

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOFARMACOLÓGICOS E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM SINTOMAS NÃO-MOTORES NA
DOENÇA DE PARKINSON**

Natália Pessoa Rocha

Belo Horizonte
2014

Natália Pessoa Rocha

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOFARMACOLÓGICOS E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM SINTOMAS NÃO-MOTORES NA
DOENÇA DE PARKINSON**

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Helton José Reis

Co-orientador: Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
2014

Rocha, Natália Pessoa.

Estudo de marcadores imunofarmacológicos e suas associações com sintomas não-motores na doença de Parkinson. [manuscrito] / Natália Pessoa Rocha. – 2014.

176f.: il ; 29,5 cm.

Orientador: Helton José Reis. Co-orientador: Antônio Lúcio Teixeira Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

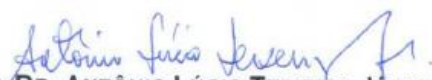
1. Parkinson, Doença de – Teses. 2. Cérebro - Doenças - Teses. 3. Citocinas – Teses. 4. Inflamação – Aspectos imunológicos - Teses. 5. Fisiologia e Farmacologia – Teses. 6. Imunofarmacologia – Teses. 7. Cognição. 8. Depressão - Teses. I. Reis, Helton José. II. Teixeira Júnior, Antônio Lúcio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

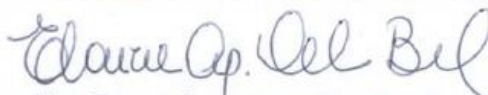
**"ESTUDO DE MARCADORES IMUNOFARMACOLÓGICOS E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM SINTOMAS NÃO-MOTORES NA
DOENÇA DE PARKINSON"**

NATALIA PESSOA ROCHA

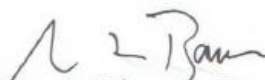
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **06 de novembro de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANTÔNIO LÚCIO TEIXEIRA JÚNIOR
FACULDADE DE MEDICINA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR. ELAINE APARECIDA DEL BEL BELLUZ GUIMARÃES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA/USP-RP



PROF. DR. MOISÉS EVANDRO BAUER
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS/PUC-RS



PROF. DR. KENNETH JOHN GOLLOB
INSTITUTO ENSINO PESQUISA/SANTA CASA BH



PROFA. DR. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. HELTON JOSÉ DOS REIS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 06 de novembro de 2014

REITOR:

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Profa. Andrea Mara Macedo

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA:

Prof. Dr. Christopher Kushmerick

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA:

Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

Prof. Dr. Candido Celso Coimbra

Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard

Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos

Prof. Dr. Miguel José Lopes

Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes

Prof. Dr. Silvia Carolina Guatimosim
Fonseca

Prof. Dr. Steyner de França Côrtes

Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos

Frederico Sander Mansur Machado e
Marcelo Limborço Filo (representantes
discentes).

Dedico esse trabalho aos meus pais. Pelo amor, carinho e confiança. Por serem minha grande inspiração e os maiores responsáveis por todas minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes na construção deste projeto. Peço licença a todas elas para iniciar agradecendo à profa. Luciene Vieira, minha grande amiga Lu, que foi quem me trouxe ao laboratório e muito além disso, sempre esteve alegre e irradiante ao meu lado, em todos os momentos.

Agradeço aos meus orientadores professores Antônio Lúcio Teixeira e Helton José dos Reis, pela ajuda imprescindível, pela amizade, carinho, confiança, e por terem me ensinado mais do que conhecimentos técnicos-científicos. Obrigada por terem permitido que eu desenvolvesse competências e habilidades muito importantes para a vida pessoal e profissional. Vocês são meu exemplo.

Devo os resultados desta tese aos voluntários participantes do projeto e seus cuidadores, cujas contribuições são imensuráveis. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pela professora Paula Scalzo, Dra. Mariana Souza e Dr. Paulo Christo, além dos residentes do Serviço de Neurologia do grupo Santa Casa de Belo Horizonte. Obrigada pela imensa ajuda. A avaliação cognitiva e de sintomas depressivos de todos os participantes só foi possível com os ensinamentos da Dra. Izabela Guimarães Barbosa, a qual também auxiliou-me ativamente na coleta dos controles. Obrigada Belinha, por toda amizade, carinho, dedicação e por todos os ensinamentos.

O professor Mauro Martins Teixeira teve papel fundamental na execução deste projeto por permitir com bastante generosidade que o manejo e armazenamento das amostras biológicas e a execução das análises laboratoriais ocorressem no Laboratório de Imunofarmacologia. Aproveito para agradecer a todos os membros do Laboratório de Imunofarmacologia pelo convívio harmonioso, em especial à Ilma Marçal Souza e MSc. Frankinéia Assis, cujos trabalhos são excepcionais para o bom andamento do laboratório. Preciso mencionar aqui que todos os experimentos de citometria de fluxo foram prazerosamente realizados com o auxílio da Frank, quem me ensinou e planejou juntamente comigo todos os experimentos e análises. Agradeço especialmente também à MSc. Fátima Brant, sempre disposta a ajudar a qualquer hora.

Para realizar as dosagens das citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos, pude contar com a ajuda da Dra. Érica Vieira. Obrigada por ter chegado depois e completado nosso

time. Nós precisávamos de uma mãe no grupo e você foi mais que perfeita nessa função. Obrigada pelos conselhos, por toda ajuda e por me escutar em momentos críticos.

Minha aluna de iniciação científica, Isabela Boechat, auxiliou-me em todas as etapas desse projeto. Agradeço Isabelina pela educação, pelo carinho e dedicação ao nosso projeto.

O apoio e carinho dos amigos Dra. Márcia Vilela, Dr. David Rodrigues e professora Vanessa Amaral foram importantíssimos para a realização deste trabalho. A alegria e a paz de vocês nos fazem muita falta. Mais do que especial para mim nesse período foi a amizade conquistada com a MSc. Aline Miranda. Aline, não tenho palavras para agradecer as madrugadas em que você ficou no ICB comigo só para me acompanhar, mesmo não fazendo parte “oficialmente” deste projeto. Obrigada por dividir comigo momentos difíceis que passei nesse período. Obrigada por todo carinho e amizade que cultivamos.

No final do doutorado tive ainda a sorte de conviver com novas pessoas, mais do que especiais, no novo laboratório (LIIM): professora Ana Cristina, professores Arthur e Cristiano, Salvina, Nayara, Leo, Gabi e Du, é um prazer conviver com vocês. Rodrigo chulips me deixa sem palavras (você é demais, você é demais....).

Os dados da pesquisa realizada durante o estágio sanduíche na KULeuven são merecidamente creditados à equipe do *Laboratory for Enteric Neuroscience (LENS)*: professor Pieter Vanden Berghe, Dra. Carla Cirillo, Dr. Werend Boesmans, doutoranda An-Sofie Desmet e os técnicos de laboratório Aneleen Geuzes, Lies De Dier e Michael Moons. *I would like to thank the members of TARGID for all the caring, trust, teaching and for receiving me so well. I will always be grateful. You have given me a wonderful year in my life.*

Parte do meu aprendizado nesse período eu obtive no Centro Universitário Una. Por isso eu gostaria de agradecer aos meus alunos pela oportunidade de “aprender a ensinar”, aos meus colegas de trabalho e toda a equipe Una, especialmente professor Peterson Tonini, pela acolhida, confiança e por ter acreditado no meu potencial.

Agradeço às agências de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro necessário para realização deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família: meus pais, Dani, Lu, Mari, JP, Gugu, Teteu, Júlia e Guilherme, vocês são a razão da minha vida. Obrigada aos meus amigos pelo apoio nesse período, em especial Helen, Loaise, Pedro, Gra, Dadazinha. Obrigada Vê pela amizade de toda uma vida. Obrigada meus amigos de Leuven, por terem sido minha família: Diogo, Cláudia, Mari, Karlinha, Gegê, Cadu, Pedrão, Carla (a Cirillo), Giovanna, Katrien e tantos outros amigos que fiz nessa caminhada. Sou uma pessoa de sorte e agradeço a Deus pela oportunidade de ter convivido com cada um de vocês. Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida. Muito obrigada!

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”*

João Guimarães Rosa

Resumo

Apesar de ser considerada um distúrbio motor, a Doença de Parkinson (DP) também apresenta sintomas não motores (SNM), que podem ser considerados tão incapacitantes como os motores. Mecanismos inflamatórios têm sido implicados em uma série de SNM, incluindo distúrbios comportamentais, comprometimento cognitivo e transtornos do humor, notadamente sintomas depressivos. Evidências sugerem que alterações imunes/inflamatórias também estejam associadas ao processo fisiopatológico envolvido na DP. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar SNM na DP, sobretudo sintomas depressivos e déficit cognitivo, e verificar se essas variáveis clínicas estão associadas com alterações imunes/inflamatórias no sangue periférico desses pacientes. Para isso, 48 pacientes diagnosticados com DP e 29 controles foram submetidos à avaliação clínica e à coleta do sangue periférico para análise de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos no plasma e para imunofenotipagem e avaliação de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos nos leucócitos. Pacientes com DP demonstraram pior desempenho cognitivo e maior pontuação na escala de sintomas depressivos do que controles. A gravidade dos sintomas depressivos está associada à gravidade da doença, segundo a escala motora utilizada. Em relação às moléculas avaliadas no plasma, os receptores solúveis do fator de necrose tumoral (sTNFRs) encontram-se com níveis significativamente aumentados no plasma de pacientes com DP. Além disso, aumento nos níveis de sTNFRs e da quimiocina IP-10 estão associados a pior desempenho cognitivo entre os pacientes com DP. Em relação à imunofenotipagem, observamos que pacientes com diagnóstico de DP apresentaram menor porcentagem de linfócitos T (CD3+), especificamente menor porcentagem de linfócitos T ativados no sangue periférico em comparação aos controles. Corroborando esses resultados, pacientes com DP apresentaram níveis plasmáticos reduzidos das citocinas inflamatórias IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A. Experimentos *in vitro* utilizando células de indivíduos jovens e saudáveis demonstraram diminuição na produção de citocinas células mononucleares do sangue periférico após estímulo com os fármacos antiparkinsonianos levodopa e pramipexol. Além disso, a porcentagem de expressão de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos encontra-se alterada no sangue periférico de pacientes com DP. Ainda não está claro se as diferenças encontradas decorrem de mecanismos de adaptação frente às alterações que ocorrem com a doença, incluindo o tratamento farmacológico ou se estão diretamente relacionadas à fisiopatologia da mesma. São necessários mais estudos nesse aspecto.

Abstract

Although Parkinson's disease (PD) is considered a motor disturbance, non-motor symptoms (NMS) associated with PD are considered as disabling as the motor signs. Inflammatory mechanisms have been implicated in a series of NMS including behavioral disturbances, cognitive dysfunction and mood disorders, especially depressive symptoms. Accumulating evidence strongly suggest the involvement of inflammation in PD pathophysiology. Therefore, this study aimed to assess NMS in PD, mainly depressive symptoms and cognitive deficit and evaluate the association of these clinical variables with immune/inflammatory changes in the peripheral blood. For that reason, we enrolled 48 PD patients and 29 controls, who were subject to the clinical evaluation and peripheral blood drawn. We analyzed plasma levels of cytokines, chemokines, neurotrophic factors and we performed immunophenotyping and assessment of dopaminergic and serotonergic receptors in the leukocytes. PD patients presented poorer performance on the cognitive tests and higher scores on the depressive symptoms scale in comparison with controls. In addition, the severity of depressive symptoms was associated with disease severity, as evaluated by the motor scale. Regarding the plasma molecules, PD patients presented higher levels of soluble tumor necrosis factor receptors (sTNFRs) than control individuals. Among PD patients, higher sTNFRs and IP-10 levels were associated with poorer cognitive tests scores. Regarding immunophenotyping data, PD patients presented decreased percentage of T lymphocytes (CD3+), specifically lower percentage of T activated lymphocytes (CD4+CD25+) when compared to controls. Corroborating these results, PD patients presented reduced plasma levels of the inflammatory cytokines IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A. *In vitro* experiments using cells from healthy and young donors demonstrated that the production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells was reduced after exposure to the antiparkinsonian drugs levodopa and pramipexole. In addition, the percentages of expression of dopaminergic and serotonergic receptors are altered in the peripheral blood of PD patients. It is not clear if the differences that we have found are due to adaptive mechanisms to the changes that occur in PD, including pharmacological treatment, or if they are directly related to the disease pathophysiology. More studies are needed in this regard.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT = serotonina

5-HTR = receptor serotoninérgico

5-HTT = transportador de serotonina

AKT = proteína quinase B

BAF = bateria de avaliação frontal

BDI = inventário de depressão de Beck

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA = albumina de soro bovino

COEP = comitê de ética em pesquisa

CNTF = fator neurotrófico ciliar

DARPP32 = fosfoproteína regulada por dopamina e cAMP

DP = doença de Parkinson

DR = receptor dopaminérgico

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

ELISA = ensaio imunoenzimático

GDNF = fator neurotrófico derivado das células gliais

H&Y = escala de estágios de incapacidade de Hoehn e Yahr

IL = interleucina

IFN = interferon

IMC = índice de massa corporal

IP-10 = proteína induzida por interferon gama-10

MCP-1 = proteína quimioatratadora de monócitos-1

MEEM = mini-exame do estado mental

NGF = fator de crescimento neural

NT = neurotrofina

OPD = Ø-fenileno-diamina

PBS = tampão fosfato-salina

S&E = escala de atividades de vida diária de Schwab e England

SNM = sintomas não motores

SNPc = substância negra *pars compacta*

sTNFR = receptor solúvel do fator de necrose tumoral

TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido

TNF = fator de necrose tumoral

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

UPDRS = escala unificada de avaliação da Doença de Parkinson

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas avaliadas por ELISA.....	33
Tabela 2: Subtipos celulares, receptores de neurotransmissores e proteínas intracelulares avaliados por citometria de fluxo.	35
Tabela 3: Características clínicas (não motoras) e demográficas dos participantes da pesquisa incluídos nas dosagens de citocinas e fatores neurotróficos.....	38
Tabela 4: Características clínicas (motoras) dos pacientes com doença de Parkinson incluídos nas dosagens de citocinas e fatores neurotróficos.	3948
Tabela 5: Concentrações plasmáticas (pg/mL) das adipocinas, receptores solúveis, quimiocinas e fatores neurotróficos avaliados em pacientes com DP e controles.	4049
Tabela 6: Correlações entre variáveis clínicas / citocinas / fatores neurotróficos e escalas utilizadas para avaliar desempenho cognitivo e sintomas depressivos.	42
Tabela 7: Características clínicas (não motoras) e demográficas dos participantes da pesquisa incluídos nas análises dos receptores de serotonina e dopamina e proteínas de sinalização intracelulares.....	95
Tabela 8: Características clínicas (motoras) dos pacientes com doença de Parkinson incluídos nas análises dos receptores de serotonina e dopamina e proteínas de sinalização intracelulares.	96
Tabela 9: Expressão de receptores e transportados serotoninérgicos, receptores dopaminérgicos e proteínas de sinalização intracelular em linfócitos de pacientes com Doença de Parkinson e controles.	97
Tabela 10: Sequências dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para o qRT-PCR	14705
Tabela 11: Parâmetros avaliados em biópsias duodenais de pacientes com doença de Parkinson e controles	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo ilustrativo de análise realizada no FlowJo 7.6.5.....	36
Figura 2: Análise da concentração plasmática de fatores neurotróficos.....	41
Figura 3: Análises por citometria de fluxo da expressão de receptores serotoninérgicos em linfócitos.....	98
Figura 4: Análises por citometria de fluxo da expressão de receptores dopaminérgicos em linfócitos.....	99
Figura 5: Análises por citometria de fluxo da expressão das proteínas pDARPP e pAKT em linfócitos.....	100
Figura 6: Análise de células enterocromafins produtoras de serotonina na mucosa duodenal de pacientes com doença de Parkinson (DP) e controles.....	108
Figura 7: Expressão relativa de mRNA do transportador de serotonina (SERT), triptofano hidroxilase 1 (TpH ₁) dos receptores de serotonina (5HTR) encontrados na mucosa gastrointestinal.....	109
Figura 8: Valores Cp (<i>crossing point</i>) obtidos para o gene constitutivo utilizado, proteína ribossomal S18.....	110
Figura 9: Expressão relativa de mRNA do transportador de serotonina (SERT), triptofano hidroxilase 1 (TpH ₁) e dos receptores de serotonina (5HTR) em controles e pacientes com doença de Parkinson (DP).....	111

SUMÁRIO

1	PREFÁCIO	15
2	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2.1	Sintomas não motores na DP	17
2.2	Inflamação na DP.....	18
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MÉTODOS.....	39
4.1	Avaliação clínica.....	39
4.2	Coleta do material biológico.....	40
4.3	Separação do plasma.....	41
4.4	Análise dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos.....	41
4.4.1	Análise de proteínas plasmáticas por ELISA	41
4.4.2	Análise de proteínas plasmáticas por CBA	42
4.5	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	43
4.6	Análises estatísticas	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Dosagem de citocinas e fatores neurotróficos	46
5.2	Imunofenotipagem	109
5.3	Imunofenotipagem – Análise dos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos e das proteínas de sinalização intracelulares.....	136
6	PESQUISA REALIZADA DURANTE O DOUTORADO SANDUÍCHE.....	143
6.1	Introdução	143
6.2	Justificativa	145
6.3	Métodos	145

6.3.1	Sujeitos e avaliação clínica	145
6.3.2	Endoscopia do trato gastrointestinal superior	146
6.3.3	Imunohistoquímica.....	146
6.3.4	Análise da expressão de mRNA (Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa, quantitativa – qRT-PCR)	147
6.3.5	Análises estatísticas.....	148
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	155
8	REFERÊNCIAS	158
	ANEXOS	162
	Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	121
	Anexo II – Roteiro de Avaliação.....	165
	Anexo III - Escala de Avaliação Unificada para a Doença De Parkinson (UPDRS).....	166
	Anexo IV – Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)	171
	Anexo V – Bateria de Avaliação Frontal.....	172
	Anexo VI – Inventário de Depressão de Beck (BDI).....	174

1 PREFÁCIO

A proposta do presente trabalho é apresentar os resultados da avaliação de marcadores imunológicos e fatores neurotróficos no sangue periférico de pacientes com diagnóstico de doença de Parkinson (DP) atendidos no Ambulatório de Distúrbios do Movimento, Serviço de Neurologia do grupo Santa Casa de Belo Horizonte em comparação com indivíduos controles da comunidade. Especialmente, apresentaremos os dados acerca da associação desses marcadores biológicos com cognição e sintomas depressivos na DP.

Para apresentação de seus elementos, a tese foi estruturada em seis partes principais: i) Introdução, contendo uma breve revisão da literatura acerca do tema e justificativa ii) Objetivos do presente trabalho; iii) Métodos utilizados para realização do projeto proposto; iv) Resultados no formato de artigos publicados e dados adicionais ainda não publicados; v) Descrição do trabalho realizado durante estágio sanduíche na KULeuven, Bélgica; e vi) parte final composta pelas conclusões dos achados e as perspectivas.

A revisão da literatura neste trabalho contém o artigo 1, intitulado “*Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease: a role for inflammation and immunomodulation?*” publicado na revista *Neuroimmunomodulation* (Rocha et al, 2014a). Trata-se de revisão da literatura sobre alterações imunes/inflamatórias e sua associação com alterações cognitivas e sintomas depressivos na DP.

No artigo 2, intitulado “*Circulating levels of adipokines in Parkinson's disease*”, publicado na revista *Journal of Neurological Sciences* (Rocha et al, 2014b), demonstramos que, apesar da DP estar associada à perda de peso não intencional e à prevalência reduzida de fatores de risco cardiovasculares, pacientes com DP e controles não diferem quanto aos níveis plasmáticos das adipocinas adiponectina, leptina e resistina.

No artigo 3, intitulado “*Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease*” publicado na *Movement Disorders* (Rocha et al, 2014c), demonstramos que os níveis plasmáticos do receptor solúvel do fator de necrose tumoral (sTNFR)1 e sTNFR2 encontram-se aumentados em pacientes com DP em comparação a controles pareados por idade, sexo, escolaridade e índice de massa corporal (IMC). Além disso, quanto maiores os níveis dos sTNFRs, pior o desempenho cognitivo dos pacientes com DP. Após análise de regressão linear múltipla incluindo

possíveis preditores para desempenho cognitivo, apenas níveis plasmáticos de sTNFR1 e escolaridade permaneceram como preditores significativos para desempenho cognitivo na DP.

No artigo 4, intitulado “*Cognitive status correlates with CXCL10/IP-10 levels in Parkinson’s disease*” (Rocha et al, 2014d) aceito para publicação na revista *Parkinson’s disease*, demonstramos que os níveis plasmáticos das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL11/eotaxin, CCL24/eotaxin-2, and CXCL10/ IP-10 não se encontram alterados em pacientes com DP em comparação a controles. Entretanto, observamos que maiores níveis de CXCL10/IP-10 estavam associados com pior desempenho cognitivo na DP.

No artigo 5, “*Reduced activated T lymphocytes (CD4+CD25+) and plasma levels of cytokines in Parkinson’s disease*”, ainda não submetido, verificamos que o sangue periférico de pacientes com DP apresenta menor porcentagem de linfócitos T (CD3+), em especial, menor porcentagem de linfócitos T ativados (CD4+CD25+) em relação a controles. Corroborando esses resultados, demonstramos que pacientes com DP apresentam menores níveis plasmáticos de interleucina (IL)-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN)- γ , e IL-17A em comparação com indivíduos controles. Experimentos *in vitro* demonstraram diminuição na produção de citocinas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após estímulo com os fármacos antiparkinsonianos levodopa e pramipexol. Além disso, observamos que pacientes com DP exibem maiores razões IFN- γ /IL-4, IL-2/IL-4 e IFN- γ /IL-17A em comparação com controles, sugerindo um viés para um perfil Th1.

Em conjunto com os resultados demonstrados em forma de artigos científicos, apresentamos dados ainda não publicados ou submetidos para publicação científica, mas que são importantes para a apresentação da presente tese.

2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e a principal causa de parkinsonismo, síndrome altamente incapacitante. O parkinsonismo é definido pela presença de bradicinesia e pelo menos mais um dos seguintes sinais: tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. O diagnóstico da DP é clínico, baseado na presença de sinais e sintomas típicos e na exclusão de outras causas de parkinsonismo. O teste farmacológico com levodopa resultando em resposta satisfatória também auxilia no diagnóstico (Hughes et al, 1992; Martí et al, 2013). O diagnóstico definitivo, no entanto, somente é possível com a realização de exame *postmortem*, baseado nas características fisiopatológicas da doença. Patologicamente, a DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNPc) e pela presença de corpos de Lewy (inclusões intracitoplasmáticas da proteína α -sinucleína) nos neurônios remanescentes (Samii et al, 2004).

2.1 Sintomas não motores na DP

Apesar de tradicionalmente entendida como um ‘distúrbio do movimento’, a DP também apresenta sintomas não motores (SNM) que podem ser considerados tão incapacitantes quanto os sintomas motores. Alguns SNM podem preceder as manifestações motoras da DP, como é o caso dos distúrbios gastrointestinais e da hiposmia, sendo estes considerados sintomas prodrômicos da DP (Jain & Goldstein 2012; Bonnet et al, 2012). Dentre os SNM na DP, transtornos cognitivos e sintomas depressivos são muito importantes devido ao impacto que provocam na qualidade de vida do paciente e do cuidador, além de contribuírem significativamente para o aumento das hospitalizações ou institucionalizações e, conseqüentemente, para os gastos com saúde (Kummer & Teixeira, 2009; Gallagher & Schrag, 2012; Pagonabarraga & Kulisevsky, 2012).

A prevalência de demência na DP em porcentagem é em torno de 30 a 40% (Emre et al, 2007). O declínio cognitivo em diferentes domínios pode estar presente desde estágios iniciais da doença. Embora dificuldades de atenção e memória sejam frequentes, o prejuízo na função executiva é o déficit cognitivo mais comum em pacientes com DP. Fatores de risco para declínio cognitivo na DP incluem idade avançada, baixa escolaridade, longo tempo de

evolução da doença, gravidade dos sintomas motores, variante rígido-acinética da DP, depressão e psicose (Kummer & Teixeira, 2009). Vale a pena mencionar que pacientes com DP apresentam risco de 4 a 6 vezes maior de desenvolver demência comparados à população em geral da mesma faixa etária (Pagonabarraga & Kulisevsky, 2012).

Em relação à depressão, ressalta-se sua ocorrência em várias doenças neurodegenerativas, não apenas na DP. Entretanto, a incidência parece ser maior na DP e o início dos sintomas depressivos pode até mesmo preceder os sintomas motores (Gallagher & Schrag, 2012). A ocorrência de depressão clinicamente significativa na DP pode chegar a 35% (Reijnders et al, 2008) e, portanto, alguns autores afirmam que a depressão é o principal fator impactante na qualidade de vida na DP (Kummer & Teixeira, 2009). Em pacientes com DP, as características dominantes da depressão incluem falta de energia, lentificação psíquica e irritabilidade, enquanto sentimentos de fracasso ou de culpa estão ausentes (Bonnet et al, 2012). Muitos fatores podem contribuir para a depressão na DP como, por exemplo, as complicações motoras, duração ou gravidade da doença, incapacidade de execução das atividades de vida diária e distúrbios do sono (Gallagher & Schrag, 2012).

Embora depressão e declínio cognitivo sejam muito comuns na DP, essas manifestações ainda são subdiagnosticadas por clínicos que frequentemente têm como foco os sintomas motores típicos da DP. Recentemente, o reconhecimento de SNM ganhou atenção na pesquisa sobre a DP, uma vez que essas condições têm grande impacto na institucionalização e na mortalidade associadas à doença (Jain & Goldstein, 2012).

