasionando modificações em alfa-sinucleína que culminam em perda de olfato. Não houve alterações estatisticamente significativas nos valores de CT, HDL, LDL, TRAP e NOx. Concluímos que o EO/EN possa ser coparticipante nos mecanismos fisiopatológicos na DP e perda olfatória, embora nosso estudo não

possa certificar o quanto de EO/EN está relacionado especificamente ao olfato, à DP, ou a ambos.

Palavras chaves: doença de Parkinson; estresse oxidativo/nitrosativo; olfato.

Melo, Lucio Baena de. **evaluation of biochemical biomarkers, oxidative / nitrosative stress and olfactive perception in individuals with Parkinson's disease**. 2021. 62 p. Dissertation (Master's degree in Health Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a highly prevalent disorder and is the second most common cause of neurodegenerative disease. This has been described with the presence of four clinical motor signs that characterize the disease, namely: tremor, stiffness, bradykinesia and postural instability. It is known, however, that some years before the classic motor phenomena of the disease, patients usually present non-motor changes, among them, changes in the olfactory function (hyposmia in different degrees and anosmia). Among several etiological factors, the involvement of oxidative/nitrosative stress (OS/NS) is known. The aim of this study was to recruit patients with PD, to evaluate their olfactory function, to analyze biochemical and OS/NS biomarkers to obtain possible correlations and associations. There is a lack of studies that simultaneously investigate smell in patients with PD and OS/NS. In this study, 53 parkinsonian patients monitored at the Neurology Service of the University Hospital of the State University of Londrina were evaluated. The diagnosis was made following the guidelines of the Movement Disorders Society and all patients were on a Hoehn-Yahr scale 2. Patients underwent an olfactory function assessment test (UPSIT) and for evaluation of the following biochemical biomarkers and OS/NS: total cholesterol (CT), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), triacylglycerols (TAG), uric acid (UA), lipid hydroperoxides (LOOH), total plasma antioxidant capacity (TRAP), advanced protein oxidation products (AOPP), sulfhydryl groups (SH), metabolites nitric oxide (NOx) and paraoxonase 1 (PON-1) activity. The control group consisted of 22 individuals without PD who underwent the same assessments. In our study, all PD patients had olfactory changes. Biochemical biomarkers (TAG and AU) and antioxidant profile biomarkers (SH and PON-1) were reduced in the DP group as well as increased LOOH (pro-oxidant). In the DP group, there was a positive correlation between TAG and AOPP, and between PON-1 and AU. There was also a positive correlation between PON-1 and SH, and an inverse correlation between SH and LOOH. In multiple regression analysis, we observed an inverse association between PON-1 and AOPP. Between the anosmia and hyposmia groups, we observed a numerical difference (but not statistically significant) in LOOH and PON-1, which suggested the possibility that these markers may be related to smell (since the degree of clinical involvement is the same and in theory the OS/NS would be similar between groups). It is possible that these OS/NS changes have a role in the olfactory bulb, causing changes in alpha-synuclein that culminate in loss of smell. There were no statistically significant changes in the values of CT, HDL, LDL, TRAP and NOx. We conclude that OS/NS may be co-participant in pathophysiological mechanisms in PD and olfactory loss, although our study cannot certify how much OS/NS is specifically related to smell, PD, or both.

Key words: Parkinson's disease; oxidative/nitrosative stress; smell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Células e bulbo olfatório.....	15
Figura 2 -	Conexões centrais.....	16
Figura 3 -	Teste UPSIT.....	18
Figura 4 -	Células mitrais e alfa-sinucleína.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos dados sócio-demográficos, biomarcadores bioquímicos e de EO/EN em pacientes e controles	35
Tabela 2 - Distribuição de dados clínicos e de biomarcadores entre subgrupo de DP e controles	35
Tabela 3 - Correlação entre biomarcadores bioquímicos e de EO/EN no grupo DP	36
Tabela 4 - Correlações significativas em pacientes com anosmia e grau severo de hiposmia	36
Tabela 5 - Resultados da regressão múltipla no grupo DP (LOOH e PON-1 como variáveis dependentes e AOPP, SH, TAG e AU como variáveis explanatórias).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
AU	Ácido úrico
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
CL	Corpúsculo de Lewy
CT	Colesterol total
DA	Dopamina
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i>
DP	Doença de Parkinson
EM	Estresse nitrosativo
EO	Estresse oxidativo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HDL	Lipoproteína de densidade alta
ICOMT	inibidores da catecol-o-metiltransferase
IDDC	Inibidores da dopamina descarboxilase
IMAOB	Inibidores da monoaminoxidase-B
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MDS	<i>Movement Disorders Society</i>
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
PON-1	Paraoxonase 1
SH	Grupamentos sulfidrila
SNpc	Substância <i>nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triacilgliceróis
TRAP	Capacidade antioxidante total do plasma
UPSIT	<i>University of Pennsylvania Smell Identification Test</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	12
1.2	O OLFATO	14
1.3	ALTERAÇÃO DO OLFATO COMO MANIFESTAÇÃO NÃO MOTORA NA DP	17
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO	18
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO E ALTERAÇÕES DE OLFATO	21
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	24
4.2	DELINEAMENTO DE ESTUDO	24
4.3	CASUÍSTICA	24
4.4	AVALIAÇÃO DE ACUIDADE OLFATÓRIA	25
4.5	COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	26
4.6	BIOMARCADORES DE EO/EN	26
4.6.1	Capacidade antioxidante total do plasma (TRAP)	26
4.6.2	Determinação de hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência (LOOH)	26
4.6.3	Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)	26
4.6.4	Determinação de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)	27
4.6.5	Determinação de grupamentos sulfidril (SH)	27
4.6.6	Determinação da atividade da paraoxonase-1 (PON-1)	27
4.7	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	27
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO (ARTIGO)	28
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS	48
8	ANEXOS	51
8.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
8.2	MDS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE DOENÇA DE PARKINSON E ESCALA DA HOEHN-YAHR MODIFICADA.....	53
8.3	GABARITO DO UPSIT E VALORES DE REFERÊNCIA DE ACORDO COM GRAU DE ACERTO E SEXO	55
9	APÊNDICES	56
9.1	QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM APLICADO NO AMBULATÓRIO.....	57
9.2	QUESTIONÁRIO REALIZADO NOS PACIENTES DA AMOSTRAGEM.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita há 200 anos por James Parkinson, em seu trabalho que descreveu seis pacientes com “paralisia agitante”. Neste estudo pioneiro expôs o que atualmente denominamos “fenômenos motores” da doença (PARKINSON, 1817). Em 1872 o Prof. Jean-Martin Charcot distinguiu a DP em duas variações: uma tremulante e outra rígido-acinética, já mencionando os sinais motores que seriam considerados como manifestações cardinais da doença: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (KALIA; LANG, 2015). Charcot - considerado o “Pai da Neurologia” - foi mais abrangente em suas observações e citou o possível acometimento cognitivo, algo não descrito por James Parkinson. Considera-se que a DP é a segunda doença degenerativa mais frequente que acomete a população (sendo a primeira, a Doença de Alzheimer). A DP é uma degeneração crônica do sistema nervoso central de alta prevalência na idade adulta, afetando 1% da população acima dos 60 anos de idade e 0,3% da população geral em países industrializados (LEES; HARDY; REVESZ, 2009; LEE; GILBERT, 2016). A doença é de aspecto degenerativo e é progressiva. É caracterizada por perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), com consequente redução do neurotransmissor dopamina (DA) no estriado e a presença de inclusões intracitoplasmáticas chamadas corpúsculos de Lewy (CL), que são compostos principalmente formados por alfa-sinucleína e ubiquitina (AGIL *et al.*, 2013). Os CL inicialmente são encontrados nos neurônios do tronco cerebral e nos neurônios do sistema olfatório. Na medida em que a doença progride são encontrados em outras regiões cerebrais como sistema límbico e regiões neocorticais, segundo os postulados de Braak, não isento de críticas (RIETDIJK *et al.*, 2017).

Dos vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DP citamos o envolvimento da alfa-sinucleína, disfunção mitocondrial, o EO/EN e neuroinflamação. A alfa-sinucleína está relacionada desde alterações genéticas que permitem sua agregação e acúmulo, a sua modificação estrutural, um possível caráter de transmissibilidade aos moldes priônicos e a redução do sistema proteolítico permitindo seu acúmulo (POEWE *et al.*, 2017). Há um ciclo vicioso entre

a agregação de alfa-sinucleína e a disfunção mitocondrial. O acúmulo daquela levaria a alterações na função da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, quando esta exerce sua função na produção de energia. Havendo disfunção mitocondrial ocorre produção de EO, que será discutido noutro tópico. Estudos *post-mortem* de cérebros de pacientes com DP mostram papel da neuroinflamação que, embora não seja considerado fator desencadeador, contribui para sua patogênese quando, a própria agregação de alfa-sinucleína induz respostas inflamatórias locais que facilitam as alterações estruturais da alfa-sinucleína. Estas, como em um sistema cíclico, também levam a mais agregação de alfa-sinucleína que podem escapar dos mecanismos de degradação (RANSOHOFF, 2016; POEWE *et al.*, 2017).

O diagnóstico comumente é realizado quando há presença dos sintomas motores da doença, de acordo com critérios estabelecidos pela *Movement Disorders Society* (POSTUMA *et al.*, 2015). Há vários sintomas que podem anteceder as manifestações motoras cardinais da DP. Os mais comuns são: distúrbios do sono, alterações de humor, alterações da percepção olfatória e disfunções autonômicas, que podem ser observadas até anos antes do desenvolvimento dos sinais motores clássicos (AGIL *et al.*, 2013).

O diagnóstico é efetuado a partir da interpretação e avaliação de sinais clínicos motores. Não dispomos de testes clínicos, laboratoriais ou de imagem que façam diagnóstico precoce da doença, em sua fase pré-motora. O tratamento farmacológico visa manter níveis de dopamina que possam controlar/minimizar as manifestações clínicas da doença. O tratamento considerado padrão ouro é realizado com levodopa, uma droga precursora da dopamina que possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e, então, ser convertida à dopamina (POEWE *et al.*, 2017). Entretanto, a levodopa pode ser convertida e excretada muito antes de alcançar seu local de ação, de forma que a administração associada a outros fármacos se faz necessária. Inibidores da dopamina descarboxilase (benserazida ou carbidopa), inibidores da monoaminoxidase-B (selegilina ou rasagilina) e inibidores da catecol-o-metiltransferase (entacapone) são as principais classes associadas à levodopa, pois evitam sua metabolização precoce. Há outras medicações empregadas, como os agonistas dopaminérgicos (pramipexol e

rotigotina). Além disso, cada vez mais tem sido empregadas medidas cirúrgicas em núcleos específicos (cirurgias ablativas e/ou implantação de estimulação cerebral profunda por eletrodos - DBS), após rigorosa seleção de pacientes. Apesar do avanço terapêutico, ainda não há disponível medicação preventiva ou que retarde a progressão da doença. Além da terapia medicamentosa indicam-se tratamentos fisioterápico, fonoaudiológico e psicológico. Tais medidas, em conjunto, culminam em melhor estabilidade clínica dos pacientes acometidos por essa doença degenerativa e progressiva (PIRTOŠEK *et al.*, 2020).

1.2. O Olfato

O ser humano possui cerca de 10 a 20 milhões de células quimiorreceptoras olfatórias (PINTO, 2011) possuidoras de cílios em sua superfície onde moléculas odorantes são ligadas. Acredita-se que há cerca de 400 tipos de receptores que permitem a disseminação dos odores.

Ao ocorrer a ligação da molécula odorante com seu receptor específico (proteína específica), esta estimulação promove transformação de adenosina trifosfato em adenosina monofosfato cíclico, com consequente abertura de canais iônicos de sódio. Esta abertura de canais altera potenciais de ação culminando na transmissão do impulso elétrico pelo sistema nervoso (HADLEY; ORLANDI; FONG, 2004). Assim a percepção olfatória é convertida em impulso elétrico sendo transmitida pelas células nervosas. As células olfatórias possuem prolongamentos amielínicos que formam filamentos e estes, o nervo olfatório e o bulbo olfatório, onde ocorrem sinapses com células mitrais (Figura 1).

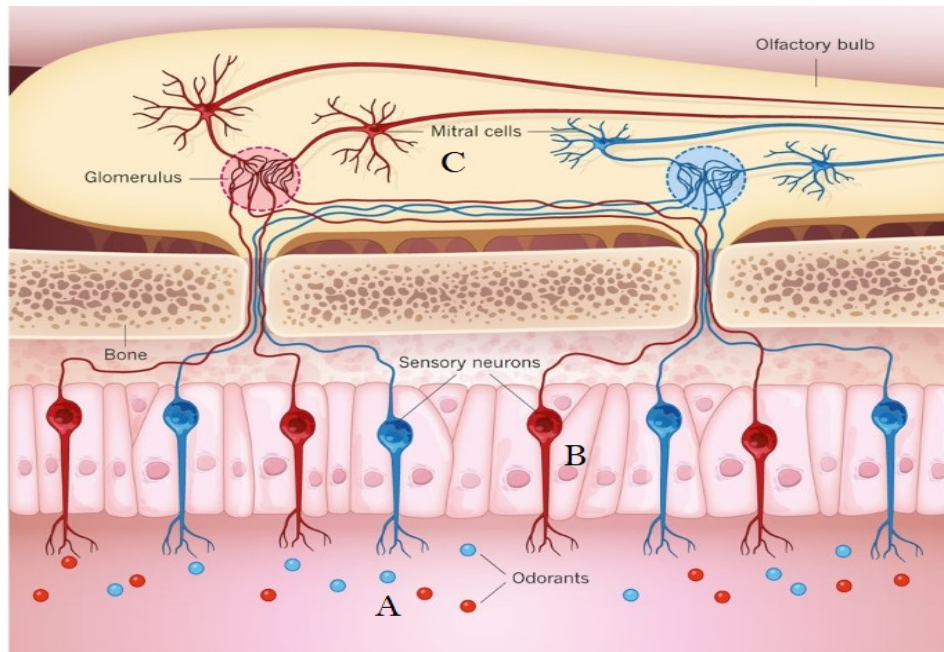


Figura 1 - Células olfatórias e bulbo olfatório. A) moléculas odorantes se ligam à receptores específicos das células olfatórias; B) através de mecanismos elétricos são transmitidos sinais das células epiteliais estas às células mitrais no bulbo olfatório e, C) destas para camadas do sistema nervoso central (URBAN; TRIPATHY, 2012).

Os neurônios bipolares olfatórios possuem axônios mielínicos (mas também amielínicos), ganham às estrias olfatórias até o uncus, com projeções para córtex órbito frontal e sistema límbico, exercendo o papel de nossa memória olfatória. As conexões das regiões temporais mediais do cérebro (uncus e amígdala) com o sistema límbico além de nos permitir a percepção da memória olfativa também evocam relações emocionais oriundas da assimilação de olfato (repulsa ou prazer, por exemplo). O córtex entorrinal rostral (porção anterior do giro para-hipocampal) relaciona-se com a evocação de memórias e associações de odorantes particulares, enquanto o córtex piriforme (lobo temporal rostral - unco) é ligado ao processamento inicial dos odores (percepção e discriminação). Todas estas regiões anatômicas estão indicadas na Figura 2.

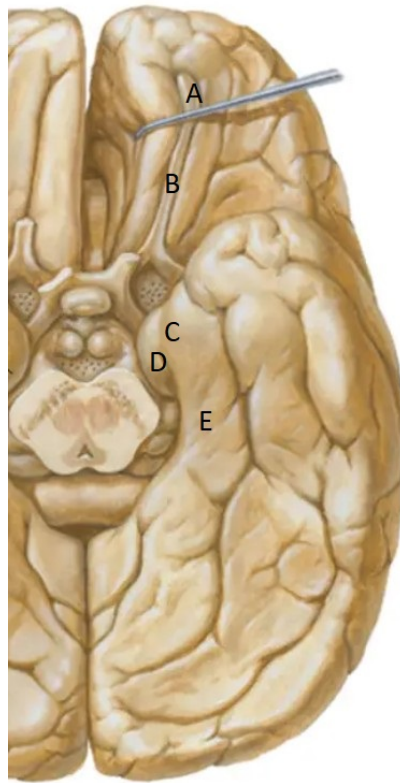


Figura 2 - Conexões centrais. A) Bulbo Olfatório e (B) Trato Olfatório levam estímulos à Amígdala (C), ao Córtex Piriforme (D) e ao Córtex Entorrinal (E). Neste (E) se dá a memória/evocação de odores, enquanto em D temos a percepção e processamento de odores. Nas conexões amigdalianas (C) com sistema límbico temos as evocações emocionais oriundas das percepções olfatórias. NETTER, F. H. *Atlas de Anatomia Humana*. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Com o envelhecimento vê-se redução da função olfatória. Está presente em mais de 50% dos indivíduos com idade entre 65 a 80 anos o que pode influir na qualidade de vida, aspectos nutricionais e a própria segurança, aumentando a mortalidade. Dano cumulativo de insultos ambientais, redução de enzimas metabólicas da mucosa e perda sensorial de receptores estão associadas a alterações da função olfatória. A expressão de proteínas aberrantes, normalidades em epitélio e bulbo olfatórios e suas projeções centrais também se relacionam em comprometimento sensorial olfatório quer seja no envelhecimento como em desordens degenerativas como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (ATTEMS; WALKER; JELLINGER, 2015).

1.3. Alteração do olfato como manifestação não motora de DP

Na DP, sabe-se que previamente aos clássicos sintomas motores que conferem o seu diagnóstico, uma manifestação muito frequente é a redução da capacidade olfatória. Ansari e Johnson (1975) descreveram disfunções olfatórias em 10 pacientes com DP (de um grupo de 22 pacientes), quando comparadas à população normal (não portadores de DP). Posteriormente, Doty e colaboradores utilizaram o teste UPSIT (*University of Pennsylvania Smell Identification Test*) na avaliação do olfato em pacientes parkinsonianos (DOTY; DEEMS; STELLAR, 1988). Estes autores observaram declínio da função olfatória nestes pacientes, quando comparados a indivíduos saudáveis. Hiposmia e anosmia são considerados sintomas prodrômicos da doença, sendo estes aceitos atualmente pela comunidade neurológica internacional (KALIA; LANG, 2015; POEWE *et al.*, 2017). O percentual de acometimento da acuidade olfatória nos pacientes com DP varia e é em torno de 75 a 95% (OPPO *et al.*, 2020). Acredita-se que a perda olfatória ocorra pelo menos cerca de quatro anos antes dos sintomas motores clássicos da DP (ROSS *et al.*, 2008). Os substratos anátomo-patológicos da DP, neuritos e corpúsculos de Lewy (proteínas e células com alfa-sinucleína), são visualizados em várias regiões envolvidas com a percepção olfatória: desde células do epitélio olfatório (SAITO *et al.*, 2016), passando pelo bulbo olfatório (que pode estar reduzido em volume) e tratos olfatórios (OPPO *et al.*, 2020).

Embora vários graus de perda olfatória tenham sido encontrados nos pacientes com DP, há pouca correlação entre a gravidade da perda olfativa e a graduação clínica da DP. Existem relatos conflitantes sobre a causa da perda olfatória. Saito e colaboradores (2016) em seu estudo mencionaram que as células olfatórias já possuem corpúsculos de Lewy enquanto outros autores em estudo de biópsia não obtiveram mesmo resultado (WITT *et al.*, 2009). No entanto, já há diversas publicações que corroboram o acometimento do bulbo olfatório na DP (AGIL *et al.*, 2013; REY; WESSON; BRUNDIN, 2018). É importante notar que a alteração de olfato é observada em outras situações e em diversas doenças, não apenas na DP. Demência por Corpúsculos de Lewy, Doença de Alzheimer, o próprio envelhecimento e uso de medicações estão relacionados com alterações de olfato (SARKAR; RAYMICK; IMAM, 2016).

No Brasil, Silveira-Moriyama e colaboradores (SILVEIRA-MORIYAMA *et al.*, 2008) utilizaram o UPSIT como um dos testes de identificação de olfato em DP. Quagliato e colaboradores aplicaram o teste breve de identificação de 12 cheiros da Universidade da Pensilvânia e obtiveram alterações olfatórias em 80% dos pacientes com DP (QUAGLIATO *et al.*, 2007), refletindo os dados obtidos por autores internacionais, em relação à diminuição ou perda da função olfatória. Fornazieri e colaboradores (FORNAZIERI *et al.*, 2015) validaram o UPSIT para uso em território nacional, permitindo a avaliação do olfato de maneira mais criteriosa e padronizada. O UPSIT (Figura 3) consiste num teste em que são fornecidos ao paciente cartões com 40 odores que são testados em sequência. O paciente é orientado a raspar com um lápis um pequeno espaço do cartão que exalará o odor a ser identificado. Na medida em que o odor é exalado há quatro alternativas fornecidas, e dentre elas o paciente é inquirido a identificar o correto. De acordo com o número de acertos é classificado em normosmia, hiposmia (ou microsmia) leve – moderada - severa e anosmia.

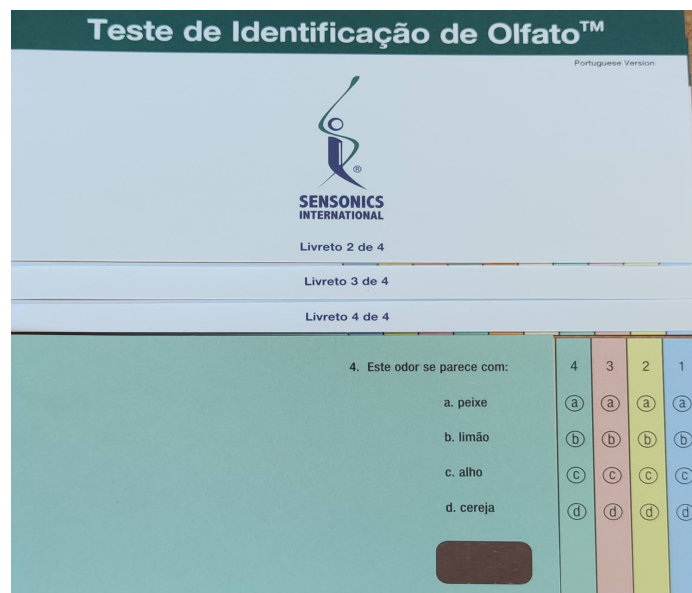


Figura 3 - UPSIT

1.4 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

As espécies reativas, conhecidas pela química desde o início do século XX (GOMBERG, 1900), foram descobertas em sistemas biológicos em 1954

(COMMONER, TOWNSEND & PAKE, 1954). Na mesma época, Gerschman e colaboradores (1954), propuseram que os efeitos nocivos do oxigênio hiperbárico e dos raios X possuíam mecanismos comuns, envolvendo espécies radicalares e não radicalares, resultando na redução parcial do oxigênio. Posteriormente, Harman (1956) sugeriu que estas espécies poderiam desempenhar papel em processos patológicos, onde cunhou o termo “estresse oxidativo”. O conhecimento na área progrediu em 1969 quando a enzima superóxido dismutase (SOD) foi isolada (McCORD & FRIDOVICH, 1969). A identificação da SOD inspirou um grande número de estudos que contribuiu para o conhecimento das espécies reativas de oxigênio (EROs), embora por muitas décadas se acreditou que estes estavam exclusivamente associados a efeitos deletérios. Esta visão foi baseada principalmente pelo achado de que as EROs são altamente reativas, interagindo rapidamente com a maioria das macromoléculas biológicas, causando alterações que resultavam em perda de função (BARTOSZ, 2009). De fato, EROs incluem espécies como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), cuja reatividade é tão alta que reage muito próximo ao local em que foi produzido (HALLIWELL, 1987), enquanto outras espécies como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são menos reativas (Di MEO *et al.*, 2016). Além disso, também foram identificadas moléculas reativas derivadas do nitrogênio, atualmente denominadas como espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), que apesar de não ser muito reativo, ao reagir com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode produzir o peroxinitrito (ONOO^-), uma poderosa ERN não-radicalar (RADI, 2013). No entanto, há que se citar que as espécies radicalares nem sempre apresentam papel deletério ao organismo. As espécies radicalares desempenham duplo papel nos sistemas biológicos: são subprodutos tóxicos do próprio metabolismo levando a danos oxidativos e disfunção dos tecidos, mas servem como sinalizadores moleculares ativando respostas benéficas ao EO/EN. EROS/ERNS são produtos do metabolismo celular normal e estão envolvidas na defesa contra agentes infecciosos (processos fagocitários) e em sistemas de sinalização celular atuando como mensageiros (ativação de insulina e transporte de glicose, proliferação celular, biossínteses de prostaglandinas e outros). Curiosamente, de forma artificial, o conceito formação de espécies radicalares é utilizado no tratamento oncológico, através da radioterapia, onde a radiação ionizante com consequente geração de hidroxila é o principal mecanismo pelo qual

as células malignas são destruídas durante a radioterapia (DI MEO; VENDITTI, 2020).