2.2 Inflamação na DP

Apesar de as características fisiopatológicas serem bem descritas e até mesmo utilizadas como padrão ouro para diagnóstico definitivo da DP, a causa da morte neuronal ainda é questão de debate, sendo provavelmente multifatorial. Dentre vários fatores que vêm sendo estudados, alterações imunes / inflamatórias na DP têm ganhado importância nos últimos anos (Samii et al, 2004). O envolvimento do processo inflamatório na fisiopatologia da DP foi inicialmente demonstrado em estudos *postmortem*. James Parkinson relatou neuroinflamação nas amostras de cérebro quando ele descreveu a doença pela primeira vez, em 1817 (Parkinson, 2002). Entretanto, foi apenas em 1988 que o assunto tornou-se questão de interesse pela comunidade científica, quando McGeer e colaboradores demonstraram a

presença de microglia ativada em cérebros de indivíduos com DP (McGeer et al, 1988). Recentemente, não apenas neuroinflamação (descrita por estudos *postmortem* ou modelos animais), mas também alterações periféricas têm sido investigadas em estudos sobre DP. A contribuição da inflamação na fisiopatologia da DP tem sido discutida com base em estudos epidemiológicos, genéticos e imunológicos em humanos e em modelos animais (Collins et al, 2012).

Alterações imunes e inflamatórias descritas na DP podem não apenas exacerbar ou acelerar a progressão da doença, mas também explicar, pelo menos em parte, alguns dos sintomas clínicos experimentados pelos pacientes com DP. Por exemplo, o aumento do nível sistêmico de citocinas pró-inflamatórias pode estar associado a alterações comportamentais descritos na DP. De fato, alterações comportamentais associadas à inflamação têm sido investigadas em uma série de doenças neuropsiquiátricas, como esquizofrenia (Noto et al, 2013), transtorno bipolar (Barbosa et al, 2012), transtorno obsessivo compulsivo (Fontenelle et al, 2012) e Doença de Alzheimer (Diniz et al, 2010).

Uma revisão da literatura sobre alterações imunes/inflamatórias e sua associação com alterações cognitivas e sintomas depressivos na DP é apresentada a seguir.

Artigo 1: “Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease: a role for inflammation and immunomodulation?”

Natalia Pessoa Rocha, Helton José dos Reis, Pieter Vanden Berghe, Carla Cirillo.

Neuroimmunomodulation. 2014;21(2-3):88-94

Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease: a role for inflammation and immunomodulation?

Natália Pessoa Rocha^{a,b,c*}, Helton José Reis^{b,c}, Pieter Vanden Berghe^c and Carla Cirillo^c.

^a Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

^b Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

^c Laboratory for Enteric Neuroscience (LENS), Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), University of Leuven, Leuven, Belgium.

Running head: Inflammation and immunomodulation in Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease, inflammation, immune system, cognition, depression.

*Corresponding author:

Natália Pessoa Rocha

Laboratory for Enteric Neuroscience (LENS), TARGID

University of Leuven, O&N 1, Herestraat 49, box 701, Leuven 3000, Belgium

Tel +32 16 330836

Fax +32 16 330723

Email: npessoarocha@gmail.com

Abstract

The etiology of Parkinson's disease (PD) is complex and not fully understood, most probably because of the multiplicity of factors involved. Inflammatory and abnormal immune responses have been hypothesized to play a crucial role in PD. Not only in the brain, but also peripherally, inflammation is believed to contribute to the onset and progression of the neurodegenerative process seen in PD. Furthermore, increased inflammatory responses have been described both in brain and peripheral blood of PD subjects. Although PD is considered a motor disorder, non-motor symptoms (NMS) are extremely frequent and disabling. Cognitive impairment and mood alterations are such symptoms that deserve increased attention since on the one hand they can appear even before typical motor disturbances are recognized and on the other hand they are associated with high morbidity and mortality. A growing body of evidence suggests the existence of a link between inflammatory-immune responses and the occurrence of depression and cognitive impairment in PD patients. However, not all data are equally conclusive and sometimes even conflicting. The aim of this brief review is to give an overview of the possible role that inflammation and immunomodulation may play in PD together with their putative impact on mood and cognitive alterations. What clearly emerges from this work is the fact that studies performed until now lack standardized and comparable methods to analyze both clinical and biological parameters. It is thus difficult to conclusively link mood and cognitive changes to underlying pathological mechanisms. Additional studies in this direction are warranted to convincingly establish or refute any causative relation.

Acknowledgments: The authors would like to thank FAPEMIG, CNPq and CAPES for funding. NPR and HJR are CNPq SWO and PDE scholarship recipients, respectively. PVB is supported by the University of Leuven (GOA/13/017) and the *Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen* (FWO) (G.0A44.13). CC is a postdoctoral fellow of the FWO.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. The prevalence of PD is generally estimated to hover around 0.3% of the total population in industrialized countries. PD is clearly an age-related disease; its appearance is rare before the age of 50, while its incidence rises to 1% in subjects over 60 years old and reaches 4% in the population older than 80 [1]. While about 10% of PD cases have a clear genetic origin, the etiology of this neurodegenerative disorder still remains inconclusive in the great majority of cases, classified as sporadic PD [2].

The main pathological features of PD are the progressive loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNPc) in the brain and the presence of *Lewy* bodies (alpha-synuclein intraneuronal inclusions) in the remaining neurons. The etiology and molecular mechanisms underlying neuronal death in PD are not fully understood. Apart from increased age and genetic predisposition also the presence of environmental toxins has been identified as a risk factor in PD. Moreover, it is accepted that PD is a multifactorial disease in which immune and inflammatory responses play an important role [3]. The contribution of inflammation to the pathophysiology of PD has been proposed based on epidemiological, genetic and immunological studies in humans and animal models and in postmortem evaluations [4]. Inflammatory and immune mechanisms described in PD can not only exacerbate or hasten the progression of the disease but also explain, at least in part, some of the clinical symptoms experienced by PD patients [5-8].

Diagnostic clinical criteria for PD are based on the presence of bradykinesia and at least one of the following motor signs: resting tremor, rigidity and postural instability [3, 9, 10]. However, PD is not simply a movement disorder. Patients suffering from PD present a range of non-motor symptoms (NMS), which at least for some individuals, can be even more disabling than their motor problems [11, 12]. Among NMS, cognitive and mood changes are of great importance, since they are extremely debilitating and have tremendous impact on quality of life, hospitalization and healthcare costs [11].

The aim of this brief review is to discuss the role of inflammation and immune responses in the pathophysiology of PD. Moreover, we will focus on the question as to whether inflammatory and immune mechanisms might be involved in depression and cognitive impairment associated with PD.

Inflammatory and immune mechanisms involved in PD

Despite the fact that neuropathological features of PD are well described, the cause of dopaminergic neurodegeneration in the brain is still far from being understood and its pathophysiology remains obscure. Inflammation and abnormal immune responses have been hypothesized to play a crucial role in the fate of dopaminergic neurons.

Neuroinflammation

The involvement of inflammation in PD was already reported by James Parkinson in 1817, when he first characterized the disease [13]. However, the matter became a real topic of investigation only 25 years ago, when McGeer et al. (1988) demonstrated the presence of activated microglial cells within the SNpc of patients with PD [14]. Since then a number of studies have supported the role of activated microglia in PD pathophysiology, most of them based on *postmortem* studies. Microglial cells are the resident immune cells of the central nervous system (CNS), equivalent to the macrophages in the periphery. Microglial cells usually respond to neuronal damage in a neuroprotective way by removing impaired cells through phagocytosis. However, activated microglia can release potentially cytotoxic molecules such as proinflammatory cytokines, reactive oxygen species and proteins of the complement system. Chronic activation of microglia can therefore cause neuronal damage and harm the CNS. It is worth mentioning that dopaminergic neurons in the SNpc are particularly susceptible to microglial-mediated neurotoxicity due to the high density of microglia present in this brain compartment. Either central or peripheral inflammation can activate microglia, which in turn can induce or trigger stronger responses that aggravate neurodegenerative processes [4].

Proinflammatory cytokines and also the presence of α -synuclein aggregates can trigger microglia activation, which further causes the release of several neuroinflammatory mediators, amplifying the inflammatory response and exacerbating neurodegeneration in PD. In line with this concept, *postmortem* studies have demonstrated the increase of proinflammatory cytokines for instance interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in PD brains. Inducible nitric oxide synthase, iNOS, and cyclooxygenase-2, COX-2, two enzymes involved in the inflammatory cascade, have also been identified as players in PD [4]. Moreover, infiltrating CD8⁺ T cells and increased major

histocompatibility complex (MHC) class II positive antigen presenting microglia were found in PD brain samples [14, 15]. Besides brain tissues, elevated TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels have also been found in the cerebrospinal fluid (CSF) from PD patients [4].

Genetic evidence for inflammation and immune changes in PD

Genetic studies further support the involvement of inflammation in PD pathophysiology [see review 16]. Polymorphisms in the genes encoding for proinflammatory molecules have been associated with a higher risk of developing PD [17]. Functional DNA polymorphism of genes encoding for TNF- α and IL-1 β has been extensively studied [17]. A population-based case-control study reported that carriers of the homozygous variant genotype of IL-1 β -511 and the homozygous variant genotype of TNF- α -308 have a 2-fold increase to develop idiopathic PD. When both variant genotypes are present, the disease risk increases 3-fold compared to controls [17]. In the same study environmental factors such as smoking or use of non-steroidal anti-inflammatory drugs were also taken into account, but no increased incidence of developing PD was observed in the small group of patients analyzed. A similar analysis of a larger group of patients is warranted to corroborate these findings.

In addition, a genome-wide association study has demonstrated that patients with late-onset or sporadic PD have variations in the human leukocyte antigen (HLA) region [18]. Here again, no correlation with environmental factors such as coffee consumption, smoking or non-steroidal anti-inflammatory drugs use was found. The strength of this study was the high number of subjects analyzed (2,000 PD patients vs. 1,986 control subjects) and the reproducibility of their results, providing genetic explanation for the involvement of the immune system in PD pathogenesis.

Epidemiological evidence for inflammation in PD

Epidemiological studies have also implicated inflammation in PD development. Regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), especially ibuprofen, has been associated with a significant lower risk of developing PD [19]. However, data in this direction are confusing and conflicting. In fact, a meta-analysis published in 2010 has demonstrated that only a small percentage of the published studies should be truly considered, highlighting the lack of well-designed studies in this field [19].

Some research has been conducted in order to evaluate the association between the presence of inflammatory conditions and the risk to develop PD. Viral or bacterial infections

and the exposure to pesticides that trigger the inflammatory cascade seem to increase the risk to develop PD later in life. Furthermore, respiratory infections such as pneumonia have been described as main causes of death among PD patients. Additionally, it was described that gastrointestinal infections could also contribute to PD development and progression [16]. Again, more studies are needed to confirm these associations.

Low-grade systemic inflammation

Aging itself is accompanied by changes in the immune and endocrine systems. These alterations result in chronic low-grade systemic inflammation, a phenomenon known as *inflammaging*. It has been described that *inflammaging* accelerates neurodegeneration. This low-grade proinflammatory profile described for elderly people might be more severe in individuals suffering from neurodegenerative disorders such as PD, which is clearly an age-related disease. Based on this hypothesis, immune and inflammatory biomarkers have been investigated not only in the brain and CSF, but also in the peripheral blood of PD patients.

Analyses of serum and plasma have demonstrated that levels of proinflammatory cytokines such as IL-6 [5,20,21], TNF- α [21], its soluble receptor sTNFR1 [22], IL-2 [21, 23] and IFN- γ [21] are increased in PD patients compared to age-related control individuals. In addition, IL-1 β levels are significantly elevated while IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) levels are decreased in serum of PD patients [6] in comparison to controls. Also, the anti-inflammatory cytokine IL-10 [21, 24] was found to be increased in the serum of PD patients compared to control subjects. All these studies have corroborated the hypothesis that PD is associated with chronic asymptomatic systemic inflammation. On the other hand, some authors failed to show differences between PD patients and control subjects regarding serum levels of cytokines such as IL-12 [24], IL1- α , IL-6, TNF- α [6, 22], IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 [25]. Also, serum levels of the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , eotaxin, eotaxin-2, IL-8 and interferon gamma-induced protein (IP)-10 were comparable in PD patients and control subjects [27]. These discordant results may be due to the fact that the PD population is very heterogeneous, which makes it difficult to compare data between different studies. While some have worked with data from patients with severe PD [21], others have evaluated mild to moderate PD subjects [22]. Moreover, the results might be different if the patients were under pharmacological treatment or if they had not received any drug.

Besides detection in serum and plasma, cytokines secreted by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have also been evaluated. Basal and lipopolysaccharide (LPS)-induced production of monocyte chemoattractant protein (MCP-1), MIP-1 α , IL-8, IFN- γ , IL-1 β and TNF- α were significantly higher in PD patients compared to control subjects. In addition, the level of these cytokines correlated positively with the severity of clinical PD symptoms, as evaluated through Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [27]. However, discrepant results were described in a study that showed the secretion of IL-2 by PBMC after mitogenic stimulation to be significantly diminished in PD patients in comparison with control subjects, whereas IFN- α , IL-6, IFN- γ and sIL-2R levels were comparable in both groups [28]. Once again the disagreeing results indicate the need for more studies in this regard.

Prospective studies may help to understand the role of inflammation in PD. A case-control study has showed that elevated plasma IL-6 concentration is prospectively associated with an increased risk of developing PD [29]. In contrast, no correlation between the concentrations of C-reactive protein, fibrinogen, and TNF- α and increased risk was found. However, these results need to be confirmed by other works with similar purposes.

Cell-mediated immunity and activation phenotype

Not only changes in blood levels of cytokines and chemokines, but also phenotypic alterations of circulating lymphocytes have been described in PD. Using flow cytometry analysis, lower total lymphocyte counts were shown in PD patients compared to controls [30 – 32]. The decrease in total lymphocytes was also reported to be due to lower numbers of T (CD3+) and B (CD19+) cells in PD patients. The alterations in CD3+ cells was explained by the reduction in T helper (Th, CD4+) lymphocytes whereas T cytotoxic (CD8+) cells remained unchanged [30, 32, 33]. Also, the number of 'naïve' (CD4+CD45RA+) and memory helper (CD4+CD29+) cells was decreased while the number of activated (CD4+CD25+) T cells was markedly increased [30]. The depletion of CD4+ lymphocytes observed in PD patients has been explained by the fact that these cells presented both increased spontaneous and activation-induced apoptosis [34]. In addition, a decrease in Th1 cell number associated with disease severity has been reported, whereas no evidence of Th1/Th2 or Treg/Th17 cell predominance in PD has ever been presented [35]. It is worth mentioning that although the total number of T lymphocytes seems to be diminished, mature activated T cells were found to be increased in the blood of PD patients [36]. Also impaired ability of regulatory T cells

(Treg) to suppress effector T cell function has been described in PD patients [32]. Oxidative stress may actively contribute to the decrease in lymphocytes observed in PD. Both whole cell and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in PBMC were found to be increased in PD patients [37].

Conversely, one study has described similar percentages of CD3+ lymphocytes in both PD patients and control subjects. As in Bas and colleagues' work [30], T helper lymphocytes (CD4+) were also found to be decreased in PD patients, while CD8+ cell counting resulted increased. They also reported fewer CD4+CD25+ T cells [31]. Katsarou and colleagues (2007) have reported similar percentages of CD3+ lymphocytes and its subsets (CD4+ and CD8+) as well as CD19+ cells [6].

There is accumulating evidence for the presence of higher percentages of natural killer (NK) cells in PD patients compared to control subjects and this increase was associated with disease severity and progression [6, 25, 35]. While NK cells rose in number, their activity was described as comparable in PD and control groups [25, 35]. On the other hand, another study did not find any differences in NK cell number between PD patients and control subjects [33].

Despite some conflicting results, the data in their entirety corroborate the hypothesis that immunological mechanisms are involved in PD. It is clear that there is a peripheral immune alteration in PD, which is more than simply a diminution in immune responses. While the number of some cells is decreased, other cells types are increased in PD patients compared to controls. It seems that the differences in cell count are associated with compensatory mechanisms in response to changes in cellular activity. It remains a challenge to fully understand how the immune system is linked to neurodegenerative disorders; therefore future studies into this subject are needed in order to confirm the current findings.

Depression and cognitive impairment in PD

Cognitive decline and depression occur at any stage of PD and are NMS of special interest, since they are very common, worsening as the disease progresses, and leading to increased disability and poor quality of life [12, 38].

The presence of depression has been reported in several neurodegenerative conditions, not only in PD. However, the incidence seems higher in PD and the onset of depression may

even precede the motor symptoms [39, 40]. The occurrence of clinically significant depression in PD patients reaches 35% [41] and, thus, some authors state that depression is the main factor impacting the quality of life in PD [38]. The features of PD-related depression are different from those described in classic depressive disorders. In PD patients the predominant characteristics include lack of energy, psychomotor slowing and irritability, while guilty or failing feelings are absent [12]. Several factors may contribute to inducing depression in PD, for instance motor complications, disease stage and duration, disability to perform daily live activities and sleep disturbances. Also other neuropsychiatric symptoms such as hallucinations, anxiety and cognitive impairment are associated with depression in PD [40].

Apart from depression, cognitive decline in different domains may be present from the initial stages of PD onwards. Although attention and memory difficulties are very frequent, impairment in executive functioning is the most common cognitive deficit in PD patients. Risk factors responsible for cognitive impairment include advanced age, low educational level, long disease duration, severity of motor signs, rigid-akinetic PD variant, depression and psychosis [38]. Patients with low educational level are particularly susceptible to the deleterious effect of depression on cognition [42]. The prevalence of dementia in PD is about 31% [38]. It is worth mentioning that PD patients have a 4- to 6-fold increased risk of developing dementia compared to an age-matched general population [43].

Although depression and cognitive impairment are very common and extremely debilitating, these manifestations are still under-estimated by physicians who frequently focus on the typical motor symptoms caused by the disease. Recently, the recognition of non-motor symptoms gained increased attention in PD research, since these conditions have a crucial impact on institutionalization and mortality associated with the disease [11].

The role of inflammation and immune responses in cognitive and mood changes in PD

A growing body of evidence suggests the existence of a link between inflammatory responses mainly mediated by proinflammatory cytokines and cognitive and mood alterations. The wording “sickness behavior” describes a range of changes, including mood and cognitive alterations, which are due to the rise of proinflammatory cytokines. This concept was first applied to explain the typical behavior observed during systemic infection, in which patients

present with lethargy, depression, anxiety, appetite and sleep alterations, psychomotor slowness and difficulty to concentrate. It has been demonstrated that “sickness behavior” can be reliably reproduced by administration of proinflammatory cytokines or by treatment with cytokine-production inducers, such as endotoxin or LPS [44]. Nowadays, the term “sickness behavior” is also employed in the context of an existing inflammation-related profile seen in neuropsychiatric disorders, such as depression, bipolar disorder, obsessive compulsive disorder, schizophrenia and Alzheimer’s disease. Despite the well-known association between systemic inflammation and behavioral changes in several neuropsychiatry disorders, only few studies have investigated this topic in PD.

Inflammation and cognition in PD

Increased levels of circulating proinflammatory cytokines have been associated with poorer cognitive performance in PD patients. A study comprising 52 PD patients with diagnosed depression has found a negative correlation between plasma TNF- α levels and cognition [7]. The results were presented and discussed based on a composite measure of cognition calculated by adding the individual scores of several cognitive tests. Thus, it is not clear if overall cognition or rather a specific cognitive domain was associated with circulating levels of TNF- α . Moreover, an important confounding factor in this study was the fact that all patients evaluated were depressed and both cognition and circulating levels of cytokines are altered in depression. Another study has shown that higher serum levels of IL-6 were associated with poorer cognitive performance, as assessed by the Mini-Mental State Examination (MMSE) [20]. Not only proinflammatory cytokines, but also the association between cognition and anti-inflammatory molecules has been investigated. Plasma levels of epidermal growth factor (EGF), described to exert anti-inflammatory effects, were found to be positively associated to cognitive performance in PD. EGF was reported to be the best candidate among some 102 proteins evaluated in a study that searched for plasma biomarkers of cognitive impairment in PD. The authors of this study used the Mattis Dementia Rating Scale-2 (DRS) to evaluate cognition impairment. The DRS provides screening information about overall cognition, mainly in terms of changes over time. Low levels of EGF not only correlated with poor cognitive test scores at baseline, but they also predicted an eightfold greater risk of cognitive decline to dementia-range scores at follow-up for those with intact baseline cognition. An independent cohort of 113 PD patients confirmed this association [8]. Although this study is weak regarding cognitive assessment, it is until now the most convincing work that associates inflammatory molecules with cognition in PD.

On the other hand some other studies failed to show any correlation between inflammatory parameters and cognitive function. Dufek and colleagues (2009) [45] evaluated the association between inflammation and both motor and non-motors symptoms in 29 patients with PD. They could not show any correlation between patients' clinical state (both motor and neuropsychologic, as expressed by MMSE) and the inflammatory molecules assessed (IL-6, acute phase proteins and factors of the complement system) [45]. A separate study comprising a cohort of 73 patients with PD was conducted with a similar purpose [46]. Here, they also failed to demonstrate any associations between C-reactive protein (CRP) levels and motor as well as cognitive and psychiatric features such as severity of depression, psychosis, dementia, cognitive decline or frontal lobe dysfunction. CRP is an acute phase protein whose plasma levels increase during inflammatory states [46]. In line with these findings, another study has shown the lack of significant correlation between IL-6 or CRP blood levels and any of the non-motor symptoms scales, including depressive and anxiety symptoms' assessment [5]. It is clear that the involvement of inflammatory mechanisms in cognitive function in PD is under-investigated and that the lack of standardized methods for evaluating cognitive function in PD makes the comparison between different studies extremely difficult. More studies are required to render the existing information more conclusive, especially including specific cognitive assessments like executive function, visual and verbal memory.

Inflammation and depression in PD

Regarding depression in PD and its association with inflammation, the picture is not different. A few studies have been conducted but the results are still inconclusive. One study has shown that high levels of both soluble IL-2 receptor (sIL-2R) and TNF- α were associated with more severe symptoms of fatigue and depression, as assessed by the Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT) and the Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD), respectively. Also, sIL-2-R levels were able to predict FACIT and HAD scores even after the effects of age, gender, anti-parkinsonian medications and severity of motor symptoms were controlled for [5]. One other study demonstrated that the presence of current or prior depression was more common in those PD patients who had higher CRP plasma levels [46].

Again, a similar study performed by Katsarou and colleagues (2007) [6] found different results. These authors assessed fatigue and its relation with depressive symptoms

and various immunological factors in PD patients (both depressed and non-depressed), including serum levels of interleukins IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and TNF- α . Fatigue and depressive symptoms were evaluated through Fatigue Severity Scale (FSS) and Beck Depression Inventory (BDI), respectively. When assessing the whole group of PD patients, fatigue correlated positively with depressive symptoms and IL-1Ra levels. However, after exclusion of depressed PD patients, the correlation between fatigue severity and IL-1Ra levels was no longer significant, identifying depression as the predictor of fatigue. Unfortunately, the authors did not discuss the association between the immunological parameters and depressive symptoms in both depressed and non-depressed PD groups [6].

Here again, with respect to the relationship between depression and inflammation in PD, the results are quite inconclusive. However, the rise in proinflammatory cytokines and the high prevalence of depressive disorders seen in PD patients, together with the concept of “sickness behavior”, led some authors to hypothesize that depression in PD might be due to a shared immune-mediated neurodegenerative process [47].

Conclusions

Accumulating evidence strongly suggests the involvement of inflammatory mechanisms and immune changes in PD pathophysiology, but the published data are converging and not fully convincing. NMS in PD patients such as cognitive impairment and depression have been suggested to be generated, at least in part, via triggering of proinflammatory mechanisms. Here again, data are still scarce and results are conflicting. These discordant findings may be resulting from the differences in methodological approach, including dosage techniques for cytokines and clinical scales to evaluate depression and cognition in PD patients. Also, clinical features of different PD study samples can be heterogeneous. Additional studies are needed in order to elucidate the role of inflammation in mood and cognitive changes in PD.

References

- 1 de Lau LM, Breteler MM: Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5(6):525-535.
- 2 Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP: The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23(4):228-242.
- 3 Samii A, Nutt JG, Ransom BR: Parkinson's disease. *Lancet* 2004;363(9423):1783-1793.
- 4 Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM: Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2012;62(7):2154-2168.
- 5 Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O: Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One* 2012;7(10):e47387.
- 6 Katsarou Z, Bostantjopoulou S, Hatzizisi O, Giza E, Soler-Cardona A, Kyriazis G: Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease. *Rev Neurol* 2007;45(12):725-728.
- 7 Menza M, Dobkin RD, Marin H, Mark MH, Gara M, Bienfait K, Dicke A, Kusnekov A: The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010;51(6):474-479.
- 8 Chen-Plotkin AS, Hu WT, Siderowf A, Weintraub D, Goldmann Gross R, Hurtig HI, Xie SX, Arnold SE, Grossman M, Clark CM, Shaw LM, McCluskey L, Elman L, Van Deerlin VM, Lee VM, Soares H, Trojanowski JQ: Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2011;69(4):655-663.
- 9 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ: Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(3):181-184.
- 10 Martí MJ, Tolosa E: Parkinson disease: New guidelines for diagnosis of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2013;9(4):190-191.
- 11 Jain S, Goldstein DS: What ARE Parkinson disease? Non-motor features transform conception of the shaking palsy [Special issue]. *Neurobiol Dis* 2012;46(3):505-507.