A fim de evitar danos pelas ações das ERO/ERN quando se encontram em desequilíbrio, o organismo possui sistemas antioxidantes classificados como enzimáticos e não-enzimáticos. Alguns dos principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), o complexo glutaciona-peroxidase (GPX) e a paraoxonase (PON). Dos não-enzimáticos podemos citar o ácido úrico (AU) e as vitaminas A, C e E (NIEDZIELSKA *et al.*, 2016). O estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN) é um fenômeno onde ocorre desequilíbrio entre as espécies reativas e a capacidade de neutralização pelos antioxidantes, seja por produção exacerbada das ERO/ERN, por depleção dos mecanismos de defesa, ou ambos. Na vigência deste fenômeno, podem ocorrer danos a importantes biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BLESA *et al.*, 2015). Muitas evidências apontam o envolvimento do EO/EN na fisiopatologia de base da DP (BLESA *et al.*, 2015; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019a). De modo particular, na DP, a oxidação da dopamina pela enzima monoamino oxidase produz espécies reativas que, com a redução das defesas antioxidantes e altas concentrações de ferro, mediante a reação de Fenton, podem favorecer o processo neurodegenerativo na substância negra *pars compacta* (SNpc) (DE FARIAS *et al.*, 2016). No aspecto celular, a produção excessiva das EROs/ERNs leva ao desequilíbrio entre as reações redox do organismo, alterações no metabolismo das catecolaminas, modificações no transporte da cadeia de elétrons mitocondriais e depósito de ferro na SNpc (BLESA *et al.*, 2015). O acúmulo de ferro em cérebros de pacientes com DP é significativamente maior quando comparados a cérebros com envelhecimento saudável. Questiona-se se a dieta teria algum papel no acúmulo deste metal com a possibilidade de aumentar o risco para DP. Além disso, a presença excessiva de ferro tecidual poderia levar a uma desregulação em seu metabolismo, mediada por alterações de alfa-sinucleína, gerando aumento de produtos oxidantes no sistema nervoso central (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019b).

A neuromelanina (NM) é um composto lipídico ligado a peptídeos relacionados ao metabolismo das catecolaminas. Acredita-se que a NM armazene, proteja e libere a dopamina, assim como regule as reações redox do ferro corpóreo,

minimizando seu efeito oxidante e sequestre outros metais tóxicos. A NM impede formações de produtos radicalares mediados por ferro assim como a depleção de produtos antioxidantes (*in vitro*) (BLESA *et al.*, 2015). As alterações que ocorrem na NM, em especial sua densidade e composição, são creditadas exacerbar a produção de EROs/ERNs, acúmulo de ferro e agregação de alfa-sinucleína na SNpc em cérebros de parkinsonianos, culminando num desequilíbrio favorável ao dano oxidativo (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019a).

1.5 Estresse Oxidativo/Nitrosativo e alterações de olfato

Os estudos de perda olfatória relacionados à DP apontam para alterações patológicas principalmente no bulbo olfatório, onde há redução volumétrica de suas estruturas e nota-se a presença de um dos achados patognomônicos na DP que são os corpúsculos de Lewy (CL). Por outro lado, há estudos que apontam como uma possível origem da DP estruturas fora do sistema nervoso central, como o intestino que, por alterações da microbiota intestinal levaria a processo inflamatório com acúmulo de alfa-sinucleína na células nervosas entéricas (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015), ocasionando transmissão caudo-rostral ao sistema nervoso central. Mais recentemente tem se reportado que a DP possa ser uma enfermidade cuja transmissibilidade apresente caráter priônico, em face à deposição e mudanças na conformação estrutural da alfa-sinucleína que exerceria tal papel patogênico (DUYCKAERTS; CLAVAGUERA; POTIER, 2019).

Em relação ao olfato discute-se qual estrutura seria inicialmente mais acometida. Embora se tenha descrito o epitélio olfatório como sede do início do acometimento olfatório (SAITO *et al.*, 2016), outro estudo de biópsia de epitélio olfatório não evidenciou a presença de substrato patológico nesta região (WITT *et al.*, 2009). No entanto, como descrito acima, estudos apontam o bulbo olfatório como estrutura relacionada à olfação mais comumente afetada na DP (e relacionada com o EO/EN) em especial as células mitrais e tufoas (BAGNOLI; FITZGERALD, 2019). Uma das possibilidades aventadas seria que as células mitrais possuam axônios mielínicos e amielínicos. Estes demandam um excesso de produção de energia já que não haveria a condução rápida saltatória do impulso nervoso proporcionada pela presença de mielina. Havendo necessidade de maior aporte (e consequente

gasto) energético, cria-se ambiente favorável à produção de EO/EN. O EO/EN em ambiente rico em alfa-sinucleína seria capaz de alterar a estrutura desta proteína favorecendo uma função patológica que seria disseminada a outras estruturas do sistema nervoso central (BAGNOLI; FITZGERALD, 2019). Cria-se assim uma sequência de eventos onde EO/EN, presença de alfa-sinucleína, participação de metais (em especial ferro) e mudanças na conformação da alfa-sinucleína culminariam em dano local com consequente perda de função olfatória (Figura 4), além da possibilidade de que este processo se alastre para outras regiões do sistema nervoso central com consequentes manifestações clínicas de outras ordens, como as motoras, por exemplo.

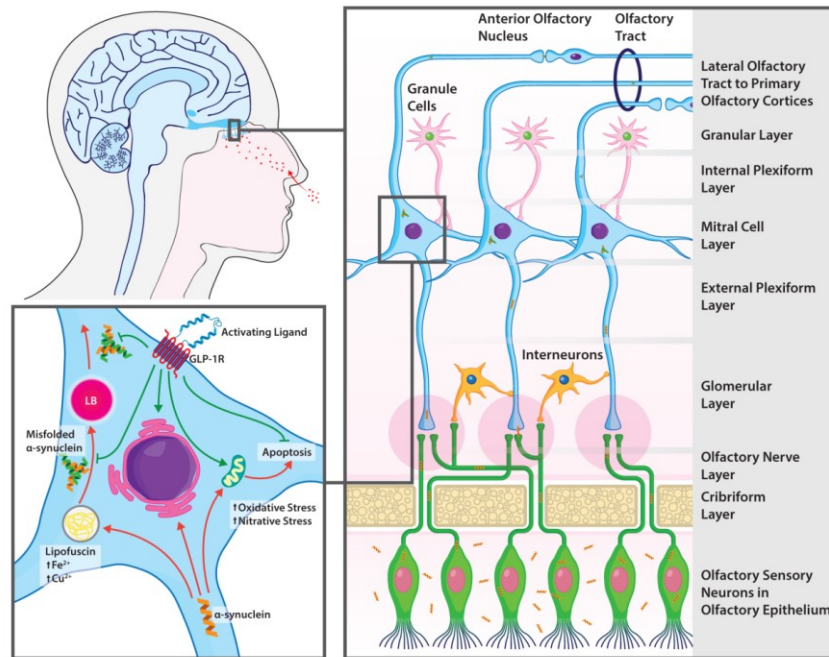


Figura 4. Células mitrais ricas em alfa-sinucleína. Agravos externos, presença de metais, mudanças na conformação de alfa-sinucleína, EO/EN. Um conjunto de situações que favorece dano celular (BAGNOLI; FITZGERALD, 2019).

Chama atenção um estudo realizado em *Drosophila melanogaster* (animal utilizado para estudar olfato) que na presença de fatores antioxidantes haveria prevenção na degeneração axonal de células nervosas, com consequente preservação da olfação (HUSSAIN *et al.*, 2018).

Sendo a hiposmia/anosmia e sua possível relação com o EO/EN na DP um assunto com poucos estudos publicados na literatura científica, nos parece ser um campo interessante a ser explorado.

2 JUSTIFICATIVA

Não foram encontrados nas literaturas nacional ou internacional trabalhos que relacionem as alterações de olfato observadas na DP com biomarcadores sanguíneos de EO/EN. Uma vez que a hiposmia/anosmia pode ocorrer cerca de quatro anos antes do aparecimento dos sinais motores nesta doença, este novo tipo de abordagem clínico-laboratorial poderia contribuir para uma melhor compreensão e, talvez, conjuntamente com outros sinais não motores, na predição ou diagnóstico da DP. Tais razões justificaram este trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar biomarcadores bioquímicos, de EO/EN, percepção olfativa em indivíduos com a DP e suas possíveis correlações.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os dados sociodemográficos idade e gênero;
- Quantificar os níveis plasmáticos do colesterol total e frações, triacilgliceróis e ácido úrico;
- Quantificar os biomarcadores séricos de EO/EN hidroperóxidos lipídicos (quimiluminescência), metabólitos do óxido nítrico (colorimetria), produtos avançados de oxidação proteica (espectrofotometria), capacidade antioxidante total plasmática (quimiluminescência), grupamentos sulfidril (colorimetria) e atividade total da paraoxonase-1 (espectrofotometria);
- Identificar a frequência relativa de normosmia, hiposmia (em seus variados graus) e anosmia, através do teste olfatório UPSIT;
- Comparar os resultados do UPSIT e dos biomarcadores bioquímicos e de EO/EN entre os grupos estudados;

- Observar associações entre os biomarcadores bioquímicos e de EO/EN com a normosmia/hiposmia/anosmia nos pacientes com a DP.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, pelos pareceres n.º 2.568.671 e n.º 3.918.449, CAAE 85668718.7.0000.5231. A todos os participantes deste estudo foram explicados os objetivos da pesquisa e todas as análises foram realizadas após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Delineamento de estudo

Originalmente, o estudo havia sido delineado com três grupos, numa análise transversal, a saber: indivíduos com DP sem alteração de olfato; indivíduos com DP e alteração de olfato; e indivíduos saudáveis (sem DP e sem alteração de olfato). Entretanto, em nossa amostragem, não foram encontrados sujeitos com DP sem alteração de olfato), de forma que este estudo passou a ser considerado transversal observacional. O grupo caso ainda foi posteriormente estratificado de acordo com os resultados do teste de acuidade olfativa, para fins de comparação e interpretação.