- 12 Bonnet AM, Jutras MF, Czernecki V, Corvol JC, Vidailhet M: Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis* 2012;2012:198316.
- 13 Parkinson J: An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14(2):223-236.
- 14 McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG: Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988;38(8):1285-1291.
- 15 Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM: A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain* 2005;128(Pt 11):2665-74.
- 16 Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC: Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007;208(1):1-25.
- 17 Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B: Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007;64(6):836-840.
- 18 Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D, Kay DM, Doheny KF, Paschall J, Pugh E, Kusel VI, Collura R, Roberts J, Griffith A, Samii A, Scott WK, Nutt J, Factor SA, Payami H: Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 2010;42(9):781-785.
- 19 Gagne JJ, Power MC: Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology* 2010;74(12):995-1002.
- 20 Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL: Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010;468(1):56-58.
- 21 Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A: Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett* 2008;441(2):158-162.
- 22 Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL: Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2009;216(1-2):122-125.

- 23 Stypuła G, Kunert-Radek J, Stepień H, Zylińska K, Pawlikowski M: Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 1996;3(2-3):131-134.
- 24 Rentzos M, Nikolaou C, Andreadou E, Paraskevas GP, Rombos A, Zoga M, Tsoutsou A, Boufidou F, Kapaki E, Vassilopoulos D: Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2009;119(5):332-337
- 25 Mihara T, Nakashima M, Kuroiwa A, Akitake Y, Ono K, Hosokawa M, Yamada T, Takahashi M: Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: a possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14(1):46-51.
- 26 Scalzo P, de Miranda AS, Guerra Amaral DC, de Carvalho Vilela M, Cardoso F, Teixeira AL: Serum levels of chemokines in Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 2011;18(4):240-244.
- 27 Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofri M: Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2009;23(1):55-63.
- 28 Klüter H, Vieregge P, Stolze H, Kirchner H: Defective production of interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1995;133(1-2):134-139.
- 29 Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A: Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2008;167(1):90-95.
- 30 Bas J, Calopa M, Mestre M, Molleví DG, Cutillas B, Ambrosio S, Buendia E: Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol* 2001;113(1):146-152.
- 31 Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T: Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(8):493-498.
- 32 Saunders JA, Estes KA, Kosloski LM, Allen HE, Dempsey KM, Torres-Russotto DR, Meza JL, Santamaria PM, Bertoni JM, Murman DL, Ali HH, Standaert DG, Mosley RL, Gendelman HE: CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012;7(4):927-938.
- 33 Stevens CH, Rowe D, Morel-Kopp MC, Orr C, Russell T, Ranola M, Ward C, Halliday GM: Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2012;252(1-2):95-99.

- 34 Calopa M, Bas J, Callén A, Mestre M: Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. *Neurobiol Dis* 2010;38(1):1-7.
- 35 Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, Imanishi J: Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int* 2012;12(1):102-107.
- 36 Hisanaga K, Asagi M, Itoyama Y, Iwasaki Y: Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2001;58(10):1580-1583.
- 37 Prigione A, Isaias IU, Galbussera A, Brighina L, Begni B, Andreoni S, Pezzoli G, Antonini A, Ferrarese C: Increased oxidative stress in lymphocytes from untreated Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(4):327-328.
- 38 Kummer A, Teixeira AL: Neuropsychiatry of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67(3B):930-939.
- 39 Shiba M, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA: Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 2000;15(4):669-677.
- 40 Gallagher DA, Schrag A: Psychosis, apathy, depression and anxiety in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*: 2012;46(3):581-589.
- 41 Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF: A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(2):183-189.
- 42 Kummer A, Harsányi E, Dias FM, Cardoso F, Caramelli P, Teixeira AL: Depression impairs executive functioning in Parkinson disease patients with low educational level. *Cogn Behav Neurol* 2009;22(3):167-172.
- 43 Pagonabarraga J, Kulisevsky J: Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2012;46(3):590-596.
- 44 Capuron L, Miller AH: Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 2011;130(2):226-238.
- 45 Dufek M, Hamanová M, Lokaj J, Goldemund D, Rektorová I, Michálková Z, Sheardová K, Rektor I: Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(4):318-320.

- 46 Hassin-Baer S, Cohen OS, Vakil E, Molshazki N, Sela BA, Nitsan Z, Chapman J, Tanne D: Is C-reactive protein level a marker of advanced motor and neuropsychiatric complications in Parkinson's disease? *J Neural Transm* 2011;118(4):539-543.
- 47 Kummer A, Teixeira AL: Depressive disorders in Parkinson's disease may be due to a shared immune-mediated neurodegenerative process. *Med Hypotheses* 2008;70(1):201-202.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar marcadores imunológicos no sangue periférico de indivíduos com DP e investigar a correlação dos parâmetros analisados com variáveis clínicas, sobretudo sintomas não-motores.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o desempenho cognitivo e a presença/gravidade de sintomas depressivos em pacientes com DP e controles.
2. Quantificar os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos no plasma de pacientes com DP e compará-los com indivíduos controles;
3. Investigar a associação entre as moléculas analisadas no plasma dos indivíduos e o desempenho cognitivo e a presença de sintomas depressivos;
4. Avaliar populações de células do sistema imune e ativação dos subtipos celulares em pacientes com DP e compará-las a indivíduos controles.
5. Avaliar a expressão de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos em linfócitos de pacientes com DP em comparação com indivíduos controles.

4 MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal observacional, envolvendo no total 48 pacientes diagnosticados com DP conforme os critérios do banco de cérebros do Reino Unido (Hughes et al, 1992). Os pacientes foram recrutados do Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Serviço de Neurologia do Grupo Santa Casa de Belo Horizonte. Além disso, foi incluído no estudo um grupo de 29 indivíduos controles pareados aos pacientes em relação à idade, gênero, escolaridade e índice de massa corporal (IMC).

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos à avaliação clínica para verificação da presença de comorbidades, tratamentos e uso de medicamentos. Neoplasia, doença neurológica e/ou neurodegenerativa, *delirium* ou demência foram considerados critérios de exclusão para ambos os grupos. Também foram excluídos indivíduos em uso ou que tenham utilizado nas últimas quatro semanas antibióticos, anti-inflamatórios ou imunossupressores ou que relatassem doença inflamatória, auto-imune ou processo infeccioso em atividade nas últimas 4 semanas.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob protocolo CAAE-0417.0.203.000-11. Todos os participantes, ou seus acompanhantes quando apropriado, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, anexo I) antes de serem incluídos na pesquisa.

4.1 Avaliação clínica

Inicialmente, foi aplicado um roteiro de avaliação (anexo II) no qual foram coletados dados pessoais, hábitos de vida, informações sobre comorbidades e uso de medicamentos, entre outros. Os indivíduos com DP também foram questionados sobre a doença. Após aplicação desse roteiro inicial, foram aplicadas escalas clínicas mensurando aspectos cognitivos e afetivos. O grupo de pacientes com DP também foi submetido à avaliação motora. A seguir uma breve descrição das escalas clínicas utilizadas nessa pesquisa.

Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS, anexo III): A UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*), tem sido a principal escala utilizada para avaliar a gravidade dos sintomas da DP através do auto-relato dos pacientes e observação

clínica. Compreende 42 itens divididos em 4 subseções, I: Atividade mental, comportamento e humor; II: Atividade de vida diária; III: Exame das funções motoras e IV: Complicações do tratamento (Fahn e Elton, 1987).

Mini-exame do estado mental (MEEM, anexo IV): O MEEM permite a avaliação da função cognitiva e rastreamento de quadros demenciais. O MEEM é composto por diversas questões tipicamente agrupadas em sete categorias, cada uma delas desenhada com o objetivo de avaliar funções cognitivas específicas: orientação temporal, orientação espacial, registro de três palavras, atenção e cálculo, recordação das três palavras, linguagem e capacidade construtiva visual (Folstein et al, 1975; Brucki et al, 2003).

Bateria de Avaliação Frontal (BAF, anexo V): A BAF é um teste breve para avaliação da função executiva, consistindo de seis subtestes que exploram processos neurocognitivos relatados aos lobos frontais: conceitualização, flexibilidade mental, programação motora, sensibilidade à interferência, controle inibitório e autonomia ambiental. Cada subteste pode ser pontuado de zero (pior) a três (melhor) e a pontuação total na BAF é calculada pela soma das pontuações em cada subteste (Dubois et al, 2000; Beato et al, 2007).

Inventário de Depressão de Beck (BDI, anexo VI): O BDI (*Beck Depression Inventory*) é um instrumento de autoavaliação de sintomas depressivos composto por 21 grupos de afirmações, que incluem sintomas e atitudes com intensidade variável. Estas afirmações referem-se à tristeza, pessimismo, sensação de fracasso, falta de satisfação, sensação de culpa, sensação de punição, autodepreciação, autoacusação, ideias suicidas, crises de choro, irritabilidade, retração social, indecisão, distorção da imagem corporal, inibição para o trabalho, distúrbio de sono, fadiga, perda de apetite, preocupação somática e perda da libido (Beck et al, 1961). O BDI foi validado como instrumento de rastreio e diagnóstico de depressão na DP, inclusive com pacientes brasileiros (Silberman et al, 2006; Tumas et al, 2008).

4.2 Coleta do material biológico

Após a avaliação clínica dos pacientes, foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos a vácuo contendo heparina e 10 mL em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras de sangue foram mantidas à temperatura

ambiente e processadas dentro de no máximo três horas para separação do plasma e 24 horas para experimentos de citometria de fluxo.

4.3 Separação do plasma

As amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados foram centrifugadas a 1620 g, 4°C, por 10 minutos para separação do plasma. A parte referente ao plasma foi coletada e congelada em freezer -70°C até o momento das análises.

4.4 Análise dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos

As amostras de plasma obtidas previamente foram então descongeladas para análise dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos através de ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche, utilizando kits DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Além disso, algumas citocinas foram dosadas através da técnica que combina imunensaio e citometria de fluxo denominada CBA (do inglês *Cytometric Bead Array*). O CBA permite a dosagem de várias proteínas simultaneamente utilizando pequeno volume de amostra.

4.4.1 Análise de proteínas plasmáticas por ELISA

Sucintamente, a cada poço da placa de ELISA foram adicionados 100 µL de solução contendo anticorpo monoclonal contra a citocina ou fator neurotrófico que se pretendia mensurar (anticorpo de captura) diluído em tampão fosfato-salina (PBS). As placas foram incubadas por pelo menos 12 horas à 4°C. Os anticorpos não aderidos nas placas foram descartados após lavagem em lavadora de placas automática, utilizando-se PBS-Tween 0,1% (v/v). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de uma solução contendo albumina de soro bovino (BSA) 1% (p/v), durante 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas, em cada poço foram adicionados 100 µL da amostra ou padrão. As placas foram novamente incubadas por pelo menos 12 horas à 4° C. Após lavagem, foram adicionados anticorpos conjugados com biotina e diluídos em BSA 0,1% (p/v), sendo as placas incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem,

acrescentaram-se 100 µL/poço de estreptavidina conjugada com peroxidase às placas, que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, após nova lavagem, o cromógeno Ø-fenileno-diamina (OPD) foi aplicado às placas, incubadas na ausência de luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA no λ de 490 nm (SOFTmax Pro – versão 2.2.1).

A tabela 1 descreve quais moléculas plasmáticas foram avaliadas no presente estudo através da técnica ELISA.

Tabela 1: moléculas avaliadas por ELISA

Citocinas e receptores solúveis	adiponectina, leptina, resistina, sTNFR1, sTNFR2
Quimiocinas	eotaxina, eotaxina-2, IP-10, MCP-1
Fatores Neurotróficos	BDNF, pro-BDNF, GDNF, NGF, CNTF, NT3, NT4

Abreviações: BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; CNTF = fator neurotrófico ciliar; GDNF = fator neurotrófico derivado das células gliais; IP-10 = proteína induzida por interferon gama-10; MCP-1 = proteína quimioatratadora de monócitos-1; NGF = fator de crescimento neural; NT = neurotrofina; sTNFR = receptor solúvel do fator de necrose tumoral.

4.4.2 Análise de proteínas plasmáticas por CBA

Utilizamos essa técnica para dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas, utilizando-se o kit Th1/Th2/Th17 e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com pequenas adaptações (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Esse kit permite a dosagem simultânea das proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A. Sucintamente, microesferas de captura para cada proteína a ser analisada são misturadas, centrifugadas (200g por 5 minutos) e ressuspendidas em tampão (*plasma enhancement buffer*) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 25 µL da solução contendo as microesferas de captura são adicionados a cada poço da placa. A seguir, adicionam-se a cada poço 25 µL das amostras de plasma ou dos padrões (padrões liofilizados reconstituídos e preparados por diluição seriada). Adicionam-se, então, 25 µL do reagente de detecção PE e incuba-se por mais 2h à

temperatura ambiente. Adicionam-se 150 µL do tampão de lavagem a cada poço e centrifuga-se a placa a 200g por 5 min. Repete-se o procedimento de lavagem e, por fim, o sobrenadante é descartado e adiciona-se novamente 200 µL do tampão de lavagem a fim de ressuspender o pellet. Os padrões e amostras foram adquiridos em citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados através do programa FCAP Array versão 1.0.1 (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary).

4.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo EDTA foram utilizadas para análise de citometria de fluxo no contexto *ex vivo*. O sangue foi submetido à lise das hemácias com solução à base de cloreto de amônio. Após lavagem com PBS as células foram incubadas com os anticorpos para marcação de superfície - inclusive os controles negativos (isotipos IgG1 e IgG2a) - diluídos em solução de diluição de anticorpos (PBS/BSA/Azida), nas concentrações previamente padronizadas. A suspensão de células mais os anticorpos foram incubados por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após esse tempo, foram adicionados 150 µL de PBS/BSA/Azida a 4°C. Centrifugou-se por 8 minutos, 300 g a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado de células em 200 µl de formaldeído 2% (v/v). Para marcação de FoxP3 (proteína intracelular), as células foram lavadas com PBS/BSA/Azida e então permeabilizadas em solução de saponina 0,1% (p/v) em PBS e incubadas com os anticorpos de marcação intracelular por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após nova lavagem, as células foram ressuspendidas em formaldeído 2% (v/v). Para marcação de proteínas fosforiladas (pDARPP e pAKT), utilizamos para lise das hemácias solução comercial *Lyse/Fix* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) pré-aquecida a 37 °C e para permeabilização solução *Perm Buffer III* a 4°C (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

As amostras foram transferidas para tubos FALCON™ de poliestireno, 5 mL - próprios para aquisição, que foi realizada com o instrumento FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A tabela 2 mostra quais marcadores foram utilizados nas análises de citometria de fluxo no presente estudo. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual das populações e subpopulações celulares foi realizada utilizando-se o programa FlowJo versão 7.6.5 (Tree-Star Inc., Ashland, OR, USA). A figura 1 exemplifica a estratégia de análise utilizada.

Tabela 2: subtipos celulares, receptores de neurotransmissores e proteínas intracelulares avaliados por citometria de fluxo.

Imunofenotipagem	CD3+CD4+ (linfócitos T auxiliares), CD3+CD8+ (linfócitos T citotóxicos), CD4+CD25+FoxP3+ (linfócitos T regulatórios), CD19+ (linfócitos B), CD56+CD16+ (células NK - <i>natural killer</i>), CD14+ (monócitos).
Receptores dopaminérgicos	DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 e DRD5.
Receptores e transportador serotoninérgicos	5-HTR _{1A} , 5-HTR _{1B} , 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} , 5-HTR _{2C} , 5-HTR ₃ , 5-HTR ₄ , 5-HTT.
Proteínas intracelulares fosforiladas	pDARPP32 (Thr 75) and pDARPP32 (Thr 34); pAKT (Thr 308) and pAKT (Ser 473).

Abreviações: 5-HTR = receptor serotoninérgico; AKT = proteína quinase B; DARPP = fosfoproteína regulada por dopamina e cAMP; DR = receptor dopaminérgico.

4.6 Análises estatísticas

Foi realizada análise descritiva de todas as variáveis. As variáveis foram avaliadas quanto à distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação das variáveis quantitativas foi utilizado o teste t de Student ou o Teste U de Mann-Whitney para dados com distribuição paramétrica ou não-paramétrica, respectivamente. A correlação entre os instrumentos de medida foi realizada através do coeficiente de correlação de Spearman (ρ). As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), assim como GraphPad Prism 4.0 para Windows™ (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Um valor de p bilateral menor que 0,05 foi adotado como nível de significância estatística para todos os testes.

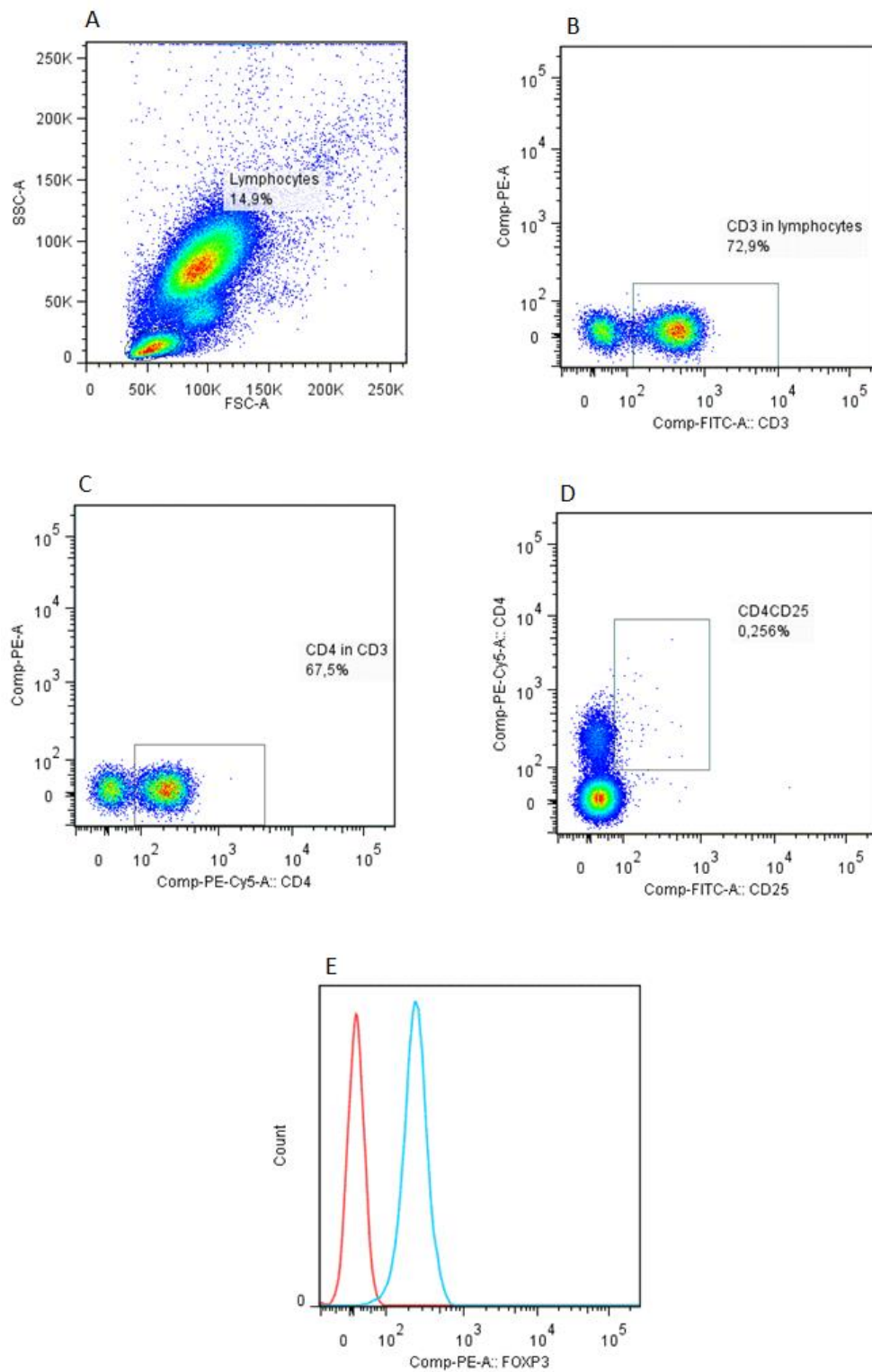


Figura 1: Exemplo ilustrativo de análise realizada no FlowJo 7.6.5. (A) Dot-plot demonstrando a região selecionada conforme tamanho e granulosidade para análise da população de linfócitos. (B) Dot-plot demonstrando a seleção da subpopulação de linfócitos CD3+. (C) Dot-plot demonstrando a subpopulação de células CD4+ dentro da população CD3+ representada em (B). (D) Dot-plot representativo da população de linfócitos CD4+CD25+. (E) Histograma representativo de uma população de células usada como controle negativo (controle de isotipo) em vermelho e das células CD4+CD25+ selecionadas em (D) e que expressam a proteína intracelular FoxP3 (azul).

5 RESULTADOS

No total foram avaliados 48 pacientes com diagnóstico de DP e 29 controles. Partindo dessa amostra, alguns indivíduos foram incluídos na dosagem de citocinas e fatores neurotróficos e/ou nas análises de citometria de fluxo, de forma que os resultados serão apresentados separadamente conforme a subamostra de indivíduos utilizada.

5.1 Dosagem de citocinas e fatores neurotróficos

Para dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas e fatores neurotróficos foram incluídos 40 pacientes com DP e 25 controles. A tabela 3 mostra as características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos nessas análises. Pacientes e controles não diferiram em relação ao sexo, idade, IMC e escolaridade. Os indivíduos controles apresentaram melhor desempenho cognitivo global do que os pacientes com DP como demonstrado pelo maior escore obtido pelos controles no MEEM. Além disso, pacientes com DP foram piores do que os controles na tarefa de programação da BAF, evidenciando prejuízo nesse domínio da função executiva. De fato, o déficit cognitivo observado na DP tem sido comumente relacionado ao comprometimento da função executiva. Os pacientes com diagnóstico de DP também apresentaram maior pontuação no BDI em comparação aos controles. Esse resultado evidencia que os pacientes apresentam mais sintomas depressivos (ou maior gravidade dos mesmos) do que indivíduos que não são diagnosticados com a DP.

Os resultados referentes às características clínicas dos pacientes com DP são apresentados na tabela 4. Os pacientes apresentaram, em média, aproximadamente 5 anos de diagnóstico de DP. Os valores obtidos na escala UPDRS mostraram comprometimento leve a moderado dos pacientes. Para a escala de estágios de incapacidade de Hoehn e Yahr (H&Y), a mediana obtida foi 2. Nesse estágio, o paciente apresenta alteração bilateral, mas sem déficit de equilíbrio. Em relação à escala de atividades de vida diária de Schwab e England (S&E), a mediana obtida foi de 80%, o que corresponde ao limite entre independência e dependência na realização das atividades de vida diária. A maioria dos pacientes com DP incluídos nesse estudo (92,5%) estava em uso de levodopa.

Tabela 3: Características clínicas (não motoras) e demográficas dos participantes da pesquisa incluídos nas dosagens de citocinas e fatores neurotróficos.

	Pacientes com DP (n = 40)	Controles (n = 25)	Valor p
Gênero (feminino/masculino)	13/27	6/19	0,58 ^a
Idade em anos (média ± dp)	68,71 ± 10,07	65,23 ± 8,75	0,20 ^b
Índice de massa corporal Kg/m ² (média ± dp)	26,02 ± 3,73	27,64 ± 3,71	0,09 ^c
Escolaridade em anos (média ± dp)	4,72 ± 2,87	6,72 ± 5,37	0,16 ^b
MEEM [média ± dp (mediana)]	24,00 ± 3,99 (25)	27,00 ± 3,57 (29)	0,001^b
BAF [média ± dp (mediana)]	11,49 ± 2,99 (12)	12,32 ± 3,67 (13)	0,28 ^b
Conceitualização	1,23 ± 1,01 (1)	1,64 ± 1,11 (2)	0,12 ^b
Flexibilidade mental	1,82 ± 1,10 (2)	2,08 ± 1,04 (2)	0,34 ^b
Programação	1,74 ± 0,91 (2)	2,24 ± 0,83 (2)	0,04^b
Sensibilidade à interferência	2,26 ± 0,94 (3)	1,84 ± 1,25 (2)	0,21 ^b
Controle inibitório	1,41 ± 0,88 (1)	1,52 ± 1,09 (1)	0,73 ^b
Autonomia ambiental	3,00 ± 0,00 (3)	3,00 ± 0,00 (3)	1,00 ^b
BDI [média ± dp (mediana)]	8,64 ± 7,58 (6)	2,76 ± 3,35 (1)	<0,001^b
Medicamentos em uso (frequência em %)			
Anti-hipertensivos (%)	55	48	0,62 ^a
Antidiabéticos (%)	10	20	0,29 ^a
Hipolipêmicos (%)	10	24	0,17 ^a
Levotiroxina (%)	10	4	0,64 ^a
Antidepressivos	20	12	0,51 ^a

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; dp = desvio padrão; BAF = Bateria de Avaliação Frontal; MEEM = Mini-Exame do Estado Mental; BDI = Inventário de Depressão de Beck. ^aTeste Exato de Fisher; ^bTeste Mann-Whitney; ^cTeste *t* de Student.

Tabela 4: Características clínicas (motoras) dos pacientes com doença de Parkinson incluídos nas dosagens de citocinas e fatores neurotróficos.