4.3 Casuística

Para a formação do grupo caso foram recrutados 53 indivíduos com DP idiopática, atendidos no serviço de Neurologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (AEHU - UEL), por amostra de conveniência. O diagnóstico da DP foi realizado de acordo com os critérios clínicos da *Movement Disorders Society* (POSTUMA *et al.*, 2015). O estadiamento da doença foi obtido por meio da escala de Hoehn e Yahr (HY) modificada (GOETZ *et al.*, 2004) e os voluntários também foram submetidos ao Mini Exame do Estado Mental (FOLSTEIN, FOLSTEIN e MCHUGH, 1975) para avaliação cognitiva, com adaptação para a população brasileira (BRUCKI *et al.*, 2003).

Todos os participantes foram submetidos ao teste de identificação de olfato da Universidade da Pensilvânia (UPSIT).

Os indivíduos do grupo caso foram estratificados de acordo com o grau de acometimento olfatório de modo a compor cinco subgrupos: Normosmia (0 pessoas), Hiposmia Leve (1 pessoa), Hiposmia Moderada (2 pessoas), Hiposmia Severa (19 pessoas) e Anosmia (31 pessoas). Considerando o número de indivíduos em cada subgrupo, os dois últimos foram os utilizados para as análises comparativas, por apresentarem maior número de integrantes.

Já o grupo controle foi composto por 22 indivíduos que já participaram de outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa, clínica e laboratorialmente saudáveis. Foram excluídos do grupo caso sujeitos portadores de Parkinsonismo secundário (medicamentoso ou isquêmico), Parkinsonismo atípico (atrofia de múltiplos sistemas, paralisia supranuclear progressiva, degeneração corticobasal e demência com corpúsculos de Lewy), sujeitos com alterações cognitivas de acordo com o Mini Exame do Estado Mental) e indivíduos entre as fases 4 e 5 da escala de HY modificada (GOETZ *et al.*, 2004). Além disso, foram excluídos de ambos os grupos indivíduos fumantes ou com comorbidades de caráter olfatório, inflamatório (crônico) ou imunológico, cuja análise da percepção olfatória poderia ser decorrente de patologias ou situações não relacionadas à DP. Para melhor avaliação de dados de EO/EN descartamos pacientes portadores de diabetes mellitus.

4.4 Avaliação de acuidade olfatória

O teste de identificação do olfato da Universidade da Pensilvânia (UPSIT) é um teste inalatório que consiste em quatro cartelas contendo dez odores cada uma, num total de 40 odores. A cada odor testado mediante raspagem de local indicado na cartela o participante responde um teste de múltipla escolha (4 alternativas) para identificar qual odor inalado. Após a análise dos 40 odores, os indivíduos são categorizados em olfação normal (normosmia) e em olfação reduzida (hiposmia leve, moderada, severa e anosmia), de acordo com a adaptação brasileira (FORNAZIERI *et al.*, 2015).

4.5 Coleta, processamento e armazenamento de amostras

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue por punção venosa, de todos os indivíduos, com jejum de 12h. A coleta foi realizada em tubos com vácuo (vacutainer®) sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x g em centrífuga EVLAB®, (Londrina, PR, Brasil), e as amostras foram aliqüotadas e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.6 Biomarcadores de EO/EN

4.6.1 Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)

O TRAP foi avaliado por quimiluminescência em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996). Esta metodologia detecta os antioxidantes totais presentes na amostra, de maneira inespecífica. Este experimento foi conduzido em leitor de microplaca Victor X3, Perkin Elmer® (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620nm com temperatura de 30°C. Resultados foram expressos em μM de equivalente de Trolox.

4.6.2 Determinação hidroperóxidos por quimiluminescência (LOOH)

A avaliação da formação de hidroperóxidos por quimiluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzalez-Flecha *et al.* (1991). Este experimento foi realizado em um luminômetro GLOMAX 30/30 em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm a 30°C, durante 60 minutos (adaptado de Gonzalez-Flecha *et al.*, 1991 e Panis *et al.*, 2012). Os resultados expressos em unidades relativas de luz (URL).

4.6.3 Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Os níveis de NOx foram avaliados por ensaio colorimétrico em leitor de microplacas Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) a 545 nm, em que a quantificação de nitritos e nitratos ocorre pela adição do reagente de Griess (adaptado de Navarro-González *et al.*, 1998). Os resultados foram expressos em μM .

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

A quantificação de AOPP foi realizada de acordo com o método descrito por Hanasand *et al.* (2012), em leitor de microplacas Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) a 340 nm. Os resultados foram expressos em μM de equivalente de cloramina T.

4.6.5 Determinação de grupamento sulfidril (SH)

Os grupamentos SH totais foram avaliados pelo método descrito por Hu (1994), em leitor de microplacas, Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em μM .

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

A atividade total de PON-1 foi determinada pela taxa de hidrólise do acetato de fenila, de acordo com a técnica descrita por Richter, Jarvink e Furlong (2008). O teste foi realizado em um leitor de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer, EUA) a 270 nm. A atividade da PON-1 foi expressa em U/mL.

4.7 Biomarcadores bioquímicos

Os níveis de colesterol total (CT) triacilgliceróis (TAG), lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL) e ácido úrico (AU) foram obtidos por meio do aparelho Dimension[®], RxL (Deerfield, IL, EUA). Os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein* - LDL) foram calculados pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972), considerando que os níveis de TAG dos voluntários foram abaixo de 400 mg/dL.

4.8 Análise estatística

Os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene foram aplicados para averiguar a normalidade e homogeneidade dos dados contínuos, respectivamente. A distribuição de dados categóricos foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. De acordo com a distribuição normal ou não dos dados, foram aplicados os testes t de Student e Mann-Whitney para avaliar diferenças nos níveis de biomarcadores bioquímicos e

de EO/EN entre os grupos caso e controles. De forma semelhante, as comparações entre os subgrupos Hiposmia Severa e Anosmia e o grupo controle foram avaliadas pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) ou de Kruskal-Wallis. Foram aplicados os testes de correlação de Pearson ou Spearman entre os subgrupos Anosmia e Hiposmia Severa. Também nesses subgrupos, foi realizada a análise de regressão múltipla. Todos os cálculos foram realizados por meio do software IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos e discutidos no Artigo abaixo:

Evaluation of biochemical biomarkers, oxidative/nitrosative stress and olfactory perceptions in patients with Parkinson's disease

Lucio Baena de Melo^{1,2}, Nayara Rampazzo Morelli¹, Thiago Hissnauer Leal Baltus¹, Carine Coneglian de Farias³, Icaro Bertechini Soler Lopes², Taimara Zimath², Milena Gerke Sampaio², Maria Caroline Martins de Araújo², Décio Sabbatini Barbosa¹

¹Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

²Department of Clinical Medicine Neurology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

³Biomedicine, Federal Institute of Espírito Santo, Vila Velha campus, Espírito Santo, Brazil.

Abstract: Parkinson's disease (PD) is a highly prevalent disorder and is the second most common cause of neurodegenerative disease. This has been described with the presence of four clinical motor signs that characterize the disease, namely: tremor, stiffness, bradykinesia and postural instability. It is known, however, that some years before the classic motor phenomena of the disease, patients usually present non-motor changes, among them, changes in the olfactory function (hyposmia in different degrees and anosmia). Among several etiological factors, the involvement of oxidative/nitrosative stress (OS/NS) is known. The aim of this study was to recruit patients with PD, to evaluate their olfactory function, to analyze biochemical and OS/NS biomarkers to obtain possible correlations and associations. There is a lack of studies that simultaneously investigate smell in patients with PD and OS/NS. In this study, 53 parkinsonian patients monitored at the Neurology Service of the University Hospital of the State University of Londrina were evaluated. The diagnosis was made following the guidelines of the Movement Disorders Society and all patients were on a Hoehn-Yahr scale 2. Patients underwent an olfactory function assessment test (UPSIT) and for evaluation of the following biochemical biomarkers and OS/NS: total cholesterol (CT), high density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triacylglycerols (TAG), uric acid (UA), lipid hydroperoxides

(LOOH), total plasma antioxidant capacity (TRAP), advanced protein oxidation products (AOPP), sulfhydryl groups (SH), metabolites nitric oxide (NOx) and paraoxonase 1 (PON-1) activity. The control group consisted of 22 individuals without PD who underwent the same assessments. In our study, all PD patients had olfactory changes. Biochemical biomarkers (TAG and AU) and antioxidant profile biomarkers (SH and PON-1) were reduced in the DP group as well as increased LOOH (pro-oxidant). In the DP group, there was a positive correlation between TAG and AOPP, and between PON-1 and AU. There was also a positive correlation between PON-1 and SH, and an inverse correlation between SH and LOOH. In multiple regression analysis, we observed an inverse relationship between PON-1 and AOPP. Between the anosmia and hyposmia groups, we observed a numerical difference (but not statistically significant) in LOOH and PON-1, which suggested the possibility that these markers may be related to smell (since the degree of clinical involvement is the same and in theory the OS/NS would be similar between groups). It is possible that these OS/NS changes have a role in the olfactory bulb, causing changes in alpha-synuclein that culminate in loss of smell. There were no statistically significant changes in the values of CT, HDL, LDL, TRAP and NOx. We conclude that OS/NS may be co-participant in pathophysiological mechanisms in PD and olfactory loss, although our study cannot certify how much OS/NS is specifically related to smell, PD, or both.

Key words: Parkinson's disease, oxidative/nitrosative stress, smell.

Key-words: Parkinson's disease, oxidative/nitrosative stress, smell.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second leading cause of degenerative disease (after Alzheimer's disease) and is clinically manifested by the following symptoms: rigidity, bradykinesia, rest tremor and loss of postural reflexes (LEE; GILBERT, 2016). PD affects 1% of the population over 60 years of age and 0.3% of the general

population in industrialized countries (LEES; HARDY; REVESZ, 2009; LEE; GILBERT, 2016). It is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in *Substantia Nigra* (SN). Prior to classic motor symptoms of the disease, non-motor symptoms commonly manifest, which may precede classic signs by years (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). Non-motor symptoms are apathy, excessive daytime sleepiness, changes in REM (rapid eyes movement) sleep, loss of smell, constipation and others (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Loss of smell is considered one of the most frequent manifestations prior to motor symptoms in PD. The percentage of olfactory impairment in PD patients is around 75 to 95%, and olfactory loss is believed to occur at least about 4 years before classic PD motor symptoms (ROSS *et al.*, 2008; OPPO *et al.*, 2020). Initially described by Ansari and Johnson (1975), and followed by other studies, impaired olfactory function is considered supportive criteria for the diagnosis of PD (KALIA; LANG, 2015; POEWE *et al.*, 2017).

Doty and collaborators (1988) used the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) to evaluate the smell in PD patients (DOTY; DEEMS; STELLAR, 1988), and observed a decline in olfactory function in these patients, when compared to healthy individuals. The pathological substrate of PD, Lewy bodies and neurites (alpha-synuclein aggregates), is visualized in several regions associated with olfactory perception. From olfactory epithelium cells (SAITO *et al.*, 2016), through the olfactory bulb (which may be reduced in volume) and olfactory tracts (OPPO *et al.*, 2020).

Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) are highly reactive molecules produced physiologically, associated with signaling processes such as gene transcription and protein interactions. ROS/RNS accumulation can result in damage to lipids, proteins and nucleic acids (DNA and RNA), compromising neuronal function and structural integrity (TRIST *et al.*, 2019). Failure of the antioxidants defenses such as sulfhydryl groups (SH), and paraoxonases (PON), (e.g.) could lead to oxidative/nitrosative stress (OS/NS), damaging cellular structures and even resulting in cell death. Results from early-stage PD patients demonstrated elevated OS/NS as an important feature observed before the major dopaminergic loss (FERRER *et al.*, 2011), indicating that ROS/RNS generation might be a potential causative factor in

neuronal death (TRIST et al., 2019). Also reported to be associated with increased OS/NS in the PD brain are mitochondrial dysfunction, dysregulated iron metabolism, neuroinflammation, decreased antioxidant levels, and accumulation of alpha-synuclein (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

Although the relationship of OS/NS with PD has been extensively studied, the role played by ROS/RNS on the olfactory system is poorly evaluated. Therefore, this study aims to assess the oxidative/nitrosative biomarkers profile, biochemical biomarkers seric levels and the degree of olfactory impairment in PD subjects and in healthy controls.

Materials and methods

Subjects

The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina (certificate of approval n° 85668718.7.0000.5231), and informed written consent was acquired from all subjects. The case group consisted of 53 individuals with PD, enrolled from the Neurology Ambulatory of the Clinical Hospital of the University State of Londrina. PD was diagnosed according to Movement Disorders Society criteria (POSTUMA, 2015) and staging was assessed by modified Hoehn and Yahr (H-Y) scale (GOETZ *et al*, 2004), and their cognitive status was evaluated by the Mini-Mental Status Exam (MMSE) (FOLSTEIN, FOLSTEIN, and MCHUGH, 1975). All individuals presenting secondary parkinsonism features, high degree of mobility (HY 4-5 stages) and cognitive impairment (MMSE), were excluded. Patients with diabetes mellitus were excluded from the study. The PD group was further stratified into 5 subgroups, according to the results of the olfactory test: normosmia (no subjects), mild hyposmia (1 subject), moderate hyposmia (2 subjects), severe hyposmia (19 subjects), and anosmia (31 subjects). Considering the number of subjects for each subgroup, only the last two (severe hyposmia and anosmia) were used for comparison analysis. The control group consisted of 22 individuals, clinically and laboratory healthy. Were

excluded from both groups smokers and subjects presenting major olfactory, inflammatory or immune comorbidities. Samples were obtained by convenience.

Olfactory assessment

The olfactory loss was evaluated by the UPSIT. The test consists of four cards containing ten odorants each, for a total of 40 odorants. Each odorant is tested by scratching the indicated place on the card, where the individuals must smell and answer a multiple-choice test to identify the sniffed odorant. The score was used to categorize all the subjects as normosmia, mild, moderate, and severe hyposmia, and anosmia (FORNAZIERI *et al.*, 2015).

Samples

OS/NS biomarkers

The OS/NS biomarkers evaluated were advanced oxidation protein products (AOPP), lipid hydroperoxides (LOOH), nitric oxide metabolites (NOx), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), the activity of paraoxonase-1 (PON-1), and sulfhydryl (SH) groups. AOPP was measured on a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer®, USA) at 340 nm (HANASAND *et al.*, 2012) and expressed as μM of equivalent chloramine T. LOOH was quantified by chemiluminescence assay using Glomax Luminometer (TD 20/20), in a dark room at 30°C (adapted from FLECHA *et al.*, 1991 and PANIS *et al.*, 2012) and expressed results in relative light units (RLU). NOx was measured on a microplate reader (EnSpire®, Perkin Elmer, USA) at 545 nm, quantifying nitrites and nitrates (adapted from NAVARRO-GONZÁLVEZ *et al.*, 1998) and final results expressed as microMolar (μM). TRAP was quantified in a microplate reader (Victor X-3, Perkin Elmer, USA) and results were corrected for UA influence, expressed in μM of Trolox (REPETTO *et al.*, 1996). Total PON-1 activity was determined by the rate of hydrolysis of phenylacetate in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) at 270 nm and 25°C. The activity is expressed in U/mL (RICHTER *et al.*, 2008). SH groups were evaluated by the assay described by HU

(1994), on a microplate reader (EnSpire®, Perkin Elmer, USA) at 412 nm and results were expressed as μM .

Biochemical biomarkers

Biochemical analysis of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), and triacylglycerols (TAG) were performed on the Dimension®, RxL (Deerfield, IL, USA) apparatus. Low-density lipoprotein (LDL) levels were calculated by applying the Friedewald equation (FRIEDEWALD, LEVY, and FREDRICKSON, 1972).

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were applied to check the normality and homogeneity of all variables, respectively. Sociodemographic data distribution was assessed by the chi-squared test. Differences between PD and HC groups on biochemical and OS/NS biomarkers were evaluated by student t and Mann-Whitney tests, accordingly. PD group was then stratified into subgroups and further compared with controls by one-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests, accordingly as well. Spearman rank correlation coefficient and Pearson correlation coefficient were applied to observe correlations among all OS/NS biomarkers and biochemical biomarkers previously observed statistically different from controls. Multiple regression analysis was performed to evaluate further interactions among biochemical and OS/NS biomarkers.

Results

Table 1 - Socio-demographic data, biochemical and OS/NS biomarkers in patients and controls

	Patients	Controls	<i>p</i>
n (%)	53 (70.7)	22 (29.3)	-
gender m/f ^a	35/18	15/7	0.858
Age ^b	70 (62-77)	75 (70-83)	0.028
UPSIT (score) ^b	15.0 (13.0-19.0)	32.5 (32.0-34.0)	<0.001
Anosmia (n/%)	31 (58.5)	0	
Severe hyposmia (n/%)	19 (35.8)	0	
Moderate hyposmia (n/%)	2 (3.8)	1 (4.5)	
Mild hyposmia (n/%)	1 (1.9)	4 (18.2)	
Normosmia (n/%)	0	17 (77.3)	
TC ^c	185.02 (± 43.57)	195.18 (± 33.44)	0.332
HDL ^c	53.35 (± 13.33)	48.91 (± 10.88)	0.172
LDL ^c	110.60 (± 34.95)	124.14 (± 29.83)	0.117
TAG ^b	74.0 (59.0-100.0)	102.5 (64.0-136.0)	0.043
UA ^c	4.67 (± 1.39)	5.42 (± 1.13)	0.028
LOOH ^b	2.25* (1.21*-3.22*)	1.49* (1.24*-1.95*)	0.026
TRAP/UA ^c	205.90 (± 46.76)	199.74 (± 28.12)	0.486
AOPP ^b	64.64 (54.94-76.32)	56.90 (49.71-65.02)	0.096
SH ^c	278.60 (±76.33)	317.44 (± 46.52)	0.030
NOx ^b	5.52 (4.28-6.93)	5.41 (4.53-6.91)	0.862
PON-1 ^c	93.49 (± 39.50)	188.67 (± 48.14)	<0.001

a: Chi-squared test; b: Mann Whitney test; c: Student t test; *x10⁶; AOPP: advanced oxidation protein products; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; LOOH: lipid hydroperoxides; NOx: nitric oxide metabolites; PON-1: paraxonase-1 activity; SH: sulfhydryl groups; TAG: triacylglycerols; TC: total cholesterol; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; UA: uric acid; UPSIT: University of Pennsylvania Smell Identification Test.

Table 2 - Distribution of clinical data and biomarkers within PD subgroups and controls

	Anosmia (31) ^a	Severe hyposmia (19) ^b	Controls (22) ^y	<i>p</i>
Age ^a	73 (67-79)	69 (57-71) ^y	75 (70-83) ^β	0.013
Hohen-Yahr ^b	2.0 (1.5-2.0)	2.0 (1.5-3.0)	-	0.674
Disease (years) ^b	4 (2-7)	5 (3-8)	-	0.366
Report olfactory loss?				
Yes (n/%) ^c	14 (45.1)	7 (36.8)	-	
No (n/%) ^c	14 (45.1)	10 (52.6)	-	0.844
Not informed	3 (9.8)	2 (10.6)	-	
TC ^d	188.58 (± 39.75)	177.61 (± 51.69)	195.18 (± 33.44)	0.410
HDL ^d	50.61 (± 12.11)	56.17 (± 14.29)	48.91 (± 10.88)	0.165
LDL ^a	117.39 (± 32.11)	98.44 (± 39.40)	124.14 (± 29.83)	0.051
TAG ^a	89.0 (55.0-104.0)	69.0 (51.0-88.0)	102.5 (64.0 -136.0)	0.103
UA ^a	4.3 (3.5-6.0)	4.5 (3.9-5.0)	5.1 (4.6-6.4)	0.059
LOOH ^a	2.08* (1.05*-3.24*)	2.57* (2.05*-3.44*) ^y	1.48* (1.24*-1.95*) ^β	0.010
TRAP/UA ^d	204.59 (± 55.45)	207.13 (± 33.12)	199.74 (± 28.12)	0.853
AOPP ^a	65.47 (53.54-76.82)	64.64 (58.23-73.85)	56.90 (49.71-65.02)	0.156

SH ^d	281.98 (± 88.46)	273.95 (± 56.87)	317.44 (± 46.52)	0.099
NOx ^a	5.74 (4.28-6.96)	5.42 (4.14-6.24)	5.40 (4.53-6.91)	0.567
PON-1 ^d	94.80 (± 41.64) ^y	88.80 (± 38.13) ^y	188.67 (± 48.14) ^{α,β}	< 0.001

a: Kruskal Wallis test; b: Mann Whitney test, c: Chi-squared test; d: one-way ANOVA; * x10⁶ AOPP: advanced oxidation protein products; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; LOOH: lipid hydroperoxides; NOx: nitric oxide metabolites; PON-1: paraxonase-1 activity; SH: sulfhydryl group; TAG: triacylglycerols; TC: total cholesterol; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; UA: uric acid.

Table 3 - Correlations of biochemical and OS/NS biomarkers in PD group

	LOOH ^a	NOx ^a	AOPP ^a	TRAP/UA ^b	SH ^b	PON-1 ^b
TC ^b	r = - 0.241 p = 0.085	r = - 0.032 p = 0.824	r = 0.354 p = 0.010	r = - 0.030 p = 0.834	r = 0.029 p = 0.836	r = 0.102 p = 0.472
HDL ^b	r = - 0.117 p = 0.410	r = - 0.151 p = 0.285	r = - 0.247 p = 0.078	r = 0.233 p = 0.097	r = 0.104 p = 0.465	r = - 0.104 p = 0.463
LDL ^b	r = - 0.232 p = 0.097	r = 0.020 p = 0.888	r = 0.366 p = 0.008	r = - 0.046 p = 0.746	r = 0.065 p = 0.647	r = 0.201 p = 0.153
TAG ^a	r = - 0.123 p = 0.381	r = 0.118 p = 0.401	r = 0.659 p < 0.001	r = - 0.295 p = 0.032	r = - 0.073 p = 0.605	r = 0.010 p = 0.942
UA ^b	r = 0.146 p = 0.298	r = 0.089 p = 0.526	r = 0.274 p = 0.047	r = - 0.838 p < 0.001	r = 0.085 p = 0.547	r = 0.402 p = 0.003

a: Spearman rank correlation coefficient; b: Pearson correlation coefficient AOPP: advanced oxidation protein products; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; LOOH: lipid hydroperoxides; NOx: nitric oxide metabolites; PON-1: paraxonase-1 activity; SH: sulfhydryl group; TAG: triacylglycerols; TC: total cholesterol; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; UA: uric acid.

Table 4 – Correlations in Anosmia and Severe Hyposmia groups

Anosmia	Coefficient	p value
UA x TAG ^a	0.366	0.043
UA x AOPP ^a	0.375	0.038
UA x PON-1 ^a	0.409	0.022
AOPP x TAG ^a	0.774	< 0.001
Severe Hyposmia		
TAG x AOPP ^a	0.489	0.034
LOOH x SH ^b	- 0.469	0.043
SH x PON-1 ^b	0.469	0.043

a: Spearman rank correlation coefficient; b: Pearson correlation coefficient AOPP: advanced oxidation protein products; LOOH: lipid hydroperoxides; PON-1: paraxonase-1 activity; SH: sulfhydryl group; TAG: triacylglycerols; UA: uric acid.

Table 5: Results of multiple regression in PD group (LOOH and PON-1 as dependent variables and AOPP, SH, TG and UA as explanatory variables).