	Pacientes com DP (n = 40)
Tempo de diagnóstico em anos [média ± dp (variação)]	5,45 ± 4,13 (0,4 – 18)
UPDRS [média ± dp (variação)]	51,82 ± 25,27 (11 – 105)
UPDRS I [média ± dp (variação)]	3,36 ± 2,96 (0 – 11)
UPDRS II [média ± dp (variação)]	14,08 ± 7,14 (2 – 31)
UPDRS III [média ± dp (variação)]	34,56 ± 18,43 (8 – 69)
H&Y [média ± dp (variação)]	2,44 ± 0,69 (1 – 4)
S&E em % [média ± dp (variação)]	77,95 ± 11,96 (50 – 100)
Medicamentos em uso [frequência (%)]	
Levodopa	37 (92,50)
Pramipexol	20 (50,00)
Entacapona	7 (17,50)
Amantadina	11 (27,50)

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; dp = desvio padrão; UPDRS = Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson; H&Y = Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn and Yahr; S&E = Escala de Atividades de Vida Diária de Schwab e England.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos quanto à dosagem das adipocinas, receptores solúveis de TNF- α (sTNFRs), quimiocinas e fatores neurotróficos. Pacientes com DP e controles não diferiram estatisticamente em relação aos níveis plasmáticos de adipocinas (artigo 2), quimiocinas (artigo 4) e fatores neurotróficos (figura 2) avaliados. Pacientes com DP apresentaram um aumento significativo nos níveis plasmáticos dos sTNFRs em relação aos controles (artigo 3). A tabela 6 apresenta as correlações entre as variáveis clínicas ou citocinas/fatores neurotróficos analisados e as escalas utilizadas para avaliar desempenho cognitivo (MEEM e BAF) e sintomas depressivos (BDI).

Tabela 5: Concentrações plasmáticas (pg/mL) das adipocinas, receptores solúveis, quimiocinas e fatores neurotróficos avaliados em pacientes com DP e controles.

	Pacientes com DP (n = 40)	Controles (n = 25)	Valor p
Adipocinas			
Adiponectina	13113,33 ± 1586,94 (13375,71)	13428,60 ± 664,43 (13602,08)	0,66 ^a
Leptina	1424,63 ± 528,07 (1536,51)	1472,19 ± 400,93 (1641,59)	0,87 ^a
Resistina	2315,65 ± 514,87 (2271,53)	2271,90 ± 552,50 (2271,53)	0,75 ^b
Receptores solúveis			
sTNFR1	1168,62 ± 811,75 (931,41)	769,29 ± 295,86 (710,02)	0,01^a
sTNFR2	6387,77 ± 2630,90 (5610,94)	4906,28 ± 1519,31 (4955,72)	0,05^a
Quimiocinas			
Eotaxina	2897,14 ± 1542,20 (2896,50)	3303,42 ± 1762,07 (3012,26)	0,57 ^a
Eotaxina-2	2945,90 ± 1603,03 (2405,04)	2446,78 ± 1144,81 (2148,00)	0,20 ^a
IP-10	1655,26 ± 2567,31 (1150,47)	1421,98 ± 672,52 (1120,57)	0,98 ^a
MCP-1	4277,64 ± 6581,16 (3154,24)	3207,53 ± 1166,37 (3185,96)	0,89 ^a
Fatores Neurotróficos			
BDNF	4878,22 ± 2786,02 (4256,89)	4810,83 ± 3269,54 (4025,40)	0,69 ^a
Pro-BDNF	11526,15 ± 7599,66 (9423,39)	11638,26 ± 4738,97 (10237,25)	0,30 ^a
NGF	225,94 ± 297,01 (88,40)	112,78 ± 76,87 (76,56)	0,38 ^a
GDNF	661,2 ± 1242 (88,78)	127,4 ± 139,3 (68,67)	0,22 ^a
CNTF	630,33 ± 1585,85 (25,94)	176,24 ± 254,66 (53,58)	0,40 ^a
NT3	799,00 ± 1988,73 (92,55)	140,34 ± 145,35 (92,55)	0,40 ^a
NT4	697,91 ± 1768,08 (86,67)	94,09 ± 48,49 (87,68)	0,32 ^a

Resultados expressos em pg/mL [média ± desvio padrão (mediana)].

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; sTNFR = receptor solúvel do fator de necrose tumoral; IP = proteína induzida por interferon; MCP = proteína quimioatratadora de monócitos; BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; NGF = fator de crescimento neural; GDNF = fator neurotrófico derivado da glia; CNTF = fator neurotrófico ciliar; NT = neurotrofina. ^aTeste Mann-Whitney; ^bTeste t de Student

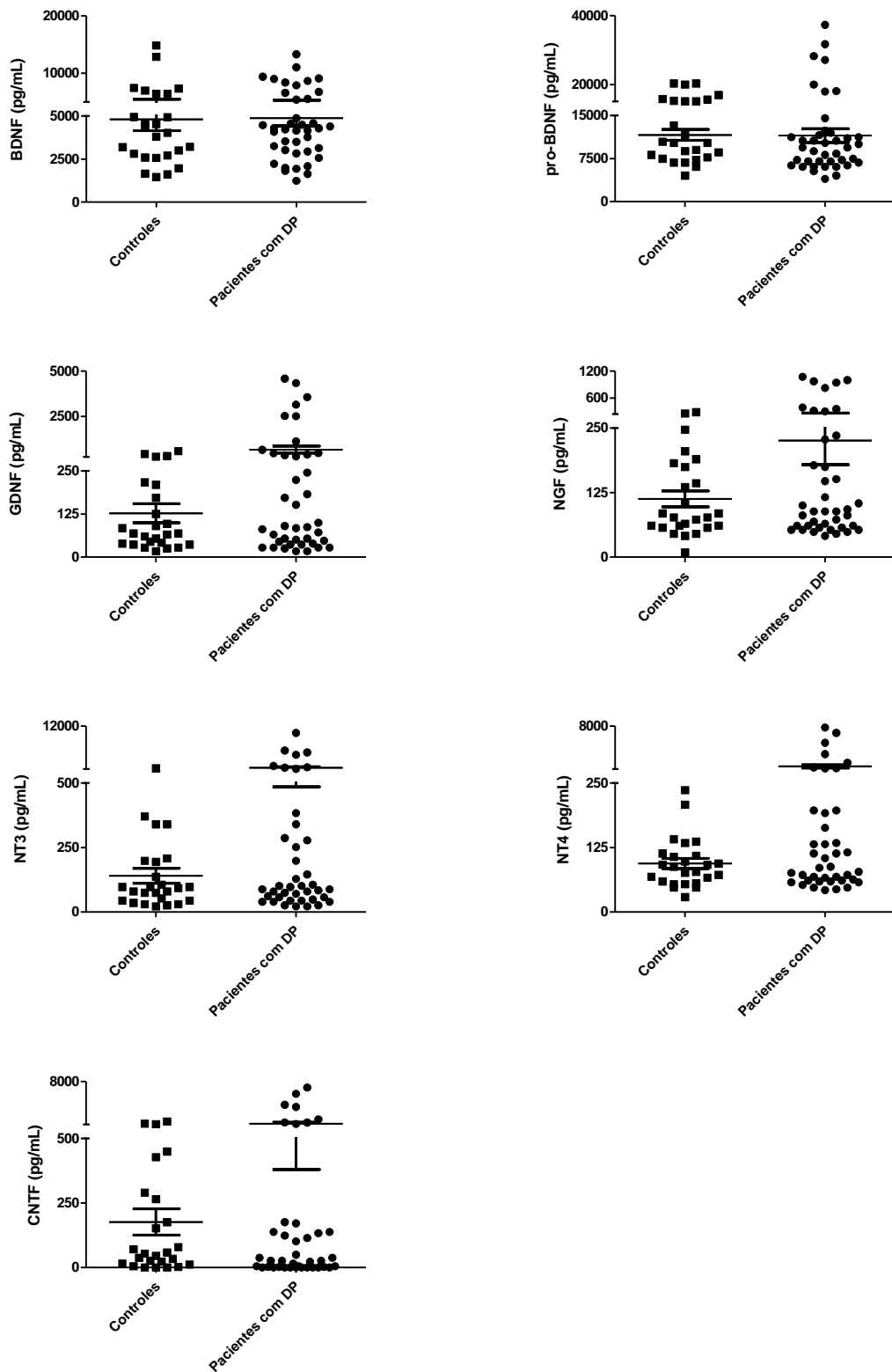


Figura 2: Análise da concentração plasmática de fatores neurotróficos. Pacientes com doença de Parkinson (DP) e controles não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos níveis plasmáticos dos fatores neurotróficos avaliados. BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; CNTF = fator neurotrófico ciliar; GDNF = fator neurotrófico derivado da glia; NGF = fator de crescimento neural; NT = neurotrofina.

Tabela 6: Correlações entre variáveis clínicas / citocinas / fatores neurotróficos e escalas utilizadas para avaliar desempenho cognitivo e sintomas depressivos.

		Pacientes com DP (n = 40)			Controles (n = 25)		
		MEEM	BAF	BDI	MEEM	BAF	BDI
UPDRS	rho	-0,316	- 0,242	0,421	-	-	-
	Valor <i>p</i>	0,057	0,150	0,010	-	-	-
H&Y	rho	- 0,149	- 1,34	0,440	-	-	-
	Valor <i>p</i>	0,372	0,424	0,006	-	-	-
S&E	rho	0,245	0,071	- 0,457	-	-	-
	Valor <i>p</i>	0,139	0,673	0,004	-	-	-
Tempo de diagnóstico	rho	- 0,075	- 0,305	0,048	-	-	-
	Valor <i>p</i>	0,651	0,059	0,771	-	-	-
Idade	rho	- 0,292	- 0,445	- 0,166	- 0,751	- 0,677	0,136
	Valor <i>p</i>	0,071	0,005	0,314	<0,0001	<0,0001	0,516
Escolaridade	rho	0,429	0,463	0,108	0,790	0,771	0,074
	Valor <i>p</i>	0,006	0,003	0,515	<0,0001	0,001	0,793
MEEM	rho	-	0,527	- 0,087	-	0,658	- 0,135
	Valor <i>p</i>	-	0,001	0,597	-	<0,0001	0,521
BAF	rho	0,527	-	- 0,091	0,658	-	- 0,534
	Valor <i>p</i>	0,001	-	0,580	<0,0001	-	0,006
BDI	rho	- 0,087	- 0,091	-	- 0,135	- 0,534	-
	Valor <i>p</i>	0,597	0,580	-	0,521	0,006	-
Adiponectina	rho	- 0,079	- 0,166	0,025	0,208	0,029	0,111
	Valor <i>p</i>	0,631	0,313	0,878	0,319	0,892	0,597
Leptina	rho	0,159	0,154	0,079	0,213	- 0,087	0,419
	Valor <i>p</i>	0,340	0,357	0,637	0,307	0,678	0,037
Resistina	rho	- 0,304	- 0,291	0,112	- 0,071	- 0,044	- 0,184
	Valor <i>p</i>	0,063	0,076	0,504	0,737	0,836	0,378
sTNFR1	rho	- 0,288	- 0,518	- 0,112	- 0,426	- 0,261	0,025
	Valor <i>p</i>	0,076	0,001	0,495	0,034	0,208	0,904
sTNFR2	rho	- 0,328	- 0,411	- 0,024	- 0,367	- 0,162	- 0,015
	Valor <i>p</i>	0,041	0,009	0,885	0,071	0,439	0,943

Tabela 6: continua

Tabela 6: continuação

		Pacientes com DP (n = 40)			Controles (n = 25)		
		MEEM	BAF	BDI	MEEM	BAF	BDI
Eotaxina	rho	0,152	- 0,113	-0,029	- 0,017	0,054	- 0,162
	Valor <i>p</i>	0,369	0,506	0,866	0,934	0,798	0,439
Eotaxina-2	rho	-0,148	- 0,113	0,133	- 0,093	- 0,065	- 0,086
	Valor <i>p</i>	0,380	0,505	0,432	0,660	0,757	0,684
IP-10	rho	- 0,395	- 0,458	0,109	0,335	- 0,014	0,255
	Valor <i>p</i>	0,016	0,004	0,522	0,102	0,947	0,219
MCP-1	rho	0,173	- 0,068	- 0,280	0,002	0,094	
	Valor <i>p</i>	0,306	0,688	0,093	0,992	0,653	
BDNF	rho	- 0,272	- 0,289	0,101	-0,013	0,155	- 0,547
	Valor <i>p</i>	0,094	0,074	0,539	0,953	0,460	0,005
Pro-BDNF	rho	- 0,073	0,159	-0,339	0,175	0,042	0,062
	Valor <i>p</i>	0,660	0,335	0,035	0,402	0,841	0,769
NGF	rho	0,029	- 0,153	0,097	-0,096	- 0,133	- 0,122
	Valor <i>p</i>	0,861	0,353	0,555	0,647	0,525	0,561
GDNF	rho	0,204	0,026	0,117	-0,096	- 0,079	- 0,079
	Valor <i>p</i>	0,212	0,875	0,479	0,648	0,708	0,709
CNTF	rho	0,197	- 0,112	- 0,152	0,257	0,234	- 0,071
	Valor <i>p</i>	0,229	0,498	0,356	0,215	0,260	0,736
NT3	rho	0,201	0,177	- 0,136	-0,045	0,008	- 0,362
	Valor <i>p</i>	0,220	0,282	0,409	0,830	0,968	0,076
NT4	rho	- 0,159	- 0,295	- 0,074	-0,002	- 0,067	- 0,061
	Valor <i>p</i>	0,335	0,069	0,652	0,993	0,749	0,772

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; UPDRS = Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson; H&Y = Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn and Yahr; S&E = Escala de Atividades de Vida Diária de Schwab e England; BAF = Bateria de Avaliação Frontal; MEEM = Mini-Exame do Estado Mental; BDI = Inventário de Depressão de Beck; sTNFR = receptor solúvel do fator de necrose tumoral; IP = proteína induzida por interferon; MCP = proteína quimioatratora de monócitos; BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; NGF = fator de crescimento neural; GDNF = fator neurotrófico derivado da glia; CNTF = fator neurotrófico ciliar; NT = neurotrofina.

Dentre as correlações estatisticamente significativas podemos observar que maior pontuação na UPDRS está associada à maior pontuação no BDI. Isso demonstra que maior gravidade de sintomas motores na DP está relacionada à maior gravidade de sintomas depressivos.

O aumento da idade está associado a um pior desempenho nos testes cognitivos (MEEM e BAF), tanto nos pacientes quanto nos controles. Além disso, maior escolaridade - avaliada conforme anos de estudo - está associada a um melhor desempenho nos testes cognitivos em ambos os grupos. Esses resultados já eram esperados, visto que aumento na idade e menor escolaridade são conhecidamente relacionados a um pior desempenho cognitivo.

Considerando pacientes com DP, os níveis plasmáticos de sTNFR1 correlacionaram negativamente com o escore na BAF. Embora não tenha atingido significância estatística, os níveis plasmáticos de sTNFR1 também correlacionaram negativamente com o escore no MEEM ($p = 0.076$). Igualmente, os níveis sTNFR2 correlacionaram negativamente com os escores no MEEM e BAF. Além disso, o aumento nos níveis plasmáticos da quimiocina IP-10 está associado a menores escores em ambos os testes cognitivos aplicados. Por último, o aumento nos níveis plasmáticos de pro-BDNF está associado a menores escores no BDI, ou seja, menor gravidade de sintomas depressivos.

Já em relação aos controles, a única associação significativa com os testes cognitivos utilizados ocorreu entre os níveis plasmáticos de sTNFR1 e o escore no MEEM, que correlacionaram negativamente. Além disso, aumento nos níveis plasmáticos de leptina e diminuição nos níveis de BDNF estão associados a maior escore no BDI, ou seja, maior gravidade de sintomas depressivos.

A seguir apresentamos os artigos 2, 3 e 4 que contém os dados publicados acerca dos resultados obtidos nessa etapa. Vale a pena mencionar que os resultados referentes à dosagem das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF serão apresentados posteriormente, juntamente com os resultados referentes à imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Artigo 2: “Circulating levels of adipokines in Parkinson's disease”

Natália Pessoa Rocha, Paula Luciana Scalzo, Izabela Guimarães Barbosa, Mariana Soares de Sousa, Isabela Boechat Morato, Érica Leandro Marciano Vieira, Paulo Pereira Christo, Helton José Reis, Antônio Lúcio Teixeira.

Circulating levels of adipokines in Parkinson's disease

Natália Pessoa Rocha^{1,2*}, Paula Luciana Scalzo³, Izabela Guimarães Barbosa¹, Mariana Soares de Sousa⁴, Isabela Boechat Morato^{1,2}, Érica Leandro Marciano Vieira¹, Paulo Pereira Christo⁴, Helton José Reis^{2a} and Antônio Lúcio Teixeira^{1a*}

¹Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Laboratório de Neurobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Santa Casa de Belo Horizonte Hospital, Belo Horizonte, Brazil.

^a These authors contributed equally

*Corresponding authors:

Natália Pessoa Rocha (npessoarocha@gmail.com) and Antônio Lúcio Teixeira (altextr@gmail.com)

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica.

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Sala 281 - Belo Horizonte, MG – Brazil – Postal Code: 30130-100.

Tel.: +55 31 34098073.

Running title: Adipokines in Parkinson's disease

Financial disclosure / Conflict of interest: Nothing to report.

Funding: This research was supported by FAPEMIG, CNPq and CAPES.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disorder worldwide and the main cause of parkinsonism, a highly disabling syndrome [1]. Studies have concordantly shown that PD patients present lower body weights in comparison with age-matched subjects. The unintended weight loss can even precede the motor signs required for clinical diagnosis in PD. Several factors have been proposed to explain this weight change, including anorexia, dysphagia, reduced sense of smell and taste, altered gastrointestinal motility and absorption and increased energy requirements [2]. However, the mechanisms underlying the weight loss in PD are still unknown. Besides the unintended weight loss, PD has also been associated with reduced prevalence of cardiovascular risk factors, such as arterial hypertension, diabetes and dyslipidemia [3]. Here again the mechanisms involved have not been completely elucidated.

The cause of neurodegeneration observed PD is not fully understood. Inflammation has been proposed as one of the factors contributing to the onset and progression of neuronal death in PD. *Postmortem*, epidemiological, genetic and immunological studies in humans and animal models have supported this hypothesis [4]. Activated microglial cells were found within the *substantia nigra pars compacta* (SNPc) of PD patients [5]. Increased levels of proinflammatory cytokines [6-8], human leukocyte antigen (HLA)-DR-positive microglia and infiltrating CD8+ cells [5] were reported in PD brains. Analyses of blood have also demonstrated that levels of inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 [9-11], tumor necrosis factor (TNF)- α [11] and its soluble receptor sTNFR1 [12], IL-2 [11, 13], interferon (IFN)- γ [11], IL-1 β [14] and IL-10 [11, 15] are increased in PD patients compared to age-related control individuals, indicating a peripheral proinflammatory status.

Among several inflammatory molecules, adipokines are of great interest since they are involved not only in inflammation but also in other physiological process. Adipokines are adipocyte-derived secretory factors, which have functions in satiety, energetic homeostasis, insulin sensitivity, vascular disease and also in immune response. Leptin, adiponectin and resistin are typical examples of adipokines [16, 17]. The physiological function of leptin involves appetite control through the central nervous system [18]. It is generally accepted that leptin acts as a proinflammatory adipokine, since it induces the production of TNF- α and IL-6 by monocytes [19] and enhances the mRNA expression of CC-chemokines, including CCL3, CCL4 and CCL5 [20]. In contrast to leptin, adiponectin levels are decreased in obesity and it

appears to have anti-inflammatory effects, resulting in TNF- α and IFN- γ decrease and IL-10 increase [21,22]. Adiponectin levels are also decreased in insulin resistance [23]. Unlike leptin and adiponectin, the role of resistin in human physiology and inflammation is more controversial. Resistin has at first been suggested as an adipokine upregulated during weight gain, impairing insulin sensitivity, which provided a direct connection between adiposity and insulin resistance [24, 25]. This role, however, seems to be limited to rodents [26]. In addition, resistin synthesis is restricted to adipocytes in mice, whereas in humans resistin is mainly produced by leukocytes [16]. Nonetheless, the proinflammatory properties of resistin in human mononuclear cells are evident, since resistin promotes the expression of TNF- α and IL-6 by these cells [27].

Since weight loss, reduced prevalence of cardiovascular risk factors and peripheral proinflammatory status are described in PD, and the adipokines are strongly associated with all these processes, studies have hypothesized that adipokines levels are altered in PD patients. Until now however the few studies about this topic failed to show any alteration in adipokines levels in PD. Since the literature about adipokines in PD is still scarce, this study was designed to investigate adipokines levels - adiponectin, leptin and resistin – in PD patients and compare them to control individuals. Also, we aimed to evaluate association between adipokine levels and clinical variables in PD.

Methods

Subjects

This study included 40 PD patients diagnosed according to the United Kingdom PD Brain Bank criteria [28] and a group of 25 controls matched by age, gender, body mass index (BMI) and educational level. Patients were recruited from the outpatient movement disorders clinic of the ‘Santa Casa de Belo Horizonte’ Hospital, Belo Horizonte, Brazil. Controls were recruited from the local community. Participants reported no weight changes in the three months preceding the study and were excluded if they had undergone previous neurosurgery or if they had any other neurological disorder and/or cognitive decline (*i.e.*, delirium or dementia, according to the DSM-IV criteria), significant sensory impairment and infectious or autoimmune diseases in activity in the previous 4 weeks. In addition, individuals who had used corticosteroids, anti-inflammatories or antibiotics in the 4 weeks prior to the study were excluded. All subjects provided written informed consent before admission to the study. This study was approved by the Research Ethics Committee of the *Universidade Federal de Minas Gerais*, Brazil. An overview of the demographic and clinical characteristics of the sample enrolled in this study is given in Table 1. PD patients and controls did not differ in age, gender, BMI index, educational level and use of medications (except for those used for PD treatment).

Clinical evaluation

All patients were evaluated with the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [29] which assesses different signs and symptomatic dimensions of PD. The UPDRS scores were obtained in the “on” state. In order to estimate the PD disease staging, we applied the modified Hoehn and Yahr Staging Scale (HY) [30]. Also, the modified Schwab and England Activities of Daily Living Scale (S&E) assessed disability in performing activities of daily living in PD patients [29].

All individuals were subjected to cognitive examination, which included the Mini-Mental State Examination (MMSE) [31] adapted for the Brazilian elderly population [32]. The MMSE is a brief battery for cognitive screening, comprising 30 items from different domains such as orientation, attention, memory and language [31]. It is a traditional test used to assess overall cognitive performance and to screen for dementia.

Adipokines assessment

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin (Vacuplast, Huangyn, China) on the same day of the clinical assessment. In order to rule out any confounding factors caused by circadian rhythm and fasting/feeding conditions, all samples were collected at the same time of the day, 4 hours after the last meal. The whole blood samples were kept at room temperature and used within 2 hours of having been drawn. These samples were then centrifuged at 3,000 g for 10 min, 4 °C, twice. The plasma was collected and stored at -70 °C until assayed.

Plasma levels of leptin, adiponectin and resistin were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) according to the procedures supplied by the manufacturer (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). All samples were assayed in duplicate and analyses were performed blinded. Lower detection limits for all analyzed adipokines were 5 pg/mL. Concentrations are expressed as pg/mL.

Statistical analysis

Association between dichotomous variables was assessed by the Fisher's exact test. All variables were tested for Gaussian distribution by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Two groups (patients *vs.* controls) were compared by Mann-Whitney or Student's *t* tests when non-normally or normally distributed, respectively. Leptin levels are gender-dependent [33] and are higher in women than in men even when adjusted for BMI, being important to report calculations of men and women separately. Spearman's correlation analyses were performed to examine the relationship between clinical variables and plasma levels of adiponectin, leptin and resistin. All statistical tests were two-tailed and were performed using a significance level of $\alpha=0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Socio-demographic and clinical results

PD patients presented lower score in the MMSE than controls (Table 1). Patients had in average 5.45 years of PD diagnosis. In general, motor impairment was considered mild to moderate based on UPDRS and H&Y scores (means \pm standard deviations (SD) = 51.82 ± 25.27 and 2.44 ± 0.69 , respectively). The means \pm SD of the UPDRS I, II and III were 3.36 ± 2.96 , 14.08 ± 7.14 and 34.56 ± 18.43 , respectively. The S&E ADL score was $77.95 \pm 11.96\%$. The great majority of PD patients (92.5%) was in use of Levodopa. The other antiparkinsonian drugs in use were Pramipexole (50.0%), Entacapone (17.5%) and Amantadine (27.50%).

Plasma adipokines levels

There was no significant difference between PD patients and controls regarding plasma levels of the evaluated adipokines (Figure 1). Adiponectin levels were [mean \pm SD (median)] = $13,113.33 \pm 1,586.94$ (13,375.71) pg/mL and $13,428.60 \pm 664.43$ (13,602.08) pg/mL for PD patients and controls, respectively ($P=0.66$, Mann-Whitney test). Resistin levels were $2,272.90 \pm 552.50$ (2,271.53) pg/mL and $2,315.65 \pm 514.87$ (2,271.53) pg/mL for PD patients and controls, respectively ($P=0.75$, Student's *t* test). As expected, leptin plasma concentrations were higher in women than in men, either in controls ($P=0.04$; Student's *t* test) and in PD patients ($P<0.01$; Student's *t* test). Women's leptin levels were $1,752.74 \pm 330.30$ (1,843.32) pg/mL and $1,763.07 \pm 102.17$ (1,745.64) pg/mL for PD patients and controls, respectively ($P=0.94$, Student's *t* test). Men's leptin levels were $1,260.58 \pm 536.22$ (1,283.15) pg/mL and $1,380.34 \pm 417.52$ (1,404.28) pg/mL for PD patients and controls, respectively ($P=0.43$, Student's *t* test).