	ANOSMIA				SEVERE HYPOSMIA			
	LOOH		PON-1		LOOH		PON-1	
	R² adjusted: 0.2694		R² adjusted: 0.1582		R² adjusted: 0.0590		R² adjusted: 0.4617	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
AOPP	95158.7322	0.0028	-0.7027	0.3438	5767.2238	0.7238	-1.2713	0.0118
SH	-5170.1259	0.1281	0.0498	0.5536	-9077.8455	0.0716	0.1981	0.1436
TG	-50864.9800	0.0024	0.1034	0.7883	-6467.1937	0.4475	0.3825	0.1145
UA	200501.5909	0.2890	14.0046	0.0060	47336.6294	0.8635	14.1534	0.0774

AOPP: Advanced oxidation protein products; SH: Sulfhydryl group; TG: Triacylglycerol; UA: Uric acid; Significant level: $p < 0.05$.

Table 1 demonstrated the socio-demographic distribution of the recruited subjects (patients and controls). Statistical difference was observed in age, UPSIT TAG, UA, LOOH, SH and PON-1. Regarding the PD group, TAG, UA, SH and PON-1 levels were significantly reduced, while LOOH levels were increased, compared to controls.

Table 2 subdivided the participants into three groups: two subgroups with olfactory changes (anosmia and severe hyposmia) and control group. Age, PD staging, biochemical and OS/NS biomarkers were analyzed. LOOH levels were significantly higher only in patients with severe hyposmia (compared to controls), and PON-1 was statistically reduced in both subgroups (severe hyposmia and anosmia), also when compared to controls.

Table 3 shows the correlations between the OS/NS biomarkers in PD patients (without olfactory loss stratification), where we found direct correlations between TAG and AOPP and between UA and PON.

Table 4 showed correlations analysis for PD subgroups (anosmia and severe hyposmia), and in Table 5, a multiple regression was applied between the biomarkers AOPP, SH, TAG and UA using LOOH and PON1 as dependent variables, also regarding these two PD subgroups.

Discussion

In our study, we did not observe PD patients with preserved smell, which we would expect to find in a percentage of 5 to 25% of patients (OPPO *et al.*, 2020). Recently, some authors discussed that PD patients with preserved smell can be a single phenotype that would have a more benign evolution (BOHNEN; MULLER, 2016), although other studies have not observed the same outcome (ROSSI *et al.*, 2016). We then considered possible reasons for not finding any percentage of patients with normal olfaction. Could it be the presence of high OS/NS culminating in olfactory loss? Would the olfactory bulb of these patients have a greater presence of alpha-synuclein and, consequently, a high level of lesion? There are studies that suggest that olfactory loss is due to cortical alterations, once biopsy of the olfactory epithelium showed normal results. However, other studies have found changes in the

olfactory bulb, especially in mitral cells (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017) suggesting a local involvement.

In our study, we found that TAG, although within normal parameters in patients and controls, was significantly reduced in the PD group. Some studies corroborate our finding, as TAG was also observed diminished in PD patients, being considered protective biomarkers for disease (FANG *et al.*, 2020; FU *et al.*, 2020). One possibility is that in the Parkinsonian patient, sympathetic activity is decreased, and thus the TAG levels would reflect the reduction in catecholamine and cortisol. This can be justified by the presence of Lewy bodies that are found in autonomic centers inside and outside the central nervous system, such as in the adrenals, for example (SCIGLIANO *et al.*, 2006). It is also believed that PD patients consume more carbohydrates than dairy and protein derivatives, culminating in a lesser acquisition of polyunsaturated fatty acids. Another study also mentions, in addition to the reduction of TAG and other lipids in PD patients, a reduction in strokes in parkinsonian patients, and there may be a relationship between low TAG levels, Lipids and strokes (WEI *et al.*, 2013). TAG might play a role as marker for the presence of disease instead of being consumed by OS/NS.

In this work, a direct correlation was found between AOPP and TAG. This correlation persisted both in the analysis of all PD patients and in their stratification by degree of olfactory involvement. On the other hand, a correlation between AOPP and TAG can also be found in healthy individuals (VALLI *et al.*, 2007). Although AOPP could be significantly elevated in PD patients, we have not seen such a result in this study. The strong correlation between AOPP and TAG suggests that this may be a substrate for the formation of AOPP. Since AOPP is mainly formed by oxidation of albumin, which also binds to free fatty acids, we suggest that the increase in TAG favors the AOPP formation.

Regarding the level of clinical involvement, patients with anosmia and severe hyposmia were observed to be at stage 2 on the Hoehn-Yahr scale. This suggests that the OS/NS associated to PD was similar between subgroups, and changes in those biomarkers could possibly be related to the olfactory loss.

In our study, we found that the LOOH values were significantly elevated in PD group. This finding corroborates the studies carried out by De Farias *et al.* (2016) and Agil *et al.* (2006). In addition, a recent meta-analysis demonstrated a statistically

significant difference in LOOH values, increased in patients with PD (KHAN; ATHAR ALI, 2019). However, when stratifying patients by olfactory loss, we found that there was no statistical difference in LOOH levels between the anosmia group and the control group, as well as there was no difference between the anosmia group and severe hyposmia. In fact, a significant difference was found between severe hyposmia and the control group. A possible explanation would be that when evaluating the results, we noticed that in the anosmia group the values of PON-1 and SH are numerically higher than in the severe hyposmia group, suggesting a better antioxidant profile in those patients.

Speaking of which, thiols are essential antioxidant buffers. Plasma thiols consist of proteins, albumin, cysteine, glutathione and others. Thiols contain the sulfhydryl group (SH) that react against oxidizing molecules, reducing them and protecting organisms from oxidative damage (SHARMA *et al.*, 2008). In addition, they act in maintaining the structure of membranes and interactions between proteins and phospholipids. Comparatively, glutathione (thiol) was observed decreased in the SN of parkinsonian individuals and in several degenerative processes (VURAL *et al.*, 2017). Possible reasons for this are that the SH group is oxidized to disulfide and used in other syntheses (neuromelanin, for example), in addition to a likely low intake (VURAL *et al.*, 2017). Dopamine metabolism produces highly oxidizing catabolites that must be removed. When bound to SH, they produce neuromelanin that plays a protective role not only binding to these catabolites, but also binding to metals that are involved in OS/NS. Reduced neuromelanin makes cells more vulnerable to oxidative/nitrosative damage caused by metals and dopamine metabolites (VURAL *et al.*, 2017). In our study, we observed that the SH groups were statistically reduced in the PD group. When subdivided, however, we were unable to reproduce this same result.

We found an inverse correlation between SH and LOOH in PD patients with severe hyposmia. This finding corroborates studies in which parkinsonian patients present harmful action of ROS/RNS with consequent depletion of thiols and increased lipid peroxidation (SHARMA *et al.*, 2008).

Uric acid (UA) is known to be a physiological antioxidant in addition to being an iron chelator (KIM; LEE, 2014). Iron is an essential element in cellular metabolism. However, the accumulation of iron, particularly in SN, plays a significant role in the

death of dopaminergic neurons. UA was demonstrated to have iron chelating properties (Fe^{3+}) through the formation of stable complexes, preventing its oxidation (KIM; LEE, 2014). In the studies by Yu *et al.* (2017) and Wen *et al.* (2017), Fe^{3+} levels in PD patients were higher than those found in healthy individuals. Thus, low concentrations of UA have weak iron chelating ability and may expose neurons to a toxic effect, seen on PD. Kim & Lee (2014) in their study corroborated the reduction of UA and increase of iron in patients with PD. However, it was not possible to establish a relationship between them. UA is responsible for up to 50% of the plasma antioxidant capacity and reduces ROS/RNS formation (SHEN; JI, 2013). This antioxidant activates autophagic mechanisms, which degrades the excess alpha-synuclein, providing a protective effect for disease. A defect in the autophagic process implies the perpetuation of the disease (SHENG *et al.*, 2017). Although we have observed lower UA values in patients, we were unable to reproduce these results when stratifying patients between subgroups.

Paraoxonase 1 (PON-1) is an enzyme associated with HDL and has anti-inflammatory and antioxidant properties, in addition to also having an anti-atherogenic function. PON-1 inhibits oxidation of HDL and LDL maintaining its function and reduces lipid peroxidation in atherosclerotic lesions (KIRBAS *et al.*, 2014). PON-1 is reduced in stroke patients and is inversely related to the formation of carotid and cerebral atherosclerosis. PON-1 has a considerable detoxifying role to the exposure of organophosphates (these being factors linked to PD). Studies show that PON-1 polymorphism is associated with PD and other vascular or degenerative diseases, and high levels of PON-1 indicate a lower risk for developing PD (BELIN *et al.*, 2012). In our study, we found that PON-1 activity was reduced in PD patients, thus demonstrating the influence of OS/NS in patients. We were unable, however, to affirm whether this change was due solely to the disease or if any influence is related to the olfactory loss. It should be mentioned, however, that the olfactory tubercle is a region where there is a high expression of PON-2 (FURLONG *et al.*, 2016), and its role in olfactory function can be inferred. The enzymatic activity of PON-1 was also observed in another study developed by our research group, where the authors suggested that reduced levels of this enzyme may be associated with several different processes in PD, such as hepatic synthesis compromised by inflammatory responses and relation of PON1 with lipid peroxidation (DE FARIAS *et al.*, 2017).

We also observed a positive correlation between PON-1 and UA. As mentioned above, UA plays its metal-chelating and antioxidant role, while PON-1 acts as an antioxidant by inhibiting lipid peroxidation. A possible explanation for this correlation (which could also be associated with olfactory loss) would be related to alpha-synuclein. A reduction in UA would allow greater concentrations of iron and OS/NS to favor changes in the alpha-synuclein conformation with consequent pathological expression. Considering that the olfactory bulb is rich in alpha-synuclein and the olfactory tubercle highly expresses PON-2, we hypothesize whether alpha-synuclein would be the link in the correlation between UA and PON-1 with possible olfactory effects.

Our study found a positive correlation between PON-1 and SH in patients with severe hyposmia ($p: 0,043$). Both are statistically reduced in patients with PD. This correlation suggests the role of OS/NS in PD when the reduction in thiol values is correlated with the reduction in PON-1, both with antioxidant activity.

In the multiple regression analysis, we found that the most significant result was in severe hyposmia, using PON-1 as a dependent variable and AOPP, SH, TAG and UA as explanatory variables. AOPP has been found to be elevated in PD patients and measures protein damaged by OS/NS processes (MEDEIROS *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ-ESPEJO, 2019). AOPP has properties that interfere with HDL metabolism by blocking SRBI (scavenger receptor B, type I) receptors that act in reverse cholesterol transport, increasing cardiovascular risks. Low HDL levels are predictors of higher lipid peroxidation (MARSCHE *et al.*, 2009; OU *et al.*, 2017), and since PON-1 is associated with HDL, an increase in AOPP could interfere with normal HDL metabolism with consequent change in PON-1. This would be a plausible explanation for the multiple regression findings.

Nevertheless, this work had limitations. The composition of a PD subgroup in normosmia would be essential for comparison purposes, especially in relation to the variables of OS/NS. The composition of this subgroup would allow us to directly compare the results of the OS/NS parameters of these with the other subgroups "cases", isolating the OS/NS associated with PD. Unfortunately, this limitation did not allow us to state whether the variables that differed between individuals in the "cases" and controls subgroups are associated with olfactory loss or if they are only associated with PD. Moreover, the convenience sample resulted in a small number of

subjects in the other evaluated subgroups. Considering this, multicentric studies, with access to more individuals, could better assess the oxidative/nitrosative profile of patients with milder symptoms of olfactory loss.

In conclusion, we have found that the OS/NS markers are altered in PD patients who have olfactory loss. Although we were not able to categorically establish the association of biomarkers with the smell impairment, the fact that patients at the same clinical stage (Hoehn-Yahr = 2) presented different degrees of olfactory loss (anosmia and severe hyposmia) suggests that the differences observed in OS/NS biomarkers between subgroups, such as PON and LOOH, might be somewhat associated with the olfactory loss. Additionally, considering that alpha-synuclein is known to be present in higher concentrations in the olfactory bulb, and that smell disturbances are prodromal symptoms of PD, we believe that there is an inter-relation between the redox state and alpha-synuclein in the olfactory loss process. However, more studies are necessary to confirm this, with a larger number of participants and, possibly, broader spectrum of exams, including biopsy of the olfactory epithelium and bulb.

References

- AGIL, A. et al. Olfactory dysfunction in the pathophysiological continuum of dementia. **Movement Disorders**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2013. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>>.
- BELIN, A. C. et al. Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 522, n. 1, p. 30–35, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.007>>.
- BOHNEN, N. I.; MULLER, M. L. T. M. Is normosmic Parkinson disease a unique clinical phenotype? **Neurology**, v. 86, n. 17, p. 1649–1650, 2016.
- DE FARIAS, C. C. 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. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 66–71, 2016. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>>.

DE FARIAS, C. C. et al. Parkinson's Disease is Accompanied by Intertwined Alterations in Iron Metabolism and Activated Immune-inflammatory and Oxidative Stress Pathways. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 4, p. 484–491, 2017.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1237–1244, 1988.

FANG, F. et al. Lipids, Apolipoproteins, and the Risk of Parkinson Disease: A Prospective Cohort Study and a Mendelian Randomization Analysis. **Circulation Research**, p. 643–652, 2020.

FOLSTEIN, M. F., FOLSTEIN, S. E., & MCUGH, P. R. Mini-mental state: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, 12(3), 189–198. (1975). [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6).

FORNAZIERI, M. A. et al. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the university of pennsylvania smell identification test. **Chemical Senses**, v. 40, n. 2, p. 141–149, 2015.

FERNÁNDEZ-ESPEJO, E. Is there a halo-enzymopathy in Parkinson's disease? **Neurologia**, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.12.008>>.

FURLONG, C. E. et al. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 51–62, 2016. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.036>>.

GOETZ, C. G. et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. **Movement Disorders**, v. 19, n. 9, p. 1020–1028, 2004.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)>.

KHAN, Z.; ATHAR ALI, S. Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Iranian Journal of Neurology**, v. 17, n. 3, p. 137–144, 2019.

KIM, T. H.; LEE, J. H. Serum Uric acid and nigral iron deposition in Parkinson's disease: A pilot study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–5, 2014.

KIRBAS, A. et al. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with idiopathic Parkinson's disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 451–455, 2014.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 955–965, 2016. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>>.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)>.

OPPO, V. et al. “Smelling and Tasting” Parkinson's Disease: Using Senses to Improve the Knowledge of the Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, n. February, p. 1–7, 2020.

MARSCHE, G. et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. **Circulation Research**, v. 104, n. 6, p. 750–757, 2009.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, 2015.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

ROSSI, M. et al. Motor features in Parkinson's disease with normal olfactory function. **Movement Disorders**, v. 31, n. 9, p. 1414–1417, 2016.

SAITO, Y. et al. Lewy body pathology involves the olfactory cells in Parkinson's

disease and related disorders. **Movement Disorders**, v. 31, n. 1, p. 135–138, 2016.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.62>>.

SCIGLIANO, G. et al. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: A case-control study. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1184–1188, 2006.

SHARMA, A. et al. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, n. 1, p. 52–57, 2008.

SHEN, L.; JI, H. F. Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: Evidence from meta-analysis. **BMJ Open**, v. 3, n. 11, 2013.

SHENG, Y. L. et al. Urate promotes SNCA/ α -synuclein clearance via regulating mTOR-dependent macroautophagy. **Experimental Neurology**, v. 297, n. May, p. 138–147, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.007>>.

SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, p. 318–324, 2016.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. 1–23, 2019a.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. 1–23, 2019b.

VALLI, A. et al. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors. **Clinica Chimica Acta**, v. 379, n. 1–2, p. 87–94, 2007.

WEI, Q. et al. Reduced Serum Levels of Triglyceride, Very Low Density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein B in Parkinson's Disease Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–8, 2013.

6. CONCLUSÃO

Em nosso estudo encontramos que os marcadores de EO/EN estavam alterados nos pacientes com DP e que possuem perda olfatória. Os marcadores bioquímicos TAG e AU estiveram reduzidos no grupo de pacientes com DP. Os marcadores antioxidantes PON-1 e SH foram encontrados reduzidos no grupo DP em relação ao grupo controle, e o marcador pro-oxidante LOOH esteve aumentado no grupo DP. Ao subdividir o grupo pacientes DP em graus de perda olfatória vimos que LOOH mantém-se aumentado no grupo hiposmia severa, mas não de forma estatisticamente significativa no grupo anosmia. Os valores de PON-1 encontram-se reduzidos quer no grupo anosmia quanto no hiposmia severa. As correlações existentes entre os mais diversos biomarcadores e os resultados de regressão múltipla inferem o papel do EO na DP. Como não obtivemos grupo de pacientes DP com preservação do olfato, não podemos averiguar se algum dos biomarcadores bioquímicos e de EO/EN estaria vinculado especificamente à perda olfatória. Como o grupo pacientes apresentava-se em mesma escala clínica de DP (Hoehn-Yahr 2) podemos sugerir que as diferenças numéricas entre PON e LOOH nos grupos anosmia/hiposmia severa possam ser vinculadas ao processo de perda olfatória, apesar das diferenças serem numéricas e não haver valor estatisticamente significativo para esta suposição.

Estando a alfa-sinucleína presente em maiores concentrações no bulbo olfatório, sendo o olfato um sintoma prodrômico de DP, e o EO/EN estar relacionado à fisiopatologia desta doença, podemos supor que haja uma interrelação entre este estado redox e a alfa-sinucleína no processo de perda olfatória destes pacientes.

Estudos posteriores poderão ser feitos, principalmente caso encontremos pacientes com DP mas ainda com preservação do olfato, quando poderemos repetir estas análises e estudar as relações entre EO/EN, DP e perda olfatória, inclusive com biópsia de epitélio e bulbo olfatórios.

7. REFERÊNCIAS

- AGIL, A. et al. Olfactory dysfunction in the pathophysiological continuum of dementia. **Movement Disorders**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>>.
- ATTEMS, J.; WALKER, L.; JELLINGER, K. A. Olfaction and Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 485–490, 2015.
- BAGNOLI, E.; FITZGERALD, U. **Mitral cells and the glucagon-like peptide 1 receptor: The sweet smell of success?** [s.l.: s.n.]v. 49
- BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. July, p. 1–9, 2015.
- BRUCKI, S. M. D. et al. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 3 B, p. 777–781, 2003.
- DE FARIAS, C. C. 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. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 66–71, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>>.
- DI MEO, S.; VENDITTI, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.
- DOTY, R. L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1237–1244, 1988.
- DUYCKAERTS, C.; CLAVAGUERA, F.; POTIER, M. C. The prion-like propagation hypothesis in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 32, n. 2, p. 266–271, 2019.
- FERRER, I. et al. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: Preclinical Parkinson disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 5, p. 821–839, 2011.
- FORNAZIERI, M. A. et al. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the university of pennsylvania smell identification test. **Chemical Senses**, v. 40, n. 2, p. 141–149, 2015.
- GOETZ, C. G. et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. **Movement Disorders**, v. 19, n. 9, p. 1020–1028, 2004.
- HADLEY, K.; ORLANDI, R. R.; FONG, K. J. Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 37, n. 6 SPEC.ISS., p. 1115–1126,

2004.

HUSSAIN, A. et al. Inhibition of oxidative stress in cholinergic projection neurons fully rescues aging-associated olfactory circuit degeneration in drosophila. **eLife**, v. 7, p. 1–20, 2018.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)>.

KLINGELHOEFER, L.; REICHMANN, H. Pathogenesis of Parkinson disease - The gut-brain axis and environmental factors. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 11, p. 625–636, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2015.197>>.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 955–965, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>>.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)>.

NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094–4125, 2016.

OPPO, V. et al. “Smelling and Tasting” Parkinson's Disease: Using Senses to Improve the Knowledge of the Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, n. February, p. 1–7, 2020.

PINTO, J. M. Olfaction. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 8, n. 1, p. 46–52, 2011.

PIRTOŠEK, Z. et al. Update on the Management of Parkinson's Disease for General Neurologists. **Parkinson's Disease**, v. 2020, 2020.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, 2015.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

QUAGLIATO, L. B. et al. Alterações do olfato na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 3 A, p. 647–652, 2007.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777–783, 2016.

REY, N. L.; WESSON, D. W.; BRUNDIN, P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 109, p. 226–248, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.013>>.

RIETDIJK, C. D. et al. Exploring Braak's hypothesis of parkinson's disease. **Frontiers in**

Neurology, v. 8, n. FEB, 2017.

ROSS, G. W. et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 2, p. 167–173, 2008.

SAITO, Y. et al. Lewy body pathology involves the olfactory cells in Parkinson's disease and related disorders. **Movement Disorders**, v. 31, n. 1, p. 135–138, 2016.

SARKAR, S.; RAYMICK, J.; IMAM, S. Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: Recent perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

SILVEIRA-MORIYAMA, L. et al. The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil. **Movement Disorders**, v. 23, n. 16, p. 2328–2334, 2008.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Ageing Cell**, v. 18, n. 6, p. 1–23, 2019a.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Ageing Cell**, v. 18, n. 6, p. 1–23, 2019b.

URBAN, N.; TRIPATHY, S. Circuits drive cell diversity. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 289–290, 2012.

WEI, Q. et al. Reduced Serum Levels of Triglyceride, Very Low Density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein B in Parkinson's Disease Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–8, 2013.

WITT, M. et al. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 6, p. 906–914, 2009.

8. ANEXOS



ANEXO – 8.1



AVALIAÇÃO DA PERCEPÇÃO OLFATIVA EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON E SUA RELAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIO.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, deste projeto de pesquisa que tem por finalidade avaliar a função olfatória nos pacientes portadores de Doença de Parkinson e dosar marcadores séricos bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamação.

2. Nas datas habituais de consulta em nosso ambulatório você será submetido a um teste de olfato. Raspará tiras de papel e tentará identificar o odor das substâncias liberadas. Posteriormente, quando realizar exames que de rotina no laboratório de nosso serviço realizaremos testes sanguíneos para avaliação bioquímica, estresse oxidativo e inflamação.

3. No teste de olfato não há riscos para você. Na coleta de sangue os riscos são os inerentes à qualquer coleta sanguínea: dor, ardor e tontura (eventual). Caso ocorra qualquer sintoma o serviço de laboratório é preparado para dar atendimento e orientações necessárias.

4. Há benefícios em avaliar sua função olfatória assim como avaliar seu perfil metabólico sanguíneo. Caso haja alterações a equipe médica poderá dar a condução necessária.

5. Não terá despesa alguma ao participar da pesquisa e poderá deixar de participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e não haverá qualquer prejuízo.

6. Você está sendo e está ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por sua participação. Caso haja qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, será ressarcido no valor gasto. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente de sua participação no estudo, será devidamente indenizado.

7. Seu nome será mantido em sigilo. Se eu desejar terá livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que queira saber antes, durante e depois da minha participação.

8. Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com o Prof. Lucio Baena de Melo, médico neurologista, telefone: 33712268, e-mail: lucio@lucioabaena.com ou Prof. Décio Sabbatini Barbosa, pesquisador responsável pela pesquisa, telefone 3371-2451, e-mail: sabatini@uel.br; com os pesquisadores Nayara Rampazzo Morelli e Thiago Hissnauer Leal Baltus, e/ou com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UEL, localizado na Av. Robert Koch, 60, Londrina. 33712000.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Londrina, ____ de _____ de 20__.