In PD patients, higher leptin levels were associated with increased age ($\rho=0.361$, $P=0.02$) and BMI ($\rho=0.531$, $P<0.01$). No other correlation was found between adipokines levels and clinical or demographic data.

Discussion

In the current study we demonstrated that circulating levels of the adipokines adiponectin, leptin and resistin are not changed in PD patients when compared to BMI-, gender- and age-matched controls. In addition, adipokines levels were associated neither with disease duration nor with the degree of motor or functional impairment as assessed by the UPDRS.

Most of studies investigating peripheral adipokines levels in PD are focused on unintended weight loss and leptin. Similar to our data, these studies have found comparable leptin concentrations between PD patients and controls matched by age and BMI [34-36]. As expected, leptin levels correlated positively with BMI. Lower leptin levels were found in PD patients with weight loss. The results indicate that unintended weight loss in PD patients is unlikely to be due to abnormal leptin concentrations. As leptin is mainly produced by subcutaneous fat, the lower leptin values in weight losing PD patients seems to be related to decreased body fat mass.

There is only one previous study which evaluated adiponectin, leptin and resistin simultaneously in PD and control subjects. They focused on diurnal rhythmicity of adipokines production. Corroborating our data they reported that serum levels of these adipokines did not differ between PD patients and age-, gender- and fat mass-matched controls. Also in agreement with our results, serum levels of leptin, adiponectin, and resistin were not associated with clinical parameters in PD [37]. It is worth mentioning that sample size was a limitation of the study, since they have evaluated only 16 subjects, *i.e.*, 8 PD patients and 8 controls. Also the differences between the sample assessed by Aziz et al [37] and our sample must be taken into account. While they evaluated early PD patients (mean age 61 years; mean disease duration 1.4 years; mean total UPDRS score 20.3; mean motor UPDRS score 11.0), we assessed advanced PD patients (mean age 68 years; mean disease duration 5.5 years; mean total UPDRS score 51.8; mean motor UPDRS score 34.6). Since we used a distinct and independent sample and we found neither a difference between patients and controls nor any association between adipokines levels with clinical parameters, our results are important to confirm the previous findings.

Another study evaluated serum adiponectin concentration in a group of PD patients in advanced stages of the disease. Here again, adiponectin serum levels in PD patients were not changed in comparison with a group of normal-weight, healthy and young subjects [38]. In

other neurodegenerative disorders, for instance Alzheimer's disease, peripheral adiponectin levels were reported to be decreased in comparison with elderly controls [39]. Our data and previous studies do not prove the same in PD, indicating that different inflammatory/immune pathways are probably involved in distinct neurodegenerative diseases.

Increased body weight has been reported in PD patients after deep brain stimulation (DBS) in the subthalamic nucleus (STN), but the mechanisms involved are still unknown. Some authors therefore have investigated changes in leptin levels due to STN-DBS in PD patients. Although some patients showed increased weight after surgery, leptin [40-42] and also adiponectin and resistin [42] levels did not differ between baseline (before surgery) and 3, 6 or 12 months after surgery. These results reinforce the hypothesis that adipokine levels - mainly leptin - are associated with BMI and/or fat mass rather than with PD itself.

Limitations of our study include the fact that all patients were medicated and the observed findings might also be influenced by their ongoing treatment. However, it is worth mentioning that the use of antiparkinsonian or other drugs such as anti-diabetic and hypolipidemics did not influence adipokines levels in the present study. Individuals' body-fat percentage and regular practice of physical activities were not taken into account in the present work, and they can also interfere in circulating adipokines levels. By contrast, the strict exclusion criteria, the selection of controls with comparable age, gender and BMI, and the analysis of clinical and inflammatory parameters together can be regarded as strengths of the study.

In conclusion, although adipokines play relevant roles in inflammatory response and inflammation has been associated with the underlying pathophysiology of PD, it seems that adipokines are not implicated in this process. Also the weight loss and reduced prevalence of cardiovascular risk factors observed in PD might not be due to changes in adipokines levels.

Acknowledgments

This study was supported by Fapemig, Brazil. NPR is currently a CNPq SWO scholarship recipient. ELMV and IGB are postdoctoral fellows of CNPq and CAPES, respectively. IBM is a CNPq undergraduate scholarship recipient. ALT and HJR are CNPq fellowship recipients.

Author Roles

NPR, ALT and HJR worked on the conception and organization of the research project. NPR, PLS, IGB, MSS, IBM, ELMV and PPC worked on the execution of the research project. NPR and ALT designed and executed the statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. ALT and HJR reviewed the statistical analyses and the manuscript.

References

- 1 Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;363(9423):1783-93.
- 2 Bachmann CG, Trenkwalder C. Body weight in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21(11):1824-30.
- 3 Scigliano G, Musicco M, Soliveri P, Piccolo I, Ronchetti G, Girotti F. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a case-control study. *Stroke*. 2006;37(5):1184-8.
- 4 Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2012;62(7):2154-68.
- 5 McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988;38(8):1285-91.
- 6 Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994;172(1-2):151-4.
- 7 Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci Lett*. 2007;414(1):94-7.
- 8 Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*. 1994;180(2):147-50.
- 9 Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One*. 2012;7(10):e47387
- 10 Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett*. 2010;468(1):56-8.

- 11 Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*. 2008;441(2):158-62.
- 12 Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 2009;216(1-2):122-5.
- 13 Stypuła G, Kunert-Radek J, Stepień H, Zylińska K, Pawlikowski M. Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3(2-3):131-4.
- 14 Katsarou Z, Bostantjopoulou S, Hatzizisi O, Giza E, Soler-Cardona A, Kyriazis G. Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease. *Rev Neurol*. 2007;45(12):725-8.
- 15 Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. 2008;167(1):90-5.
- 16 Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
- 17 Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004;92(3):347-55.
- 18 Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
- 19 Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol*. 1999;194(1):6-11.
- 20 Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(3):311-5.
- 21 Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the

- family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000;96(5):1723-32.
- 22 Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):630-5.
 - 23 Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(5):1930-5.
 - 24 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
 - 25 Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J*. 2012;36(5):317-27.
 - 26 Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4848-56.
 - 27 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005;174(9):5789-95.
 - 28 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(3):181-4.
 - 29 Fahn S, Elton R. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Caine DB, Goldstein M. Eds. *Recent developments in Parkinson's disease*, vol 2. 1987; p153–163, 293–304.
 - 30 Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967;17(5):427-42.

- 31 Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 12:189-198.
- 32 Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61:777-781.
- 33 Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med.* 1996;2(9):949-50.
- 34 Evidente VG, Caviness JN, Adler CH, Gwinn-Hardy KA, Pratley RE. Serum leptin concentrations and satiety in Parkinson's disease patients with and without weight loss. *Mov Disord.* 2001;16(5):924-7.
- 35 Lorefält B, Toss G, Granérus AK. Weight loss, body fat mass, and leptin in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2009;24(6):885-90.
- 36 Fiszer U, Michałowska M, Baranowska B, Wolińska-Witort E, Jeske W, Jethon M, Piaścik-Gromada M, Marcinowska-Suchowierska E. Leptin and ghrelin concentrations and weight loss in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2010;121(4):230-6.
- 37 Aziz NA, Pijl H, Frölich M, Roelfsema F, Roos RA. Leptin, adiponectin, and resistin secretion and diurnal rhythmicity are unaltered in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011;26(4):760-1.
- 38 Cassani E, Canello R, Cavanna F, Maestrini S, Di Blasio AM, Liuzzi A, Pezzoli G, Barichella M. Serum adiponectin levels in advanced-stage Parkinson's disease patients. *Parkinsons Dis.* 2011;2011:624764.
- 39 Teixeira AL, Diniz BS, Campos AC, Miranda AS, Rocha NP, Talib LL, Gattaz WF, Forlenza OV. Decreased levels of circulating adiponectin in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2013;15(1):115-21.
- 40 Escamilla-Sevilla F, Pérez-Navarro MJ, Muñoz-Pasadas M, Sáez-Zea C, Jouma-Katati M, Piédrola-Maroto G, Ramírez-Navarro A, Mínguez-Castellanos A. Change of the

melanocortin system caused by bilateral subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2011;124(4):275-81.

- 41 Markaki E, Ellul J, Kefalopoulou Z, Trachani E, Theodoropoulou A, Kyriazopoulou V, Constantoyannis C. The role of ghrelin, neuropeptide Y and leptin peptides in weight gain after deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2012;90(2):104-12.
- 42 Novakova L, Haluzik M, Jech R, Urgosik D, Ruzicka F, Ruzicka E. Hormonal regulators of food intake and weight gain in Parkinson's disease after subthalamic nucleus stimulation. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32(4):437-41.

Table 1

Demographic and non-motor features of Parkinson's disease (PD) patients and control subjects.

	PD patients (n = 40)	Control subjects (n = 25)	<i>p</i> value
Gender (female/male)	13/27	6/19	0.58 [†]
Age in years (mean ± SD)	68.71 ± 10.07	65.23 ± 8.75	0.16 [#]
Body mass index in Kg/m ² (mean ± SD)	26.02 ± 3.73	27.64 ± 3.71	0.09 [#]
Educational level in years [mean ± SD (median)]	4.72 ± 2.87 (4)	6.72 ± 5.37 (6)	0.16 ^{††}
MMSE [mean ± SD (median)]	24.00 ± 3.99 (25)	27.00 ± 3.57 (29)	0.001 ^{††}
Medication in use (frequency in %)			
Anti-hypertensive (%)	55.00	48.00	0.62 [†]
Anti-diabetic (%)	10.00	20.00	0.29 [†]
Hypolipidemic (%)	10.00	24.00	0.17 [†]
Levothyroxine (%)	10.00	4.00	0.64 [†]
Antidepressants (%)	20.00	12.00	0.51 [†]

Abbreviations: PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation; MMSE = Mini-Mental State Examination;

[†] Fisher's exact test; ^{††} Mann-Whitney test; [#] Student's *t* test.

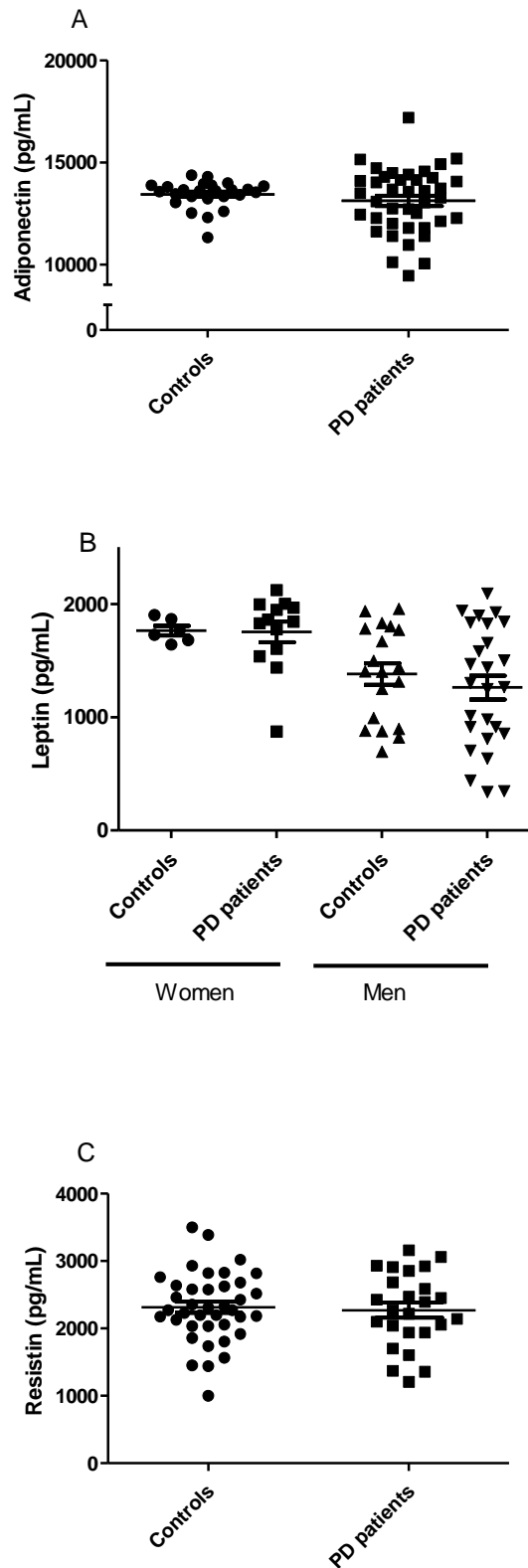


Fig. 1: Control individuals and Parkinson's disease (PD) patients presented similar plasma levels of Adiponectin (A), Leptin (B) and Resistin (C). The figure shows mean and standard error of the mean.

Artigo 3: “Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease.”

Natália Pessoa Rocha, Antônio Lúcio Teixeira, Paula Luciana Scalzo, Izabela Guimarães Barbosa, Mariana Soares de Sousa, Isabela Boechat Morato, Érica Leandro Marciano Vieira, Paulo Pereira Christo, Andrés Palotás, Helton José Reis.

Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's Disease

Natália Pessoa Rocha, MSc,^{1,2} Antônio Lúcio Teixeira, MD, PhD,¹ Paula Luciana Scalzo, PhD,³ Izabela Guimarães Barbosa, MD, PhD,¹ Mariana Soares de Sousa, MD,⁴ Isabela Boechat Morato,^{1,2} Érica Leandro Marciano Vieira, PhD,¹ Paulo Pereira Christo, MD, PhD,⁴ András Palotás, MD, PhD,^{5*} and Helton José Reis, PhD²

¹Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Laboratório de Neurobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Santa Casa de Belo Horizonte Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵Asklepios-Med (private medical practice and research center), Szeged, Hungary

*Correspondence to: Dr. András Palotás, Asklepios-Med, H-6722 Szeged, Kossuth Lajos sgt. 23, Hungary; palotas@asklepios-med.eu

Funding agencies: CNPq, CAPES, FAPEMIG and Asklepios-Med. NPR is a CNPq SWO scholarship recipient. IGB and ELMV are post-doctoral fellows of CAPES and CNPq, respectively. IBM holds a CNPq undergraduate grant. ALT and HJR are awarded a CNPq fellowship. AP is funded by Asklepios-Med.

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report.

Abstract

Inflammatory mechanisms have been implicated in a series of neuropsychiatric conditions, including behavioral disturbances, cognitive dysfunction, and affective disorders. Accumulating evidence also strongly suggests their involvement in the pathophysiology of Parkinson's disease (PD). This study aimed to evaluate plasma levels of inflammatory biomarkers, and their association with cognitive performance and other non-motor symptoms of PD. PD patients and control individuals were subjected to various psychometric tests, including the Mini-Mental State Examination (MMSE), Frontal Assessment Battery (FAB), and Beck's Depression Inventory (BDI). Biomarker plasma levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). PD patients exhibited worse performance on MMSE and the programming task of FAB, and presented higher soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFR) plasma levels than control individuals. Among PD patients, increased sTNFR1 and sTNFR2 concentrations were associated with poorer cognitive test scores. After multiple linear regression, sTNFR1 and education remained a significant predictor for FAB scores. Our data suggest that PD is associated with a proinflammatory profile, and sTNFRs are putative biomarkers of cognitive performance, with elevated sTNFR1 levels predicting poorer executive functioning in PD patients.

Key Words: cognition; inflammation; non-motor symptoms; Parkinson's disease; tumor necrosis factor

Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by the specific loss of neurons in the nigrostriatal system causing distinctive motor disturbance, however non-motor symptoms (NMS) are also frequent and disabling. One of the most common NMS is cognitive impairment, which progresses as PD advances and leads to poorer quality of life.¹⁻³ Inflammatory mechanisms have been associated with cognitive performance in neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease (AD) and bipolar disorder,^{4,5} and they are also known to play roles in the pathophysiology of PD.⁶

Tumor necrosis factor (TNF)- α is the prototype of proinflammatory cytokine, produced by different cellular sources including macrophages and lymphocytes, in addition to astrocytes and neurons. It binds to TNF-receptor (TNFR)-1 and TNFR2, both of which are also present as soluble forms (sTNFR1 and sTNFR2).⁷ At low concentrations, sTNFRs are able to stabilize TNF- α activity by gradually binding/releasing the cytokine. On the other hand, high amounts of these receptors are known to antagonize the biological effect of TNF- α . sTNFR1 and sTNFR2 are released in response to changing levels of TNF- α . As such, sTNFRs levels reflect TNF- α secretion because their release is regulated by the availability of TNF- α ; therefore, sTNFRs seem to be more reliable markers of TNF- α activity than TNF- α itself.⁸

sTNFRs have been associated with cognitive symptoms in AD and other neurocognitive disorders; however, their association with the clinical variables in PD, notably cognitive parameters, remains underinvestigated. Even though it is reasonable to hypothesize that inflammatory biomarkers are also linked with poorer cognitive performance in PD, their role has not been fully characterized. The aim of this study, therefore, was to assess the plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2 and their possible association with cognitive performance in PD.

Subjects and Methods

Subjects and Clinical Evaluation

This study included 40 PD patients diagnosed according to the United Kingdom PD Brain Bank criteria⁹ and a group of 25 controls. All subjects provided written informed consent before admission to the study. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. The patients were evaluated during their on state using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS).¹⁰ The modified Hohn and Yahr staging scale (H&Y) served to establish the stage of PD, and the modified Schwab and England activities of daily living (ADL) scale (S&E) was employed to assess the daily routine of PD patients.¹¹ All individuals were subjected to a full cognitive assessment, which included the Mini-Mental State Examination (MMSE) adapted for the Brazilian elderly population. The cutoff score established for the low level of education of the participants is MMSE = 18, and subjects with poorer test values were excluded from this study.^{12,13} Because impairment in executive functioning is the most common cognitive deficit in PD, the Frontal Assessment Battery (FAB) was also used.^{14,15} In addition, Beck's Depression Inventory (BDI) was also used to determine whether cognitive functions were influenced by affective symptoms.¹⁶ The BDI is a validated tool for screening and diagnosing depression in PD.^{17,18}

Measurement of sTNFR1 and sTNFR2

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin (Vacuplast, Huangyn, China) on the same day of the clinical assessment. Plasma was collected and stored at -70°C until assayed. Levels of sTNFR1 and sTNFR2 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical Analysis

Association between dichotomous variables was assessed with the Fisher's exact test. All variables were tested for Gaussian distribution by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Two groups (patients vs controls) were compared by Mann-Whitney or Student t tests when non-normally or normally distributed, respectively. Spearman's correlation analyses were performed to examine the relationship between clinical variables and plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2. Multiple linear regression analysis was conducted to evaluate the

contribution of independent variables in the total FAB score. All statistical tests were 2-tailed and were performed using a significance level of $\alpha=0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Sociodemographic, Clinical, and Cognitive Results

Demographic and clinical features of both groups are shown in Table 1. Among PD patients, age correlated negatively with total FAB score ($\rho = -0.445$, $p = 0.005$). Higher educational attainment was associated with better cognitive performance, as assessed by MMSE ($\rho = 0.455$, $p = 0.004$) and FAB scores ($\rho = 0.483$, $p = 0.002$).

Plasma sTNFR1 and sTNFR2 Levels

PD patients presented higher plasma sTNFR1 ($p = 0.01$; Fig. 1A) and sTNFR2 ($p = 0.05$; Fig. 1B) concentrations compared to control individuals (Table 1). sTNFR1 and sTNFR2 plasma levels in PD correlated positively with age ($\rho = 0.574$, $p < 0.001$ and $\rho = 0.387$, $p = 0.014$, respectively) and negatively with total FAB score ($\rho = -0.518$, $p = 0.001$ and $\rho = -0.411$, $p = 0.009$, respectively), conceptualization ($\rho = -0.345$, $p = 0.031$ and $\rho = -0.460$, $p = 0.003$, respectively) and mental flexibility ($\rho = -0.528$, $p = 0.001$ and $\rho = -0.419$, $p = 0.008$, respectively). In addition, sTNFR1 plasma level correlated negatively with sensitivity of interference ($\rho = -0.453$, $p = 0.004$) and sTNFR2 with MMSE ($\rho = -0.328$, $p = 0.041$). It is worth mentioning that sTNFR1 level also correlated with MMSE, but this correlation did not reach a statistical significance ($\rho = -0.288$, $p = 0.076$). There were no significant correlations between the sTNFR1 and sTNFR2 levels and the UPDRS and its subtests, H&Y score, or S&E scale.

Multiple Linear Regression Analysis

Analyzed independent variables included those considered as putative predictors for total FAB score; ie. age, educational level, BDI score, sTNFR1 plasma concentration, and sTNFR2 plasma concentration. The regression model was significant ($P < 0.001$). In our sample, these variables accounted for 49.6% of the variance in FAB performance. However, only sTNFR1 plasma level and educational level were found to be significant predictors for FAB score ($\beta = -0.704$; $p = 0.004$ and $\beta = 0.375$; $p = 0.009$, respectively).

Multiple regression analysis with MMSE as the dependent variable was not possible because scores were not normally distributed even after several attempts at data transformation.

Discussion

This report demonstrates that the plasma levels of both soluble TNF- α receptors (sTNFR1 and sTNFR2) are increased in PD, suggesting a proinflammatory state in the disease. In line with this observation, previous studies have also found increased TNF- α levels in brain and cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients.^{19,20} Not only TNF- α , but also sTNFR1 has been found to be increased in PD brains.²⁰ Considering peripheral TNF- α levels (ie, when evaluated in serum, plasma, or produced by peripheral cells) the results are conflicting. Although some studies have found an increase in levels of TNF- α in PD patients in comparison with age-related controls,^{21,22} others have found no difference between these groups.^{23,24} Moreover, one study found that the production of TNF- α by monocytes and macrophages was significantly lower in PD patients when compared to the control groups, which included age-related individuals and also patients with cerebrovascular disease.²⁵ These discordant results may be a consequence of the chemical instability of the TNF- α molecule. It is possible that TNF- α is degraded shortly after its production and, for this reason, sTNFRs appear to be more reliable markers of TNF- α activity than TNF- α itself.

Our work group has previously shown an increase in serum level of sTNFR1 in PD patients compared to controls, but no association between the levels of sTNFRs and motor signs in PD was found.²⁴ In the present study, we also failed to demonstrate any association between the levels of sTNFRs and motor signs. Nonetheless, our current findings showed that among PD patients higher plasma levels of sTNFRs were associated with worse performance in executive functions, as we observed in the total FAB score, conceptualization, and mental flexibility. These associations were not observed in control subjects. After performing multiple regression analysis, we showed that the plasma level of sTNFR1 and the level of formal education are significant predictors of FAB performance in PD patients. Corresponding to our data, other studies have reported that higher peripheral levels of sTNFR1 are associated with poorer cognitive performance in other neuropsychiatric disorders, such as bipolar disorder and AD.^{4,5}

To the best of our knowledge, this is the first publication to describe the association between peripheral levels of sTNFRs and cognitive performance in PD. In line with our results, Menza and colleagues²⁶ evaluated 52 PD patients with depression and they found a negative correlation between plasma TNF- α levels and cognition. However, all patients were diagnosed as depressed. As such, confounding factors might be considered because both

cognition and circulating levels of cytokines are altered in depression. Also, cognition was evaluated based on the sum of a range of cognitive test scores and they did not describe any association between TNF- α levels and performance on specific cognitive tests.²⁶

All patients in our study were medicated, and the findings observed might have been influenced by their ongoing treatments. In addition, individuals' body fat percentage and regular practice of physical activities were not taken into account, which can also interfere with circulating cytokine levels. Also, the fact that some data were not normally distributed even after transformation (mainly MMSE) limited the statistical analyses. By contrast, the strict exclusion criteria, the selection of controls with comparable age, gender, educational level, body-mass index (BMI), and the combined analysis of cognitive, depressive, and inflammatory parameters can be regarded as strengths of the study. Finally, the use of multiple statistical tests also needs to be considered when drawing conclusions from our data.

Altogether, our results reinforce the hypothesis that PD is associated with a proinflammatory profile and suggest that sTNFRs are putative biomarkers of cognitive performance in PD. Especially higher sTNFR1 level predicted poorer executive functioning in PD patients, as evaluated through FAB. Additional studies are needed to elucidate the role of sTNFRs in PD, especially with respect to cognitive impairment.

Acknowledgments: Authors would like to acknowledge the participation of volunteers in this study, and are indebted to their care-givers for their magnificent support. We also appreciate the critical comments and expert technical assistance of members of our collaborative research groups.

References

- 1 Aarsland D, Pahlhagen S, Ballard CG, Ehrt U, Svenningsson P. Depression in Parkinson disease epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol* 2011;8:35-47.
- 2 Bugalho P, Vale J. Brief cognitive assessment in the early stages of Parkinson disease. *Cogn Behav Neurol* 2011;24:169-173.
- 3 Kummer A, Teixeira AL. Neuropsychiatry of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67(3B):930-939.
- 4 Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, et al. Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;22:1305-1311.
- 5 Barbosa IG, Rocha NP, Huguet RB, et al. Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord* 2012;137(1-3):151-155.
- 6 Phani S, Loike JD, Przedborski S. Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18(Suppl 1):S207-S209.
- 7 Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994;45:491-503.
- 8 Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:231-240.
- 9 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.
- 10 Fahn S, Elton R. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Caine DB, Goldstein M, eds. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Vol 2. Florham Park, NJ: Macmillan Health Care Information; 1987:153-163.
- 11 Hohn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427-442.

- 12 Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-mental state." A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-198.
- 13 Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:777-781.
- 14 Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621-1626.
- 15 Beato RG, Nitrini R, Formigoni AP, Caramelli P. Brazilian version of the Frontal Assessment Battery (FAB): preliminary data of administration to healthy elderly. *Dement Neuropsychol* 2007;1:59-65.
- 16 Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Psychiatry* 1961;4:561-571.
- 17 Silberman CD, Laks J, Capit~ao CF, Rodrigues CS, Moreira I, Engelhardt E. Recognizing depression in patients with Parkinson's disease: accuracy and specificity of two depression rating scale. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64:407-411.
- 18 Tumas V, Rodrigues GG, Farias TL, Crippa JA. The accuracy of diagnosis of major depression in patients with Parkinson's disease: a comparative study among the UPDRS, the geriatric depression scale and the Beck depression inventory. *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66:152-156.
- 19 Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994;165(1-2):208-210.
- 20 Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1994;172(1-2):151-154.
- 21 Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett* 2008;441:158-162.

- 22 Reale M, Iarlori C, Thomas A, et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2009;23:55-63.
- 23 Katsarou Z, Bostantjopoulou S, Hatzizisi O, Giza E, Soler-Cardona A, Kyriazis G. Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease. *Rev Neurol* 2007; 45:725-728.
- 24 Scalzo P, K€ummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2009;216(1-2):122-125.
- 25 Hasegawa Y, Inagaki T, Sawada M, Suzumura A. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2000;101:159-164.
- 26 Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010;51:474-479

Author roles

NPR, ALT, AP and HJR worked on the conception and organization of the research project. NPR, PLS, IGB, MSS, IBM, ELMV and PPC worked on the execution of the research project. NPR, ALT and IGB designed and executed the statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. ALT, AP and HJR reviewed the statistical analyses the final version of the article.

Tables and figures legends

Table 1: Abbreviations: PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation; UPDRS = unified Parkinson's disease rating scale; H&Y = Hoehn and Yahr staging scale; S&E = Schwab and England activities of daily living scale; MMSE = mini-mental state examination; FAB = frontal assessment battery; BDI = Beck's depression inventory; sTNFR = soluble tumor necrosis factor receptor. Note: length of illness was based on date of diagnosis.

* Fisher's exact test; † Mann-Whitney test; # Student's *t* test.

Figure 1: Parkinson's disease (PD) patients presented higher sTNFR1 (A) and sTNFR2 (B) plasma levels in comparison with control individuals. The figure shows median and interquartile ranges. * $P < 0.05$, Mann-Whitney test.

Table 1

Demographic and clinical features of Parkinson's disease (PD) patients and control subjects.

	PD patients (n = 40)	Control subjects (n = 25)	P value
Gender (female/male)	13/27	6/19	0.58*
Age in years (mean ± SD)	68.71 ± 10.07	65.23 ± 8.75	0.16 [#]
Body mass index in kg/m ² (mean ± SD)	26.02 ± 3.73	27.64 ± 3.71	0.09 [#]
Educational level in years [mean ± SD (median)]	4.72 ± 2.87 (4)	6.72 ± 5.37 (6)	0.16 [†]
Length of illness in years [mean ± SD (range)]	5.45 ± 4.13 (0.4 – 18)	-	-
UPDRS [mean ± SD (range)]	51.82 ± 25.27 (11 – 105)	-	-
UPDRS I [mean ± SD (range)]	3.36 ± 2.96 (0 – 11)	-	-
UPDRS II [mean ± SD (range)]	14.08 ± 7.14 (2 – 31)	-	-
UPDRS III [mean ± SD (range)]	34.56 ± 18.43 (8 – 69)	-	-
H&Y [mean ± SD (range)]	2.44 ± 0.69 (1 – 4)	-	-
S&E in % [mean ± SD (range)]	77.95 ± 11.96 (50 – 100)	-	-
MMSE [mean ± SD (median)]	24.00 ± 3.99 (25)	27.00 ± 3.57 (29)	0.001[†]
FAB [mean ± SD (median)]	11.49 ± 2.99 (12)	12.32 ± 3.67 (13)	0.32 [#]
Conceptualization	1.23 ± 1.01 (1)	1.64 ± 1.11 (2)	0.12 [†]
Mental flexibility	1.82 ± 1.10 (2)	2.08 ± 1.04 (2)	0.34 [†]
Programming	1.74 ± 0.91 (2)	2.24 ± 0.83 (2)	0.04[†]
Sensitivity to interference	2.26 ± 0.94 (3)	1.84 ± 1.25 (2)	0.21 [†]
Inhibitory control	1.41 ± 0.88 (1)	1.52 ± 1.09 (1)	0.73 [†]
Environmental autonomy	3.00 ± 0.00 (3)	3.00 ± 0.00 (3)	1.00 [†]
BDI [mean ± SD (median)]	8.64 ± 7.58 (6)	2.76 ± 3.35 (1)	<0.001[†]
Medication in use (frequency in %)			
L-dopa	92.50	-	-
Pramipexole	50.00	-	-
Entacapone	17.50	-	-
Amantadine	27.50	-	-
Anti-hypertensive	55.00	48.00	0.62*
Anti-diabetic	10.00	20.00	0.29*
Hypolipidemic	10.00	24.00	0.17*
Levothyroxine	10.00	4.00	0.64*
Antidepressants	20.00	12.00	0.51*
sTNFR1 plasma levels in pg/mL [median (25 th -75 th percentiles)]	931.41 (706.98–1,447.55)	710.02 (533.71–960.17)	0.01 [†]
sTNFR2 plasma levels in pg/mL [median (25 th -75 th percentiles)]	5,610.94 (4,363.21–8,572.85)	4,955.72 (3,585.58–5,995.92)	0.05 [†]

Abbreviations: PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation; UPDRS = unified Parkinson's disease rating scale; H&Y = Hoehn and Yahr staging scale; S&E = Schwab and England activities of daily living scale; MMSE = mini-mental state examination; FAB = frontal assessment battery; BDI = Beck's depression inventory; sTNFR = soluble tumor necrosis factor receptor. Note: length of illness was based on date of diagnosis. * Fisher's exact test; [†] Mann-Whitney test; [#] Student's *t* test.

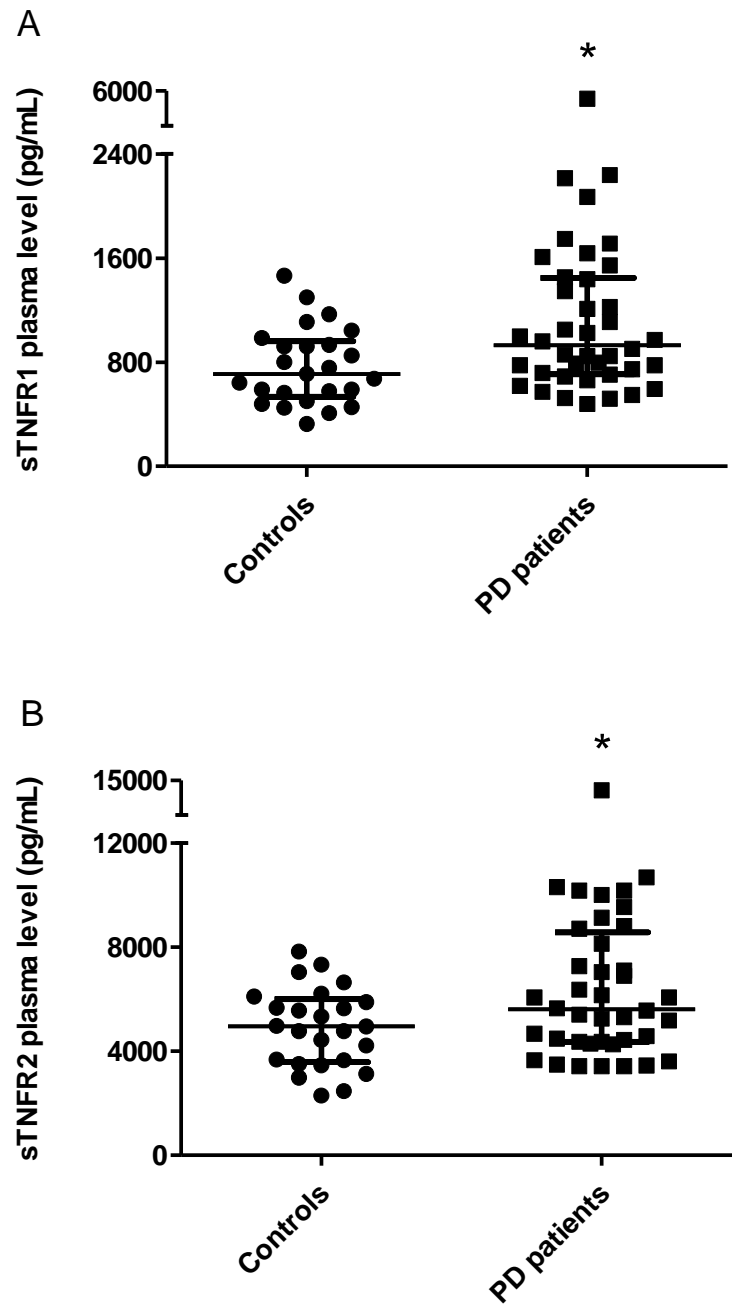


Figure1: Parkinson's disease (PD) patients presented higher sTNFR1 (A) and sTNFR2 (B) plasma levels in comparison with control individuals. The figure shows median and interquartile ranges. * $P < 0.05$, Mann-Whitney test.

**Artigo 4: “Cognitive status correlates with CXCL10/IP-10 levels in
Parkinson’s disease”**

Natália Pessoa Rocha, Paula Luciana Scalzo, Izabela Guimarães Barbosa, Mariana Soares de Souza, Isabela Boechat Morato, Érica Leandro Marciano Vieira, Paulo Pereira Christo, Antônio Lúcio Teixeira, Helton José Reis.

Parkinson’s disease (in press).

Cognitive status correlates with CXCL10/IP-10 levels in Parkinson's disease

Natália Pessoa Rocha^{1,2*}, Paula Luciana Scalzo³, Izabela Guimarães Barbosa¹, Mariana Soares de Souza⁴, Isabela Boechat Morato¹, Érica Leandro Marciano Vieira¹, Paulo Pereira Christo⁴, Antônio Lúcio Teixeira^{1a} and Helton José Reis^{2a}

¹Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Laboratório de Neurobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Santa Casa de Belo Horizonte Hospital, Belo Horizonte, Brazil.

^a These authors contributed equally to the study.

*Corresponding author:

Natália Pessoa Rocha (npessoarocha@gmail.com)

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica.

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Sala 281 - Belo Horizonte, MG – Brazil – Postal Code: 30130-100.

Phone: +55 31 34098073.

Abstract

Cognitive impairment and depressive symptoms are of great interest in Parkinson's disease (PD), since they are very common and lead to increased disability with poor quality of life. Inflammatory mechanisms have been implicated in PD and its non-motor symptoms. In the current pilot study, we aimed to evaluate plasma levels of chemokines in PD patients and to analyze the putative association of chemokines with depressive symptoms and cognitive performance. We hypothesized that higher chemokines levels are associated with worse cognitive performance and increased depressive symptoms in PD. For this purpose, 40 PD patients and 25 age- and gender-matched controls were subjected to a clinical evaluation including cognitive and mood tests. Peripheral blood was drawn and plasma levels of CCL2/MCP-1, CCL11/eotaxin, CCL24/eotaxin-2, and CXCL10/IP-10 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. PD patients and control individuals presented comparable plasma concentrations of all the evaluated chemokines. In PD patients, CXCL10/IP-10 plasma levels correlated positively with Hoehn and Yahr staging scale. In addition, the higher CXCL10/IP-10 levels, the worse performance on cognitive tests. Although there was no significant difference between PD patients and control individuals regarding chemokines levels, our preliminary results showed that CXCL10/IP-10 may be associated with cognitive status in PD.

Keywords: chemokines; cognition; CXCL10/IP-10 (interferon gamma-induced protein 10); inflammation; Parkinson's disease.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. PD is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) and the presence of alpha-synuclein intraneuronal inclusions called *Lewy bodies* in the remaining neurons [1]. It is well known that genetic mutations can cause familial parkinsonism, but only 10% of PD cases have a clear genetic origin. The etiopathogenesis of PD remains inconclusive in the great majority of cases [2]. Among several proposed causes of neuronal death in PD, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, environmental toxins and immune/inflammatory responses may be relevant candidates. The contribution of neuroinflammation (*i.e.*, microglia activation, leukocytes infiltration and increased levels of inflammatory mediators) to the pathophysiology of PD was first described in postmortem studies [3,4]. Epidemiological, genetic and immunological studies in humans and animal models have shown that not only neuroinflammation but also peripheral inflammatory changes may contribute to PD onset and development [5]. Lately, it has been shown that peripheral inflammatory and immune changes described in PD may be associated with some of the clinical signs, especially non-motor symptoms, experienced by PD patients [6-9].

Chemokines are interesting molecular candidates to be studied in PD. Chemokines are chemotactic cytokines, *i.e.* they attract and activate immune and non-immune cells. For instance, they act as immune mediators, regulating leukocyte infiltration into the brain during inflammatory or infectious diseases [10]. A range of studies has also suggested that besides the well-established role in the immune system, chemokines and their receptors may also play an important role in the central nervous system (CNS). Chemokines and their receptors may modulate neurotransmitter release, regulating synaptic transmission and cell survival. Guyon and colleagues demonstrated that the injection of CCL2/MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) onto dopaminergic neurons in the SNpc of rats increased cell excitability, dopamine release and related locomotor activity [11]. Therefore, chemokines may represent a new class of neuromodulators, especially in dopaminergic neurons, potentially representing new targets for the treatment of PD. In addition, one post mortem study found that, despite the loss of dopaminergic neurons, the SNpc of PD patients exhibited increased levels of CXCR4 and its ligand CXCL12/SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) in comparison with controls. Experiments in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mice confirmed these results, showing that MPTP

produced a time-dependent up-regulation of CXCR4 that preceded the loss of dopaminergic neurons [12]. Genetic studies also suggested the involvement of chemokines in PD. For instance, a single nucleotide polymorphism of the CXCL8/interleukin (IL)-8 A-251T gene was associated with PD in the Irish population [13]. Changes in the peripheral levels of chemokines such as CCL5/RANTES (acronym for Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) and CXCL8/IL-8 have been demonstrated in PD in comparison with controls [14,15]. The dysregulation of chemokines is described in several neuropsychiatric disorders such as major depression [16], bipolar disorder [17], schizophrenia [18], obsessive-compulsive disorder [19] and Alzheimer's disease (AD) [20].

Although PD is largely characterized by specific motor signs, non-motor symptoms are also frequent and disabling. Among these, cognitive impairment and depressive states are of great interest since they are common, progress as the disease advances and lead to increased disability with poor quality of life [21-23]. Chemokines may influence functions such as mood, behavior and cognition, possibly related to their neuromodulatory and/or direct neurotransmitter-like effects, regulation of neuroendocrine axes, control of the blood–brain barrier (BBB) permeability and regulation of neurogenesis (for a review, see [24]). In the current study, we aimed to evaluate the plasma levels of chemokines in PD patients and to investigate the putative association of their levels with depressive symptoms and performance in cognitive tests. We hypothesized that higher chemokines levels are associated with worse cognitive performance and more depressive symptoms in PD.

Material & Methods

Subjects

This study included 40 PD patients diagnosed according to the United Kingdom PD Brain Bank criteria [25] and a group of 25 healthy controls matched by age, gender, body mass index (BMI) and educational level. Patients were recruited from the outpatient movement disorders clinic of the ‘Santa Casa de Belo Horizonte’ Hospital, Belo Horizonte, Brazil. Controls were recruited from the local community. Participants were excluded if they had undergone previous neurosurgery or if they had any other neurological disorder and/or cognitive decline (*i.e.*, delirium or dementia), significant sensory impairment and infectious or autoimmune diseases in activity in the previous four weeks. In addition, individuals who had used corticosteroids, anti-inflammatories or antibiotics in the four weeks prior to the study were excluded. All subjects provided written informed consent before admission to the study. The Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil approved this study.

Clinical evaluation

All patients were evaluated with the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS) [26] which assesses different signs and symptoms of PD. The UPDRS scores were obtained in the “*on*” state of the disease. The modified Hoehn and Yahr staging scale (HY) was used to establish the stage of PD [27]. The modified Schwab and England activities of daily living (ADL) scale (S&E) was used to assess daily routine of PD patients [26].

All individuals were subjected to cognitive examination which included the Mini-Mental State Examination (MMSE) [28] adapted for the Brazilian elderly population. MMSE is a brief test for cognitive screening, comprising items from different domains such as orientation, attention, memory and language. Since impairment in executive functioning is the most common cognitive deficit in PD patients, the Frontal Assessment Battery (FAB) was also used [29]. FAB is a brief assessment tool that evaluates executive functioning and consists of six sub-tests exploring cognitive processes related to the frontal lobes: conceptualization mental flexibility, motor programming, sensitivity to interference, inhibitory control and environmental autonomy. In each subtest, scores range from 0 (worst) to 3 (best). The total FAB score is calculated by the sum of the scores of each of

the six sub-tests. In addition, all participants were evaluated using the Beck's Depression Inventory (BDI), a self-rating instrument for depressive symptoms comprising 21 items, each one ranging from 0 to 3, according to the severity of symptoms [30]. BDI has been validated as a tool for depression screening and diagnosis in PD.

Chemokines assessment

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin (Vacuplast, Huangyn, China) on the same day of the clinical assessment. In order to rule out any confounding factors caused by circadian rhythm, all samples were collected at the same time of the day, between 14-16h. The whole blood samples were kept at room temperature and used within 2 h of having been drawn. These samples were then centrifuged at 3,000 g for 10 min, 4 °C, twice. The plasma was collected and stored at -70 °C until assayed. The samples were thawed and excess of proteins was removed by acid/salt precipitation as routinely performed in our laboratory [17,31]. Briefly, we mixed equal volume of plasma and 1.2% trifluoroacetic acid/1.35 mol/L NaCl and left at room temperature for 10 minutes. Afterward, the samples were centrifuged for 5 minutes at 10,000 rpm. We then adjusted the supernatants for salt content (0.14 mol/L sodium chloride and 0.01 mol/L sodium phosphate) and pH (7.4), for the determination of chemokines concentration.

Plasma levels of CCL2/MCP-1, CCL11/eotaxin, CCL24/eotaxin-2, and CXCL10/IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) according to the procedures supplied by the manufacturer (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Concentrations are expressed as pg/mL. Lower detection limits for all analyzed chemokines were 10 pg/mL.

Statistical analysis

Association between dichotomous variables was assessed with the Fisher's exact test. All variables were tested for Gaussian distribution by the Shapiro-Wilk normality test. Two groups (patients vs. controls) were compared by Mann-Whitney or Student's *t* tests when non-normally or normally distributed, respectively. Spearman's correlation analyses were performed to examine the relationship between clinical variables and plasma levels of chemokines. All statistical tests were two-tailed and were performed using a significance

level of $\alpha=0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Socio-demographic and clinical results

Demographic and non-motor features of both groups are shown in Table 1. PD patients' clinical data are given in Table 2. PD patients presented a worse performance in the MMSE in comparison with controls ($Z = -3,325$; $p = 0.001$). There was no difference between PD and control individuals regarding total FAB performance. Nonetheless, the analysis of the subtests demonstrated that PD patients presented a lower score in programming ($Z = -2,107$; $p = 0.04$). In addition, BDI score was higher in PD patients compared to controls ($Z = -3,528$; $p < 0.001$).

Regarding PD patients, there was a negative correlation between total FAB score and age ($\rho = -0.445$, $p = 0.005$). As expected, higher educational level was associated with better performance in both cognitive tests, MMSE and FAB ($\rho = 0.429$, $p = 0.006$ and $\rho = 0.463$, $p = 0.003$, respectively). BDI score correlated positively with UPDRS total score and HY stage ($\rho = 0.421$, $p = 0.010$ and $\rho = 0.440$, $p = 0.006$, respectively), and negatively with S&E scale ($\rho = -0.457$, $p = 0.004$). Considering control subjects, total FAB performance correlated negatively with age and BDI score ($\rho = -0.677$, $p < 0.001$ and $\rho = -0.534$, $p = 0.006$, respectively). Here again, educational level correlated positively with MMSE and FAB scores ($\rho = 0.790$, $p < 0.001$ and $\rho = 0.771$, $p = 0.001$, respectively).

Plasma levels of chemokines

As shown in figure 1, there was no significant difference between PD patients and controls regarding plasma levels of the evaluated chemokines CCL11/eotaxin ($t = -0.967$; $p = 0.34$, Student's t test), CCL24/eotaxin-2 ($Z = -1,300$; $p = 0.19$, Mann-Whitney test), CXCL10/IP-10 ($Z = -0.035$; $p = 0.97$, Mann-Whitney test) and CCL2/MCP-1 ($Z = -0.148$; $p = 0.88$, Mann-Whitney test).

Circulating CXCL10/IP-10 levels were associated with PD progression since CXCL10/IP-10 plasma concentration correlated positively with HY staging scale ($\rho = 0.366$, $p = 0.026$). Moreover, among PD patients increased CXCL10/IP-10 levels were

associated with worse performance in cognitive testes, *i.e.* CXCL10/IP-10 levels correlated negatively with MMSE ($\rho = -0.395$, $p = 0.016$) and FAB ($\rho = -0.458$, $p = 0.004$) scores (figure 2). More specifically, increased CXCL10/IP-10 levels were associated with decreased mental flexibility ($\rho = -0.439$, $p = 0.007$) and inhibitory control ($\rho = -0.365$, $p = 0.026$). It is worth mentioning that the correlation between CXCL10/IP-10 levels and total FAB score remained significant even after Bonferroni's correction. We found no correlation between plasma levels of chemokines and BDI or S&E scores. In addition, we found no association between chemokines levels and clinical or demographic data in control subjects.

Discussion

This report demonstrated that PD patients and control individuals present comparable plasma concentrations of the chemokines CCL2/MCP-1, CCL11/eotaxin, CCL24/eotaxin-2, and CXCL10/IP-10. Interestingly, increased CXCL10/IP-10 levels were associated with PD progression and worse performance in cognitive testes.

Only few studies have evaluated circulating levels of chemokines in PD and the results are inconclusive. Our work group has already measured serum levels of chemokines in an independent cohort of PD patients, finding no significant difference between PD patients and age- and gender-matched controls [31], corroborating the current data. Rentzos and colleagues (2007) evaluated serum levels of CCL5/RANTES in 41 PD patients and 19 controls. PD patients presented higher levels of CCL5/RANTES in comparison with controls, and circulating levels of CCL5/RANTES positively correlated with UPDRS III scores. Remarkably, untreated patients (n=20) showed higher levels of CCL5/RANTES than control and treated PD groups [14], indicating that PD-related drugs may interfere with chemokines levels.

Other study has demonstrated that basal and lipopolysaccharide (LPS)-induced levels of the chemokines CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α and CXCL8/IL-8, and basal levels of CCL5/RANTES were significantly higher in PD patients than in controls. In addition, chemokines levels were associated with PD severity, since they correlated positively with UPDRS III scores and HY stages [15]. It is worth mentioning that, although all patients were taking anti-parkinsonian drugs, as well as in our study, they used a different strategy to assess peripheral levels of chemokines, *i.e.*, they measured the levels of chemokines produced by peripheral blood mononuclear cells instead of serum/plasma quantifications [15].

To the best of our knowledge, the current study is the first to describe the association between peripheral chemokines levels and cognitive performance in PD. A few studies have assessed the association between chemokines and non-motor symptoms in PD. One recent study evaluated the association between non-motor symptoms and chemokines assessed in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients [32]. With this purpose, CCL11/eotaxin, CXCL-10/IP-10, CCL2/MCP-1 and CCL4/MIP-1 β levels were measured in the CSF of 87 PD patients (16 with dementia diagnosis) and 33 controls. Corroborating our results, there was no difference between groups for any of the measured

CSF chemokines. CCL2/MCP-1 levels correlated with symptoms of depression, as assessed by the Hospital Anxiety and Depression Scale, and UPDRS motor score. FACIT-fatigue score correlated negatively with CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1 levels, *i.e.* the higher the levels of chemokines the more severe the fatigue symptoms. They did not find any significant correlation between cognitive performance as assessed by the MMSE, and the evaluated chemokines [32]. Other study measured CX3CL1/fractalkine levels in the CSF of 126 PD patients in comparison with multiple systems atrophy patients (n=32), AD patients (n=50) and age-matched controls (n=137) [33]. Again, there was no significant difference between groups regarding chemokine CSF levels. CSF fractalkine/amyloid- β ratio increased significantly with increasing UPDRS scores, HY stage, being a putative biomarker for PD severity. In an independent cohort comprising 39 PD patients, CX3CL1/fractalkine alone correlated with the clinical progression of PD [33]. Interestingly, an experimental study showed that this chemokine is neuroprotective in MPTP-induced PD mice [34].

We found that CXCL10/IP-10 levels were associated with PD progression. The chemokine CXCL10/IP-10 has already been associated with PD pathophysiology, since IL-1 β -induced CXCL10/IP-10 protein expression was potentiated by co-exposure to α -synuclein in human A172 astroglial cells [35]. The chemokine CXCL10/IP-10 has also been associated with cognitive status in AD, the prototype cognitive disorder. CSF CXCL10/IP-10 concentration was significantly increased in patients with mild cognitive impairment and mild AD in comparison with controls, but not in patients with severe AD. There was a significant positive correlation between MMSE score and CSF CXCL10/IP-10 levels [36]. Nonetheless, the same authors showed that serum levels of CXCL10/IP-10 were not increased in mild cognitive impairment and AD regardless the stage of the disease. In addition, no correlation between serum CXCL10/IP-10 levels and MMSE scores or the duration of the disease was found [37]. These observations suggest that CSF CXCL10/IP-10 levels increase may be restricted to an early stage of the disease, when proinflammatory events are thought to play a more relevant role in its pathogenesis [37]. Since our sample is composed by patients with moderate to advanced PD (mean age = 68 years; mean disease duration = 5.5 years; mean total UPDRS score = 51.8; mean motor UPDRS score = 34.6), it is not possible to test this hypothesis, which deserves further investigation.