Ass. do participante

Ass. de testemunha

Ass. do pesquisador

ANEXO – 8.2

MDS Critérios Diagnósticos para DOENÇA DE PARKINSON E ESCALA DE HOEHN E YAHR MODIFICADA

Primeiro critério essencial é **PARKINSONISMO**, definido como **BRADICINESIA**, em combinação com **TREMOR** e/ou **RIGIDEZ**.
Uma vez diagnosticado **PARKINSONISMO**, definir:

DIAGNÓSTICO DE DP CLINICAMENTE ESTABELECIDO:

1. Ausência de critérios de exclusão. 2. No mínimo **dois** critérios de suporte. 3. Sem **red flags**.

DIAGNÓSTICO DE DP CLINICAMENTE PROVÁVEL:

1. Ausência de critérios de exclusão.
2. Se presença de **red flags**, contrabalancear com critérios de suporte:
Se 1 **red flag** presente, deve haver ao menos 1 critério de suporte.
Se 2 **red flags** presentes, deve haver pelo menos 2 critérios de suporte. Não mais do 2 **red flags** são permitidos.

CRITÉRIOS DE SUPORTE

- 1. Clara e dramática resposta benéfica à terapia dopaminérgica. Durante tratamento inicial paciente deve retornar ao normal ou próximo ao normal em suas funções. Na ausência de clara documentação de resposta inicial, uma resposta dramática pode ser classificada como:
 - a) Marcada melhora com aumento de dose ou piora com redução de doses. Mudanças leve não qualificam. Documentar de forma objetiva (>30% UPDRS III com mudança no tratamento), ou subjetiva (histórias de mudanças referidas pelo paciente ou cuidador).
 - b) Inequívoca e marcada flutuações on/off, which must have at some point included predictable end-of-dose wearing off.
- 2. Presença de discinesia levodopa induzida.
- 3. Tremor de repouso em membro.
- 4. Presença de perda olfatória ou denervação simpática cardíaca à cintilografia (MIBG)

CRITÉRIOS ABSOLUTOS DE EXCLUSÃO – A presença de qualquer deles exclui DP.

- 1. Inequívocas anormalidades cerebelares, tais como marcha cerebelar, ataxia de membros ou anormalidades oculomotoras cerebelares.
- 2. Paralisia supranuclear do olhar vertical para baixo, ou lentificação das sacadas verticais para baixo.
- 3. Diagnóstico de provável demência fronto temporal ou afasia primária progressiva dentro dos primeiros 5 anos de doença.
- 4. Características parkinsonianas restritas aos MMII por mais que 3 anos.
- 5. Tratamento com bloqueador de receptor dopaminérgico ou agente depletor de dopamina em dose e tempo consistente com parkinsonismo induzido por drogas.
- 6. Ausência de resposta à alta dose de levodopa apesar da doença pelo menos moderada.
- 7. Inequívoca perda sensorial cortical (grafestesia, estereognosia) apraxia e afasia progressiva.
- 8. Neuroimagem funcional normal.
- 9. Condições outras causadores de parkinsonismo.

RED FLAGS

- 1. Rápida progressão de piora da marcha necessitando de cadeira de rodas dentro de 5 anos de doença.
- 2. Ausência de progressão dos sintomas ou sinais após 5 anos a menos que a estabilidade seja relacionada ao tratamento.
- 3. Disfunção bulbar precoce.
- 4. Disfunção respiratória (inspiratória).
- 5. Severa falência autonômica dentro dos primeiros 5 anos de doença (hipotensão ortostática e retenção/incontinência urinária).
- 6. Recorrente quedas por alterações de equilíbrio dentro dos 3 primeiros anos de doença.
- 7. Desproporcional anterocolo (distônico) ou contratura mãos/pés nos primeiros 10 anos de doença.
- 8. Ausência de manifestações não motoras apesar de 5 anos de doença (distúrbio de sono, constipação, urgência urinária, hiposmia, depressão, ansiedade, alucinação).
- 9. Sinais piramidais inexplicáveis.
- 10. **PARKINSONISMO BILATERAL SIMÉTRICO.**

A P L I C A Ç Ã O D O S C R I T É R I O S

1. O paciente tem parkinsonismo? SIM () NÃO (). Se **NÃO**: nem provável DP nem DP clinicamente estabelecida pode ser diagnosticada. Se **SIM**:
2. Há algum critério de absoluto de exclusão? SIM () NÃO (). Se **SIM**: nem provável DP nem DP clinicamente estabelecida pode ser diagnosticada. Se **NÃO**:
3. Número de **red flags**: ____

4. Número de critérios de suporte: ____

5. Há pelo menos **2 critérios de suporte e nenhum red flag**? SIM () NÃO ().

Se **SIM**: critérios para **DP CLINICAMENTE ESTABELECIDO**.

Se **NÃO**:

6. Há mais que 2 **red flags**? SIM () NÃO ().

Se **SIM**: **DP Provável NÃO pode ser diagnosticada**.

Se **NÃO**:

7. Há número de red flags igual ou, pelo menos menor que o número de critérios de suporte? SIM () NÃO ()

Se **SIM**: **critérios para DP Provável**.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, 2015.

E S C A L A D E E S T A D I A M E N T O D E H O E H N E Y A H R M O D I F I C A D A
--

ESTÁGIO 0 = nenhum sinal da doença.

ESTÁGIO 1 = doença unilateral.

ESTÁGIO 1,5 = envolvimento unilateral e axial.

ESTÁGIO 2 = doença bilateral sem comprometer o equilíbrio.

ESTÁGIO 3 = doença bilateral de leve a moderada, alguma instabilidade postural, fisicamente independente.

ESTÁGIO 4 = incapacidade grave, ainda capaz de ficar ereto sem ajuda.

ESTÁGIO 5 = preso à cadeira de rodas ou leito. Necessita de ajuda.

GOETZ, C. G. et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. **Movement Disorders**, v. 19, n. 9, p. 1020–1028, 2004.

ANEXO – 8.3

Gabarito UPSIT

1	B
2	B
3	D
4	D
5	C
6	B
7	A
8	B
9	C
10	B

11	C
12	B
13	A
14	D
15	B
16	D
17	A
18	A
19	B
20	C

21	A
22	A
23	B
24	A
25	B
26	C
27	D
28	B
29	B
30	D

31	D
32	C
33	C
34	A
35	D
36	D
37	A
38	D
39	B
40	A

Classificação UPSIT

	Mulheres	Homens
Normosmia	35 - 40	32 - 40
Microsmia leve	31 - 34	28 - 31
Microsmia moderada	26 - 30	24 - 27
Microsmia severa	19 - 25	17 - 23
Anosmia	< 18	< 16

FORNAZIERI, M. A. et al. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the university of pennsylvania smell identification test. **Chemical Senses**, v. 40, n. 2, p. 141–149, 2015.

9. APÊNDICES

APÊNDICE – 9.1

PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON IDIOPÁTICO

Favor perguntar a todos os pacientes com Parkinson Idiopático:

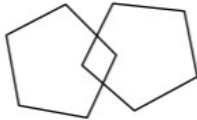
Fumante: SIM () NÃO ()

Patologia nasal/olfatória? SIM () NÃO ()

Sente alguma alteração olfatória? SIM () NÃO ()

Se **NÃO** para as duas questões:

Aplicar Minimental Test:

<p>Orientação Temporal Espacial</p> <p>1. Qual é o (a) Dia da semana? ___ 1 Dia do mês? ___ 1 Mês? ___ 1 Ano? ___ 1 Hora aproximada? ___ 1</p> <p>2. Onde estamos?</p> <p>Local? ___ 1 Instituição (casa, rua)? ___ 1 Bairro? ___ 1 Cidade? ___ 1 Estado? ___ 1</p> <hr/> <p>Registros</p> <p>1. Mencione 3 palavras levando 1 segundo para cada uma. Peça ao paciente para repetir as 3 palavras que você mencionou. Estabeleça um ponto para cada resposta correta.</p> <p>-Vaso, carro, tijolo _____ 3</p> <hr/> <p>3. Atenção e cálculo Sete seriado (100-7=93-7=86-7=79-7=72-7=65). Estabeleça um ponto para cada resposta correta. Interrompa a cada cinco respostas. Ou soletrar a palavra MUNDO de trás para frente. _____ 5</p> <hr/> <p>4. Lembranças (memória de evocação) Pergunte o nome das 3 palavras aprendidas na questão 2. Estabeleça um ponto para cada resposta correta. _____ 3</p>	<p>Linguagem</p> <p>5. Aponte para um lápis e um relógio. Faça o paciente dizer o nome desses objetos conforme você os aponta _____ 2</p> <p>6. Faça o paciente. Repetir “nem aqui, nem ali, nem lá”. _____ 1</p> <hr/> <p>7. Faça o paciente seguir o comando de 3 estágios. “Pegue o papel com a mão direita. Dobre o papel ao meio. Coloque o papel na mesa”. _____ 3</p> <p>8. Faça o paciente ler e obedecer ao seguinte: FECHE OS OLHOS. _____ 1</p> <p>09. Faça o paciente escrever uma frase de sua própria autoria. (A frase deve conter um sujeito e um objeto e fazer sentido). (Ignore erros de ortografia ao marcar o ponto) _____ 1</p> <hr/> <p>10. Copie o desenho abaixo. Estabeleça um ponto se todos os lados e ângulos forem preservados e se os lados da interseção formarem um quadrilátero. _____ 1</p> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div>
---	--

Pontos de corte – MEEM Brucki et al. (2003)

20 pontos para **analfabetos**

25 pontos para idosos com **1 a 4 anos de estudo**

26,5 pontos para idosos com **5 a 8 anos de estudo**

28 pontos para aqueles com **9 a 11 anos de estudo**

29 pontos para aqueles com **+ de 11 anos de estudo**

APÊNDICE – 9.2

AVALIAÇÃO DA PERCEÇÃO OLFATIVA EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON E A RELAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS.

Data da avaliação: ____/____/____

Identificação:

Nome: _____

RG HU: _____

Idade: ____ Data de Nascimento: ____/____/____ M () F ()

Estado Civil: solteiro () casado () divorciado () viúvo ()

Raça: ()br ()n ()par ()ama ()indig

Telefone para contato: _____

Se não houver telefone: Endereço: _____

Escolaridade e MMS:

Analfabeto () 1 a 4 anos () 5 a 8 anos () 9 a 11 anos () + de 11 anos ()

20 25 26 28 29

Atividade física regular (3x/sem, 30m): () sim () não

Álcool () Não consome () diário (5 a 6 x/semana)

() semanal (3x ou menos) () esporádico (uma vez/mês)

HOEHN & YAHR: ____

ESTÁGIO 0 = nenhum sinal da doença.

ESTÁGIO 1 = doença unilateral.

ESTÁGIO 1,5 = envolvimento unilateral e axial.

ESTÁGIO 2 = doença bilateral sem comprometer o equilíbrio.

ESTÁGIO 3 = doença bilateral de leve a moderada, alguma instabilidade postural, fisicamente independente.

ESTÁGIO 4 = incapacidade grave, ainda capaz de ficar ereto sem ajuda.

ESTÁGIO 5 = preso à cadeira de rodas ou leito. Necessita de ajuda.

Qto tempo de DP? _____

Medicamento atual (doses e tempo): _____

Diabetes () Sim () Não

Doença tireoidiana () Sim () Não

Gastroplastia () Sim () Não

Outros medicamentos: _____

UPSIT: _____ (pontuação)

Classificação

	Mulheres	Homens
Normosmia	35 - 40	32 - 40
Microsmia leve	31 - 34	28 - 31
Microsmia moderada	26 - 30	24 - 27
Microsmia severa	19 - 25	17 - 23
Anosmia	< 18	< 16