Limitations of our study include sample size and the fact that all patients were under anti-parkinsonian treatment that may influence the results. However, statistical analysis showed that the use of antiparkinsonian or other drugs did not influence chemokines levels in the present study. We also have to take into account that only peripheral blood levels of chemokines were evaluated, and they did not necessarily reflect what it is going on in the CNS. The parallel assessment of chemokines in the CSF would be interesting. By contrast, the strict exclusion criteria, the selection of controls with comparable age, gender and BMI, and the analysis of clinical and inflammatory parameters together can be regarded as strengths of the study.

Although there was no significant difference between PD patients and control individuals regarding plasma levels of chemokines, our results showed that CXCL10/IP-10 levels may be associated with cognitive status in PD. Additional studies are needed in order to elucidate chemokines role in PD, mainly regarding cognitive impairment.

Acknowledgments

Authors would like to acknowledge the participation of volunteers in this study and are indebted to their caregivers for their magnificent support. We also would like to thank the members of LIIM for their critical comments and skilled technical assistance. This study was supported by FAPEMIG, CAPES and CNPq, Brazil. NPR is currently a CAPES scholarship recipient. ELMV and IGB are postdoctoral fellows of CNPq and CAPES, respectively. IBM is a CNPq undergraduate scholarship recipient. ALT and HJR are CNPq fellowship recipients.

Conflicts of interest

Nothing to report.

References

- 1 Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004;363(9423):1783-93.
- 2 Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP: The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23(4):228-242.
- 3 Parkinson J: An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14(2):223-236.
- 4 McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988;38(8):1285-1291.
- 5 Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2012;62(7):2154-68.
- 6 Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One* 2012;7(10):e47387
- 7 Katsarou Z, Bostantjopoulou S, Hatzizisi O, Giza E, Soler-Cardona A, Kyriazis G. Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease. *Rev Neurol* 2007;45(12):725-8.
- 8 Menza M, Dobkin RD, Marin H et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* 2010;51(6):474-479.
- 9 Chen-Plotkin AS, Hu WT, Siderowf A et al. Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2011;69(4):655-663.
- 10 Réaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostène W, Mélik Parsadaniantz S. Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog Neurobiol* 2013;104:67-92.
- 11 Guyon A, Skrzydelski D, De Giry I et al. Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* 2009;162(4):1072-80.

- 12 Shimoji M, Pagan F, Heaton EB, Mocchetti I. CXCR4 and CXCL12 expression is increased in the nigro-striatal system of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2009;16(3):318-28.
- 13 Ross OA, O'Neill C, Rea IM et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum Immunol* 2004;65(4):340-6.
- 14 Rentzos M, Nikolaou C, Andreadou E et al. Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2007;116(6):374-9.
- 15 Reale M, Iarlori C, Thomas A et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2009;23(1):55-63.
- 16 Grassi-Oliveira R, Brieztke E, Teixeira AL et al. Peripheral chemokine levels in women with recurrent major depression with suicidal ideation. *Rev Bras Psiquiatr* 2012;34(1):71-5.
- 17 Barbosa IG, Rocha NP, Bauer ME et al. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2013;263(2):159-65.
- 18 Asevedo E, Gadelha A, Noto C et al. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2013;47(10):1376-82.
- 19 Fontenelle LF, Barbosa IG, Luna JV, de Sousa LP, Abreu MN, Teixeira AL. A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Compr Psychiatry* 2012;53(6):797-804.
- 20 Soares HD, Potter WZ, Pickering E et al. Plasma biomarkers associated with the apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2012;69(10):1310-7.
- 21 Aarsland D, Pålhlagen S, Ballard CG, Ehrt U, Svenningsson P. Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol* 2011;8(1):35-47.
- 22 Bugalho P, Vale J. Brief cognitive assessment in the early stages of Parkinson disease. *Cogn Behav Neurol* 2011;24(4):169-73.

- 23 Kummer A, Teixeira AL. Neuropsychiatry of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67(3B):930-9.
- 24 Stuart MJ, Baune BT. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2014;42:93-115.
- 25 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(3):181-4.
- 26 Fahn S, Elton R. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Caine DB, Goldstein M. Eds. *Recent developments in Parkinson's disease*, vol 2. 1987; p153–163, 293–304.
- 27 Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17(5):427-42
- 28 Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.
- 29 Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: A frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621-6.
- 30 Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Psychiatry* 1961;4:561-71.
- 31 Scalzo P, de Miranda AS, Guerra Amaral DC, de Carvalho Vilela M, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of chemokines in Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 2011;18(4):240-4.
- 32 Lindqvist D, Hall S, Surova Yet al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease--associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2013;33:183-9.
- 33 Shi M, Bradner J, Hancock AM et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression *Ann Neurol*. 2011;69(3):570-80.

- 34 Morganti JM, Nash KR, Grimmig BA et al. The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2012;32(42):14592-601.
- 35 Tousi NS, Buck DJ, Curtis JT, Davis RL. α -Synuclein potentiates interleukin-1 β -induced CXCL10 expression in human A172 astrocytoma cells. *Neurosci Lett* 2012;507(2):133-6.
- 36 Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P et al. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006;63(4):538-43.
- 37 Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C et al. IP-10 serum levels are not increased in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2007;14(4):e3-4.

Author Roles

NPR, ALT and HJR worked on the conception and organization of the research project. NPR, PLS, IGB, MSS, IBM, ELMV and PPC worked on the execution of the research project. NPR and ALT designed and executed the statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. ALT and HJR reviewed the statistical analyses and the manuscript.

TABLES

Table 1

	PD patients (n = 40)	Control subjects (n = 25)	p value
Gender (female/male)	13/27	6/19	0.58 ^a
Age in years (mean ± SD)	68.71 ± 10.07	65.23 ± 8.75	0.20 ^b
Body mass index in Kg/m ² (mean ± SD)	26.02 ± 3.73	27.64 ± 3.71	0.09 ^c
Educational level in years (mean ± SD)	4.72 ± 2.87	6.72 ± 5.37	0.16 ^b
MMSE [mean ± SD (median)]	24.00 ± 3.99 (25)	27.00 ± 3.57 (29)	0.001^b
FAB [mean ± SD (median)]	11.49 ± 2.99 (12)	12.32 ± 3.67 (13)	0.32 ^c
Conceptualization	1.23 ± 1.01 (1)	1.64 ± 1.11 (2)	0.12 ^b
Mental flexibility	1.82 ± 1.10 (2)	2.08 ± 1.04 (2)	0.34 ^b
Programming	1.74 ± 0.91 (2)	2.24 ± 0.83 (2)	0.04^b
Sensitivity to interference	2.26 ± 0.94 (3)	1.84 ± 1.25 (2)	0.21 ^b
Inhibitory control	1.41 ± 0.88 (1)	1.52 ± 1.09 (1)	0.73 ^b
Environmental autonomy	3.00 ± 0.00 (3)	3.00 ± 0.00 (3)	1.00 ^b
BDI [mean ± SD (median)]	8.64 ± 7.58 (6)	2.76 ± 3.35 (1)	<0.001^b
Medication in use (frequency in %)			
Anti-hypertensive (%)	55.00	48.00	0.62 ^a
Anti-diabetic (%)	10.00	20.00	0.29 ^a
Hypolipidemic (%)	10.00	24.00	0.17 ^a
Levothyroxine (%)	10.00	4.00	0.64 ^a
Antidepressants	20.00	12.00	0.51 ^a

Demographic and non-motor features of Parkinson's disease (PD) patients and control subjects.

Abbreviations: BDI = Beck Depression Inventory; FAB = Frontal Assessment Battery; MMSE = Mini-Mental State Examination; PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation.

^aFisher's exact test; ^bMann-Whitney test; ^cStudent's *t* test.

Table 2

Clinical features of Parkinson's disease (PD) patients

	PD patients (n = 40)
Length of illness in years [mean \pm SD (range)]	5.45 \pm 4.13 (0.4 – 18)
UPDRS [mean \pm SD (range)]	51.82 \pm 25.27 (11 – 105)
UPDRS I [mean \pm SD (range)]	3.36 \pm 2.96 (0 – 11)
UPDRS II [mean \pm SD (range)]	14.08 \pm 7.14 (2 – 31)
UPDRS III [mean \pm SD (range)]	34.56 \pm 18.43 (8 – 69)
HY [mean \pm SD (range)]	2.44 \pm 0.69 (1 – 4)
S&E in % [mean \pm SD (range)]	77.95 \pm 11.96 (50 – 100)
Medications in use [frequency (%)]	
Levodopa	37 (92.50)
Pramipexole	20 (50.00)
Entacapone	7 (17.50)
Amantadine	11 (27.50)

Abbreviations: HY = Hoehn and Yahr staging scale; PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation; S&E = Schwab and England activities of daily living scale; UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

FIGURES

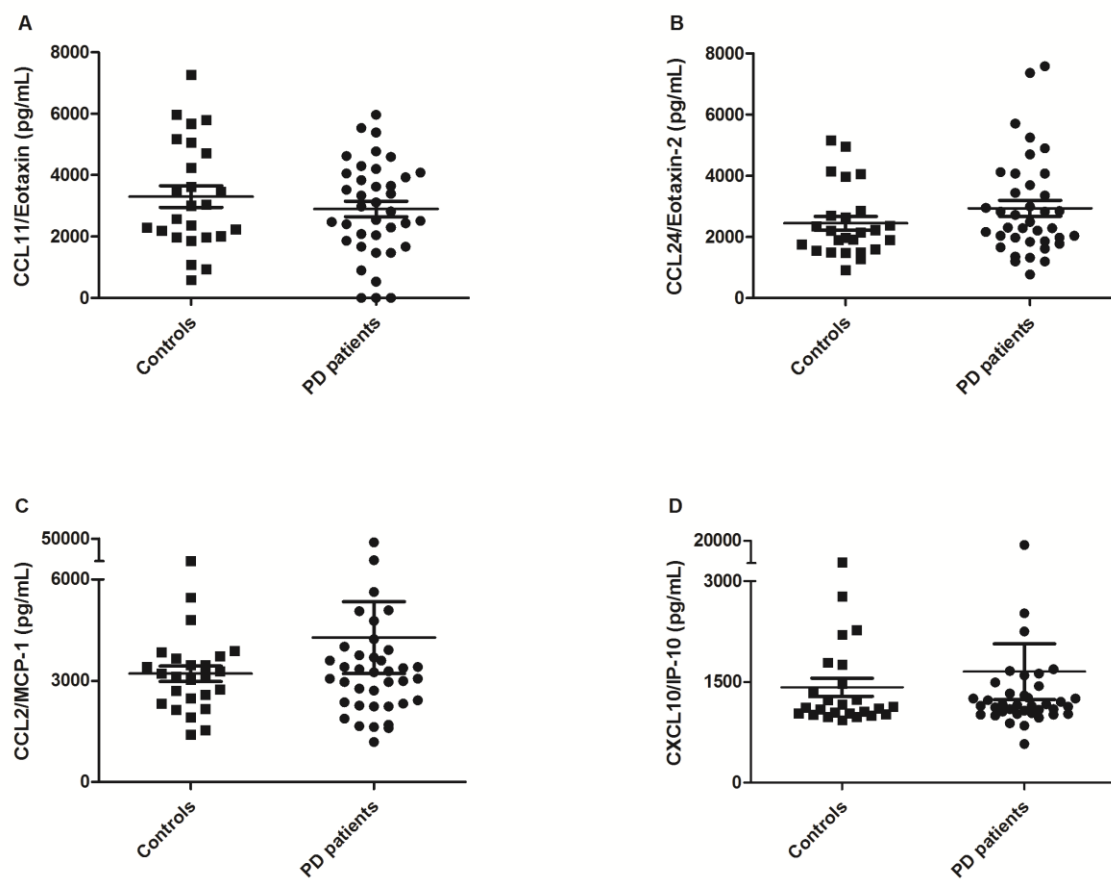


Fig. 1: Control individuals and Parkinson's disease (PD) patients did not differ regarding plasma levels of the evaluated chemokines CCL11/eotaxin (A), CCL24/eotaxin-2 (B), CCL2/MCP-1 (C) and CXCL10/IP-10 (D). The figure shows mean and standard deviation of the mean (SEM). IP-10 = interferon gamma-induced protein-10; MCP-1 = monocyte chemotactic protein 1; PD = Parkinson's disease.

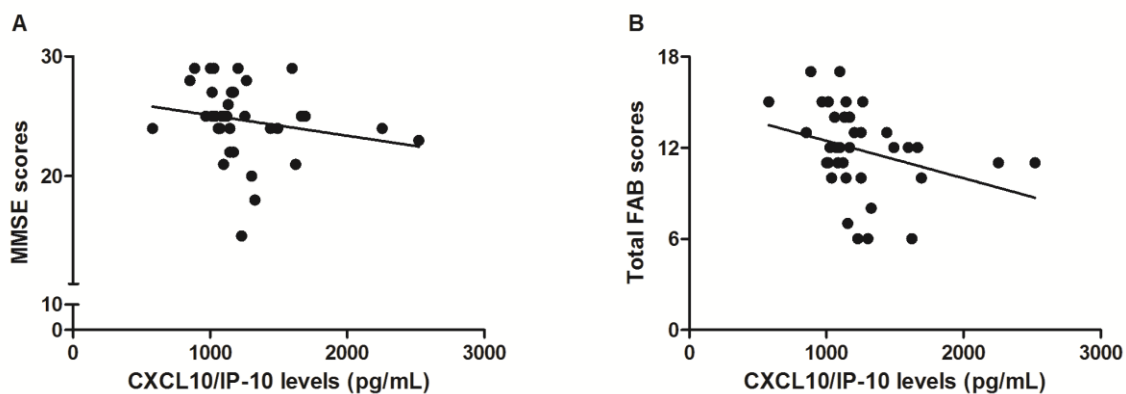


Fig. 2: Among Parkinson's disease (PD) patients, plasma levels of CXCL10/IP-10 were inversely associated with MMSE (A; $\rho = -0.395$, $p = 0.016$) and total FAB scores (B; $\rho = -0.458$, $p = 0.004$). IP-10 = interferon gamma-induced protein-10; MMSE = Mini-Mental State Examination; FAB = Frontal Assessment Battery.

5.2 Imunofenotipagem

No artigo a seguir, ainda não submetido, apresentamos os resultados sobre as análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo a análise das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF.

Verificamos que pacientes com DP e controles não diferem em relação à porcentagem de monócitos (CD14+), linfócitos B (CD19+), células *natural killer* (NK, CD56+), linfócitos T auxiliares (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e células T regulatórias (CD4+CD25+FoxP3+) no sangue periférico. Entretanto, pacientes com DP apresentaram menor porcentagem de linfócitos T (CD3+), especificamente células T ativadas (CD4+CD25+) em relação aos controles. Corroborando esses achados, os níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A encontram-se reduzidos em pacientes com DP em comparação aos controles. A fim de investigar uma possível causa para essas alterações imunes, coletamos CMSP de indivíduos saudáveis, as quais foram expostas aos fármacos antiparkinsonianos levodopa e pramipexol. Assim, demonstramos, *in vitro*, a redução na produção de citocinas inflamatórias por CMSP frente à exposição aos fármacos antiparkinsonianos.

Artigo 5: “Reduced activated T lymphocytes (CD4+CD25+) and plasma levels of cytokines in Parkinson’s disease”.

Natália Pessoa Rocha, Frankinéia Assis, Paula Luciana Scalzo, Izabela Guimarães Barbosa, Érica Leandro Marciano Vieira, Mariana Soares de Souza, Isabela Boechat Morato, Paulo Pereira Christo, Helton José Reis, Antônio Lúcio Teixeira

Dados não submetidos.

**Reduced activated T lymphocytes (CD4+CD25+) and plasma levels of cytokines in
Parkinson's disease**

Natália Pessoa Rocha^{1,2*}, Frankcinéia Assis³, Paula Luciana Scalzo⁴, Izabela Guimarães Barbosa¹, Érica Leandro Marciano Vieira¹, Mariana Soares de Souza⁵, Isabela Boechat Morato¹, Paulo Pereira Christo⁵, Helton José Reis^{2a} and Antônio Lúcio Teixeira^{1a}

¹Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Laboratório de Neurobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁵Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Santa Casa de Belo Horizonte Hospital, Belo Horizonte, Brazil.

^a These authors contributed equally to the study.

*Corresponding author:

Natália Pessoa Rocha (npessoarocha@gmail.com)

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica.

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Sala 281 - Belo Horizonte, MG – Brazil – Postal Code: 30130-100.

Phone: +55 31 34098073.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. The cause of neurodegeneration in PD is not completely understood and evidence has shown that inflammatory/immune changes may be involved in PD pathophysiology. Therefore, this study aimed to determine the profile of peripheral immune system in PD patients in comparison with controls. Specifically we investigated blood monocytes and lymphocytes subsets, and plasma levels of cytokines in PD patients and matched controls. In addition, we investigated whether there was any association between immune parameters and clinical data, notably cognitive and depressive symptoms. Forty PD patients and a group of 25 age- and gender-matched controls were enrolled on this study. From these, 23 PD patients and 21 controls were included in the immunophenotyping analyses. Peripheral blood was drawn on the same day of the clinical assessment and submitted to plasma separation for ELISA or CBA assays. Immunophenotyping analyses of the peripheral blood were performed by flow cytometry. We found that PD patients presented peripheral immune changes evidenced by decreased percentage of T lymphocytes (CD3⁺ cells), especially activated T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺ cells), when compared to age-matched controls. In line with these results, we also found decreased plasma levels of cytokines IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A in PD patients. In addition, we observed that PD patients showed increased ratios of IFN- γ /IL-4, IL-2/IL-4 and IFN- γ /IL-17A in comparison with controls, suggesting a bias towards to Th1 profile in PD. In vitro experiments demonstrated that production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells was reduced after exposure to the antiparkinsonian drugs levodopa and pramipexole. Our data together with previous studies corroborate the hypothesis that immunological mechanisms are involved in PD. It is not clear whether the differences that we have found are due to adaptive mechanisms or to changes associated with PD, including pharmacological treatment, or even directly related to the disease pathophysiology. Future studies into this subject are needed to enlarge the knowledge regarding the mechanisms involved in PD pathogenesis.

Keywords: Parkinson's disease, inflammation, immunophenotyping, leukocytes, cytokines.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. Pathologically PD is defined by the progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) and the presence of intraneuronal inclusions of α -synuclein (called Lewy bodies) in the remaining neurons. The neuronal death results in dopamine deficit in the basal ganglia, mainly striatum, and cortical brain regions, leading to the motor signs that characterize PD clinically: bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability (Samii et al, 2004).

The cause of neurodegeneration in PD is not completely understood. Although 5 to 10% of PD cases have a clear genetic origin (Bekris et al, 2010), the mechanisms underlying neuronal death in PD are not known in the great majority of cases. Among several proposed factors that may contribute to PD pathophysiology, inflammatory processes may also participate in the cascade of events leading to neuronal degeneration. Genetic, epidemiological and immunological studies in humans and animal models support this hypothesis (Collins et al, 2012). For instance, several authors have reported abnormalities in immune functions in PD patients, including changes in lymphocyte subsets (Bas et al, 2001; Baba et al, 2005; Katsarou et al, 2007; Niwa et al, 2012; Saunders et al, 2012; Stevens et al, 2012), poor response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to mitogens (Klüter et al, 1995), and impaired production of cytokines (Bessler et al, 1999; Wandinger et al, 1999). These immunological changes do not seem to be the primary cause of neuronal cell death in PD but they may exacerbate or hasten the progression of the disease.

Although there is evidence supporting the hypothesis of systemic immune dysfunction in PD, there is no consensus on its general pattern, providing a basis for further investigation. Therefore, this study aimed to determine the profile of peripheral immune system in PD patients in comparison with controls. Specifically we investigated blood monocytes and lymphocytes subsets, and plasma levels of cytokines in PD patients and matched controls. In addition, we investigated whether there was any association between immune parameters and clinical data, notably cognitive and depressive symptoms.

Material & Methods

Subjects

This study included 40 PD patients diagnosed according to the United Kingdom PD Brain Bank criteria (Hughes et al, 1992), and a group of 25 controls matched by age, gender, body mass index (BMI) and educational level. From these, 23 PD patients and 21 age- and gender-matched controls were included in the immunophenotyping analyses. Patients were recruited from the outpatient movement disorders clinic of the ‘Santa Casa de Belo Horizonte’ Hospital, Belo Horizonte, Brazil. Controls were recruited from the local community. Participants were excluded if they had undergone previous neurosurgery or if they had any other neurological disorder and/or cognitive decline (*i.e.*, delirium or dementia), significant sensory impairment and infectious or autoimmune diseases in activity in the previous four weeks. In addition, individuals who had used corticosteroids, anti-inflammatories or antibiotics in the four weeks prior to the study were excluded. All subjects provided written informed consent before admission to the study. The Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil approved this study.

Clinical evaluation

All patients were evaluated with the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS) (Fahn and Elton, 1987) which assesses different signs and symptoms of PD. The UPDRS scores were obtained in the “*on*” state of the disease. The modified Hoehn and Yahr staging scale (HY) was used to establish the stage of PD (Hoehn and Yahr, 1967). The modified Schwab and England activities of daily living (ADL) scale (S&E) was used to assess daily routine of PD patients (Fahn and Elton, 1987).

All individuals were subjected to cognitive examination which included the Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al, 1975) adapted for the Brazilian elderly population. MMSE is a brief test for cognitive screening, comprising items from different domains such as orientation, attention, memory and language. Since impairment in executive functioning is the most common cognitive deficit in PD patients, the Frontal Assessment Battery (FAB) was also applied (Dubois et al, 2000). FAB is a brief assessment tool that evaluates executive functioning and consists of six sub-tests exploring cognitive processes related to the frontal lobes: conceptualization mental flexibility, motor programming, sensitivity to interference, inhibitory control and environmental autonomy. In each subtest,

scores range from 0 (worst) to 3 (best). The total FAB score is calculated by the sum of the scores from each of the six sub-tests. In addition, all participants were evaluated using the Beck's Depression Inventory (BDI), a self-rating instrument for depressive symptoms comprising 21 items, each one ranging from 0 to 3 according to the severity of symptoms (Beck et al, 1961). BDI has been validated as a tool for depression screening and diagnosis in PD.

Blood samples

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Vacuplast, Huangyn, China) on the same day of the clinical assessment. In order to rule out any confounding factors caused by circadian rhythm, all samples were collected at the same time of the day.

Immunophenotyping

The blood samples collected in EDTA containing tubes were kept at room temperature and used within 16h after drawn for immunophenotyping analyses. Erythrocytes were briefly lysed using an ammonium chloride-based solution. After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), cells were stained for 30 min with combinations of the following monoclonal anti-human antibodies: anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE-Cy5, anti-CD8 PE-Cy5, anti-CD25 FITC, anti-CD19 FITC, anti-CD56 PE, anti-CD16 PE-Cy5, anti-CD14 FITC (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After staining, cells were washed and fixed with 2% formaldehyde in PBS solution. For intracellular staining for FoxP3, the fixed cells were permeabilized with 0,1% saponine for 10 min. After washing twice with PBS, cells were stained using anti-FoxP3 PE monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 30 min. Immediately after staining cells were washed, resuspended and analyzed by flow cytometry. FITC and PE-labeled immunoglobulin control antibodies and a control of non-stained cells were included in all experiments. Preparations were acquired using a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A minimum of 50,000 gated events on lymphocytes and monocytes population identified by size (FSC) and granularity (SSC) were acquired for analysis. The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup and Tracking beads (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) prior to data acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.6.5 software (Tree Star, Ashlamb, OR, USA).

Plasmatic cytokines assessment

The blood samples collected in heparinized tubes were used for plasma obtaining within 2 h of having been drawn. These samples were centrifuged at 3,000 g for 10 min, 4 °C, twice. The plasma was collected and stored at -70 °C until assayed. The samples were thawed and cytokines were measured as routinely performed in our laboratory. Multiple cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17) were simultaneously measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokines Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Acquisition was performed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). Plasma levels of IL-1 β were measured by high sensitivity Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Concentrations are expressed as pg/mL.

Effects of dopaminergic drugs on cytokines production

We aimed to evaluate cytokines production after exposition of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to the antiparkinsonian drugs levodopa (dopamine precursor) and pramipexole (dopaminergic agonist). Peripheral blood samples were harvested from five healthy donors (two male, three female, 32.2 ± 3.8 years) in heparin containing tubes. The fresh blood samples were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, 1:1), gently layered on Ficoll solution (Ficoll-PaquePlus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) at room temperature, and centrifuged at 405 g for 40 min. The PBMC-containing layer was collected and washed twice in PBS at 4 °C. The viable cells, as determined by trypan blue exclusion, were resuspended at the concentration of 1×10^7 cells/mL in a medium composed of RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) with l-glutamine (Cultilab, Campinas, Brazil), 40 IU/mL of penicillin (Ariston, São Paulo, Brazil), 40 μ g/mL of gentamicin (Nova Farma, Anápolis, Brazil), supplemented with 10% of heat-inactivated human serum (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

PBMC were transferred to a u-bottom 96-well cell culture cluster (Costar, New York, NY, USA) at 1×10^6 cells/mL final concentration. Cells were then treated with levodopa (LD) or pramipexole (PX) at three different concentrations, as following: i) the peak plasma concentration (LD: 6 $\mu\text{g/mL}$; PX: 2 ng/mL); ii) 0.1X the peak plasma concentration (LD: 0.6 $\mu\text{g/mL}$; PX: 0.2 ng/mL) and iii) 100X the peak plasma concentration (LD: 600 $\mu\text{g/mL}$; PX: 200 ng/mL). Phytohemagglutinin at 1% (PHA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) served as non-specific stimulus for PBMC (positive control). Non-treatment (i.e. absence of any drug or stimulus, referred to as baseline) was used as control. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The supernatants were collected 24 h after treatment and stored at -70°C until assayed. The CBA Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences, , San Jose, CA, USA) was used to quantitatively measure IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF, and IL-12p70 in the supernatants samples. Procedures followed the manufacturer's recommendations as described above, as well as acquisition and analysis.

Statistical analysis

Association between dichotomous variables was assessed with the Fisher's exact test. All variables were tested for Gaussian distribution by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Two groups (patients vs. controls) were compared by Mann–Whitney or Student's *t* tests when non-normally or normally distributed, respectively. Spearman's correlation analyses were performed to examine the relationship between clinical variables and percentage of cell subset or plasma levels of cytokines.

Regarding the analyses on the effects of antiparkinsonian drugs on cytokines production, we used one-way analysis of variance (ANOVA) to test group differences. Dunnett's multiple comparison test was used to compare each treatment with a single control (i.e., baseline condition).

All statistical tests were two-tailed and were performed using a significance level of $\alpha=0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), as well as GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, EUA).

Results

Socio-demographic and clinical results

Demographic and non-motor features of both groups are shown in Table 1. PD patients' clinical data are given in Table 2. PD patients and controls did not differ regarding age, gender, body mass index and educational level. PD patients presented a worse performance in the MMSE in comparison with controls ($Z = -3,325$; $p = 0.001$). There was no difference between PD and control individuals regarding total FAB performance. Nonetheless, the analysis of the subtests demonstrated that PD patients presented a lower score in programming ($Z = -2,107$; $p = 0.04$). In addition, BDI score was higher in PD patients compared to controls ($Z = -3,528$; $p < 0.001$).

Immunophenotyping

Monocytes and lymphocytes subpopulations were evaluated by the expression of the membrane-bound molecules CD14, CD19, CD56, CD3, CD4, CD8, and by the activation marker CD25. In addition, FoxP3 expression was assessed in order to investigate regulatory T-lymphocytes (Treg) population. Results about immunophenotyping are shown in Table 3. PD patients and controls presented similar percentage of monocytes (CD14+), B-lymphocytes (CD19+) and NK cells (CD56+). The percentage of T-lymphocytes (CD3+) was decreased in the peripheral blood of PD patients in comparison with controls. We did not find any difference between PD patients and controls regarding neither the percentage of CD4+ nor CD8+ lymphocytes, as well as the CD4:CD8 ratio. Interestingly, PD patients presented lower percentage of activated T-lymphocytes (CD4+CD25+ lymphocytes). In addition, PD patients and controls did not differ with respect to the percentage of Treg cells (FoxP3+ in CD4+CD25+ lymphocytes).

Plasma levels of cytokines

Th1/Th2/Th17 cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A) were assessed in plasma by CBA. In addition, plasma levels of IL-1 β were evaluated by ELISA. As shown in Table 4, there was no significant difference between PD patients and controls regarding plasma levels of IL-2 and IL-1 β . PD patients presented lower plasma levels of IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A in comparison with controls.

To further investigate the cytokine profile in PD we also compared cytokine ratios (figure 2). PD patients showed higher IFN- γ /IL-4 ($p < 0.01$, Student's t test), IL-2/IL-4 ($p < 0.001$, Student's t test) and IFN- γ /IL-17A ratios ($p = 0.03$, Student's t test) in comparison with controls, suggesting a bias towards a Th1 profile. There was no statistical difference regarding IFN- γ /IL-10 ratio ($p > 0.05$, Student's t test). PD patients also presented lower IL-6/IL-10 ($p < 0.001$, Mann-Whitney test) and TNF/IL-10 ($p < 0.001$, Mann-Whitney test) ratios compared to controls, showing an anti-inflammatory weighted imbalance in PD.

Among PD patients, higher TNF/IL-10 ratios were associated with worse cognitive performance, since TNF/IL-10 correlated with MMSE ($\rho = -0.451$, $p < 0.01$) and the domains of FAB mental flexibility ($\rho = -0.400$, $p = 0.01$) and sensitivity of interference ($\rho = -0.365$, $p = 0.027$).

Effects of dopaminergic drugs on cytokines production

The highest doses of both levodopa and pramipexole decreased the production of cytokines by PBMC (figure 3). Specifically, the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF were significantly lower in the supernatants from PBMC exposed to the highest dose of levodopa (600 $\mu\text{g/mL}$). In addition, pramipexole at the highest dose (200 ng/mL) significantly decreased the production of IL-6, IL-8 and TNF by PBMC.

Discussion

In the current report we demonstrated that PD patients presented peripheral immune changes evidenced by decreased percentage of T lymphocytes (CD3⁺ cells), especially activated T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺ cells), when compared to age-related controls. In line with these results, we also found decreased plasma levels of the cytokines IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A in PD patients.

Corroborating our data, several studies have shown lower percentage of total lymphocytes (Bas et al, 2001; Baba et al, 2005; Saunders et al, 2012), in addition to CD3⁺ (Niwa et al, 2012; Katsarou et al, 2007), CD4⁺ (Niwa et al, 2012; Stevens et al, 2012) and CD19⁺ cells (Stevens et al, 2012) in PD patients as compared to controls. One study has also found lower percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in PD patients (Baba et al, 2005). The reduced percentage of T lymphocytes might be due to enhanced apoptosis process (Hurny et al, 2013). Also similar to our results, some studies have found no change in the percentage of B lymphocytes (CD19⁺), NK cells (CD56⁺), as well as CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and CD4:CD8 ratio (Klüter et al, 1995; Katsarou et al, 2007; Stevens et al, 2012; Hurny et al, 2013) in PD.

Changes in peripheral lymphocytes subsets in PD may result in changes in cytokines levels. We found a reduction in the percentage of activated T lymphocytes in PD and, as a consequence, PD patients presented lower plasma levels of cytokines IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN- γ . Corroborating our data, the production of IL-6 and TNF- α by PBMC and TNF- α by monocytes/macrophages were found to be significantly lower in patients with PD as compared to controls groups composed of age-related healthy donors and patients with cerebrovascular diseases (Hasegawa et al, 2000). Klüter and colleagues evaluated cytokine production in the supernatants of mitogen-stimulated whole-blood cultures, finding reduced production of IL-2 but no differences regarding sIL-2R, IL-6, IFN- α 2 and IFN- γ . Interestingly the mean dose of levodopa was negatively associated with IL-2 production (Klüter et al, 1995). IL-2 production by PBMC from PD patients was found to be significantly lower than that from controls, while the production of IL-6 and IL-1 β did not differ between groups (Bessler et al, 1999). The production of IL-2 and IFN- γ by whole blood cultures of PD patients was also markedly decreased in PD compared to healthy controls and major depression patients. After amantadine treatment, IL-2 secretion was comparable to controls (Wandinger et al, 1999).

Indeed specific drugs used for PD treatment may influence lymphocytes subsets, activation and, therefore, cytokines levels. Long-term treatment with antiparkinsonian drugs may influence the immune system through direct effects on lymphocytes or in antigen-presenting cells. For example, treatment with amantadine, originally established as an anti-viral drug but also with a weak anti-NMDA effect, has been demonstrated to alter lymphocytes subsets. Short-term treatment with amantadine was associated with an increase of the CD4:CD8 ratio (Tribl et al, 2001). Levodopa therapy is also capable of inducing changes in T lymphocytes proteome (Alberio et al, 2012). After treatment with levodopa, both the CD95:CD3 ratio and the number of lymphocytes dead due to apoptotic processes were found to be decreased. These data indicate that levodopa treatment in PD has an impact on apoptotic processes and this should be taken into consideration as a positive event in the pathomechanism precipitated by this treatment (Hurny et al, 2013).

The main limitation of our study comprises the fact that all patients were medicated and the observed findings might be influenced by patients' ongoing treatment. In order to investigate the putative effect of antiparkinsonian drugs on the immune system, we evaluated cytokines production after exposition of PBMC to levodopa and pramipexole. We found that both levodopa and pramipexole were able to decrease the production of cytokines by PBMC, suggesting that antiparkinsonian treatment is responsible, at least in part, for the observed findings.

We observed that PD patients showed increased ratios of IFN- γ /IL-4, IL-2/IL-4 and IFN- γ /IL-17A in comparison with controls, suggesting a bias towards a Th1 profile in PD. Increased ratios of IFN- γ /IL-4 producing T cells have also been described in PD patients in comparison with controls (Baba et al, 2005). When activated, T helper (Th) lymphocytes can differentiate in three different types of effective Th cells, named Th1, Th2 and Th17. Th1 cells act mainly in macrophage and T cytotoxic cells activation; Th2 cells contribute to B lymphocytes activation; while Th17 cells are responsible for tissue inflammation induction and protection against extracellular pathogens (Striz et al, 2014). Th1 cells are responsible for cell-mediated immunity raised by intracellular pathogens, being also involved in autoimmunity. The bias towards a Th1 profile seen in PD reinforces the hypothesis that PD is associated with immunological imbalance or dysfunction. In addition, we found that higher TNF/IL-10 ratios were associated with worse cognitive performance in PD patients. This result is in line with the idea that a shift to a pro-inflammatory status is directly associated with worse cognitive performance.

To the best of our knowledge, this is the first report to describe reduced T lymphocytes activation and decreased plasma levels of inflammatory cytokines in the sample of PD patients in comparison with age-related controls. Despite the fact that all PD patients were medicated, the strict exclusion criteria, the selection of controls with comparable age and gender and the analysis of clinical and inflammatory parameters together can be regarded as strengths of the current study. In addition, we showed that the production of cytokines by PBMC *in vitro* is reduced with the exposure to the antiparkinsonian drugs levodopa and pramipexole. More studies are needed in order to elucidate the role of antiparkinsonian drugs in the immune system.

Our data together with previous studies corroborate the hypothesis that immunological mechanisms are involved in PD. It is clear that there is a peripheral immune alteration in PD, which is more than simply a decrease in immune responses. Immune changes observed in PD partially resemble those seen in normal ageing, though being exaggerated in PD. PD is clearly an age-related disease and it is possible that the immune alterations observed during aging are more pronounced in individuals who suffer from PD. It remains a challenge to fully understand how the immune system is linked to PD, therefore future studies into this subject are needed confirm the current findings.

Acknowledgments

Authors would like to acknowledge the participation of volunteers in this study and are indebted to their caregivers for their magnificent support. This study was supported by FAPEMIG, CAPES and CNPq, Brazil. NPR is currently a CAPES scholarship recipient. ELMV and IGB are postdoctoral fellows of CNPq and CAPES, respectively. IBM is a CNPq undergraduate scholarship recipient. ALT and HJR are CNPq fellowship recipients.

Conflicts of interest

Nothing to report.

References

- 1 Alberio T, Pippione AC, Comi C, Olgiati S, Cecconi D, Zibetti M, Lopiano L, Fasano M. Dopaminergic therapies modulate the T-CELL proteome of patients with Parkinson's disease. *IUBMB Life*. 2012;64(10):846-52.
- 2 Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11(8):493-8.
- 3 Bas J, Calopa M, Mestre M, Molleví DG, Cutillas B, Ambrosio S, Buendia E. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol* 2001; 113: 146–152.
- 4 Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Psychiatry* 1961;4:561-71.
- 5 Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP: The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010;23(4):228-242.
- 6 Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M. IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*. 1999;53(3):141-5.
- 7 Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2012;62(7):2154-68.
- 8 Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: A frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621-6.
- 9 Fahn S, Elton R. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Caine DB, Goldstein M. Eds. *Recent developments in Parkinson's disease*, vol 2. 1987; p153–163, 293–304.
- 10 Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.
- 11 Hasegawa Y, Inagaki T, Sawada M, Suzumura A. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2000;101(3):159-64.

- 12 Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17(5):427-42
- 13 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(3):181-4.
- 14 Hurny A, Michałowska-Wender G, Wender M. Impact of L-DOPA treatment of patients with Parkinson's disease on mononuclear subsets and phagocytosis in the peripheral blood. *Folia Neuropathol.* 2013;51(2):127-31.
- 15 Katsarou Z, Bostantjopoulou S, Hatzizisi O, Giza E, Soler-Cardona A, Kyriazis G. Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease]. *Rev Neurol.* 2007;45(12):725-8.
- 16 Klüter H, Vieregge P, Stolze H, Kirchner H. Defective production of interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1995;133(1-2):134-9.
- 17 Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, Imanishi J. Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2012;12(1):102-7.
- 18 Prigione A, Isaias IU, Galbussera A, Brighina L, Begni B, Andreoni S, Pezzoli G, Antonini A, Ferrarese C. Increased oxidative stress in lymphocytes from untreated Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15:327–328.
- 19 Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004;363(9423):1783-93.
- 20 Saunders JA, Estes KA, Kosloski LM, Allen HE, Dempsey KM, Torres-Russotto DR, Meza JL, Santamaria PM, Bertoni JM, Murman DL, Ali HH, Standaert DG, Mosley RL, Gendelman HE. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(4):927-38.
- 21 Stevens CH, Rowe D, Morel-Kopp MC, Orr C, Russell T, Ranola M, Ward C, Halliday GM. Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2012;252(1-2):95-9.
- 22 Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(9):593-612
- 23 Tribl GG1, Wöber C, Schönborn V, Brücke T, Deecke L, Panzer S. Amantadine in Parkinson's disease: lymphocyte subsets and IL-2 secreting T cell precursor frequencies. *Exp Gerontol.* 2001;36(10):1761-71.

- 24 Wandinger KP, Hagenah JM, Klüter H, Rothermundt M, Peters M, Vieregge P. Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 1999;98(2):214-20.

Author Roles

NPR, ALT and HJR worked on the conception and organization of the research project. NPR, FA, PLS, IGB, MSS, IBM, ELMV and PPC worked on the execution of the research project. NPR and ALT designed and executed the statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. HJR and ALT reviewed the statistical analyses and the manuscript.

Figure legends

Fig. 1: Representative example of analysis strategy performed using FlowJo 7.6.5 software. The immunophenotyping of leukocytes was verified by flow cytometry assays. Whole blood samples from Parkinson's disease (PD) patients and controls were stained with surface markers and intracellular FoxP3 after erythrocytes lyse. Total lymphocytes were gated (A) and fluorescent dot-plots were selected, for example for T lymphocytes (CD3+), as demonstrated in (B). Then, the lymphocyte subset, for instance T helper cells (C) were gated based on T lymphocytes (B) or total lymphocytes (A) gates. In some cases, double positive gates (for example, CD4+CD25+, D) was necessary. Intracellular staining for FoxP3 was analyzed through histogram (E; red, isotype control, blue, positive cells for FoxP3) based on CD4+CD25+ gate (D).

Fig. 2: Th1/Th2 and Th17 cytokines were evaluated in the plasma of Parkinson's disease (PD) patients and controls by Cytometric Bead Array (CBA). PD patients showed higher IFN- γ /IL-4 (A), IL-2/IL-4 (B) and IFN- γ /IL-17A ratios (D) in comparison with controls, suggesting a bias towards a Th1 profile. There was no statistical difference regarding IFN- γ /IL-10 ratio (C). In addition, PD patients presented lower IL-6/IL-10 (E) and TNF/IL-10 (F) ratios compared to controls, showing an anti-inflammatory weighted imbalance in PD. A-D = Student's t test. E,F = Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. 3: *In vitro* exposure of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to high doses of the antiparkinsonian drugs pramipexole (PX) and levodopa (LD) resulted in decreased production of cytokines. Phytohemagglutinin (PHA) was used as positive control. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test was used to compare each treatment with the baseline condition. *p<0.05, ***p<0.001.

TABLES

Table 1. Demographic and non-motor features of Parkinson's disease (PD) patients and control subjects.

	PD patients (n = 40)	Control subjects (n = 25)	p value
Gender (female/male)	13/27	6/19	0.58 ^a
Age in years (mean ± SD)	68.71 ± 10.07	65.23 ± 8.75	0.20 ^b
Body mass index in Kg/m ² (mean ± SD)	26.02 ± 3.73	27.64 ± 3.71	0.09 ^c
Educational level in years (mean ± SD)	4.72 ± 2.87	6.72 ± 5.37	0.16 ^b
MMSE [mean ± SD (median)]	24.00 ± 3.99 (25)	27.00 ± 3.57 (29)	0.001^b
FAB [mean ± SD (median)]	11.49 ± 2.99 (12)	12.32 ± 3.67 (13)	0.32 ^c
Conceptualization	1.23 ± 1.01 (1)	1.64 ± 1.11 (2)	0.12 ^b
Mental flexibility	1.82 ± 1.10 (2)	2.08 ± 1.04 (2)	0.34 ^b
Programming	1.74 ± 0.91 (2)	2.24 ± 0.83 (2)	0.04^b
Sensitivity to interference	2.26 ± 0.94 (3)	1.84 ± 1.25 (2)	0.21 ^b
Inhibitory control	1.41 ± 0.88 (1)	1.52 ± 1.09 (1)	0.73 ^b
Environmental autonomy	3.00 ± 0.00 (3)	3.00 ± 0.00 (3)	1.00 ^b
BDI [mean ± SD (median)]	8.64 ± 7.58 (6)	2.76 ± 3.35 (1)	<0.001^b
Medication in use (frequency in %)			
Anti-hypertensive (%)	55.00	48.00	0.62 ^a
Anti-diabetic (%)	10.00	20.00	0.29 ^a
Hypolipidemic (%)	10.00	24.00	0.17 ^a
Levothyroxine (%)	10.00	4.00	0.64 ^a
Antidepressants	20.00	12.00	0.51 ^a

Abbreviations: BDI = Beck Depression Inventory; FAB = Frontal Assessment Battery; MMSE = Mini-Mental State Examination; PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation.

^aFisher's exact test; ^bMann-Whitney test; ^cStudent's *t* test.

Table 2. Clinical features of Parkinson's disease (PD) patients

	PD patients (n = 40)
Length of illness in years [mean \pm SD (range)]	5.45 \pm 4.13 (0.4 – 18)
UPDRS [mean \pm SD (range)]	51.82 \pm 25.27 (11 – 105)
UPDRS I [mean \pm SD (range)]	3.36 \pm 2.96 (0 – 11)
UPDRS II [mean \pm SD (range)]	14.08 \pm 7.14 (2 – 31)
UPDRS III [mean \pm SD (range)]	34.56 \pm 18.43 (8 – 69)
HY [mean \pm SD (range)]	2.44 \pm 0.69 (1 – 4)
S&E in % [mean \pm SD (range)]	77.95 \pm 11.96 (50 – 100)
Medications in use [frequency (%)]	
Levodopa	37 (92.50)
Pramipexole	20 (50.00)
Entacapone	7 (17.50)
Amantadine	11 (27.50)

Abbreviations: HY = Hoehn and Yahr staging scale; PD = Parkinson's disease; SD = standard deviation; S&E = Schwab and England activities of daily living scale; UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

Table 3. Immunophenotyping of monocytes and lymphocytes subsets.

Marker	Cell Type	Controls	PD patients	<i>P</i> value
% CD14+ monocytes	Monocytes	82.75 ± 10.36	77.28 ± 10.36	0.11 ^a
% CD19+ lymphocytes	B lymphocytes	4.46 ± 2.67	5.05 ± 2.97	0.41 ^b
% CD3+ lymphocytes	T lymphocytes	79.37 ± 9.53	62.07 ± 15.71	0.01^a
% CD4+ in CD3+ lymphocytes	T helper lymphocytes	49.95 ± 9.00	53.90 ± 19.89	0.29 ^b
% CD8+ in CD3+ lymphocytes	T cytotoxic lymphocytes	24.53 ± 5.61	31.14 ± 13.95	0.06 ^a
% CD4+CD25+ in total lymphocytes	Activated T lymphocytes	5.31 ± 2.25	0.87 ± 1.32	0.001^b
% FoxP3+ in CD4+CD25+ lymphocytes	Regulatory T lymphocytes	70.82 ± 13.13	43.50 ± 33.83	0.14 ^b
% CD56+ lymphocytes	NK cells	18.21 ± 14.62	12.50 ± 6.00	0.86 ^b
CD4:CD8 ratio	-	2.20 ± 0.85	2.35 ± 1.40	0.62 ^b

Abbreviations: PD = Parkinson's disease; Th = T helper cell; Tc = T cytotoxic cell;

^aStudent's t test; ^bMann–Whitney test

Table 4. Plasma levels of cytokines in PD patients and controls.

Cytokine (pg/mL)	Controls	PD patients	<i>P</i> value
IL-2 (mean ± SD)	1.65 ± 0.23	1.56 ± 0.10	0.08 ^a
IL-4 (mean ± SD)	0.59 ± 0.15	0.49 ± 0.06	<0.001^a
IL-6 (mean ± SD)	3.82 ± 3.48	1.85 ± 0.87	<0.001^a
IL-10 (mean ± SD)	1.53 ± 0.27	1.36 ± 0.12	<0.001^a
TNF- α (mean ± SD)	1.11 ± 1.00	0.33 ± 0.13	<0.001^a
IFN- γ (mean ± SD)	1.25 ± 0.12	1.19 ± 0.08	0.01^a
IL-17A (mean ± SD)	3.35 ± 2.15	2.57 ± 2.48	0.01^a
IL-1 β (mean ± SD)	3.02 ± 1.73	2.81 ± 2.35	0.14 ^a

Abbreviations: IFN = interferon; IL = interleukin; PD = Parkinson's disease; SD= standard deviation;

TNF = tumor necrosis factor

^aMann–Whitney test

Figure 1

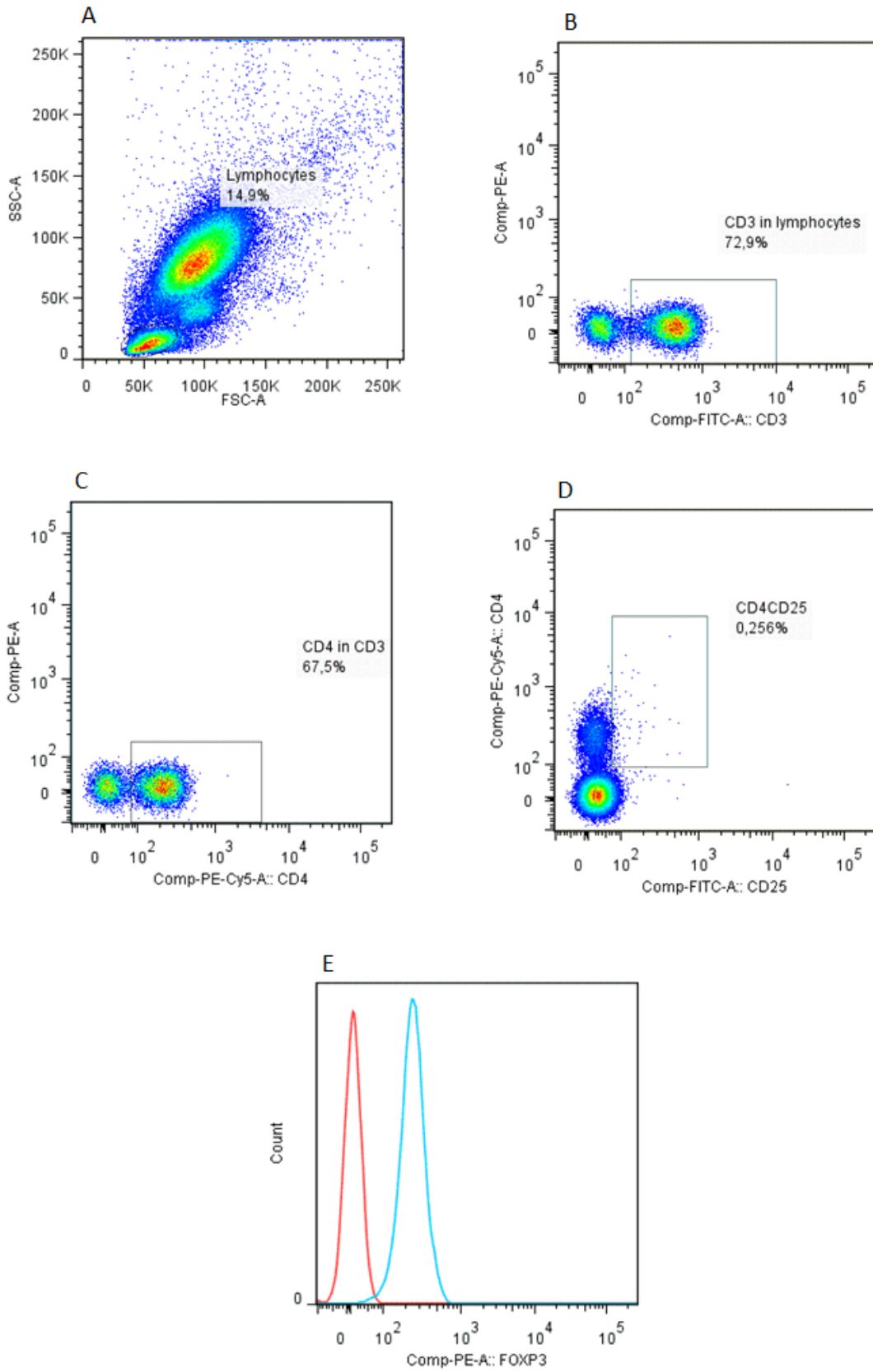


Figure 2

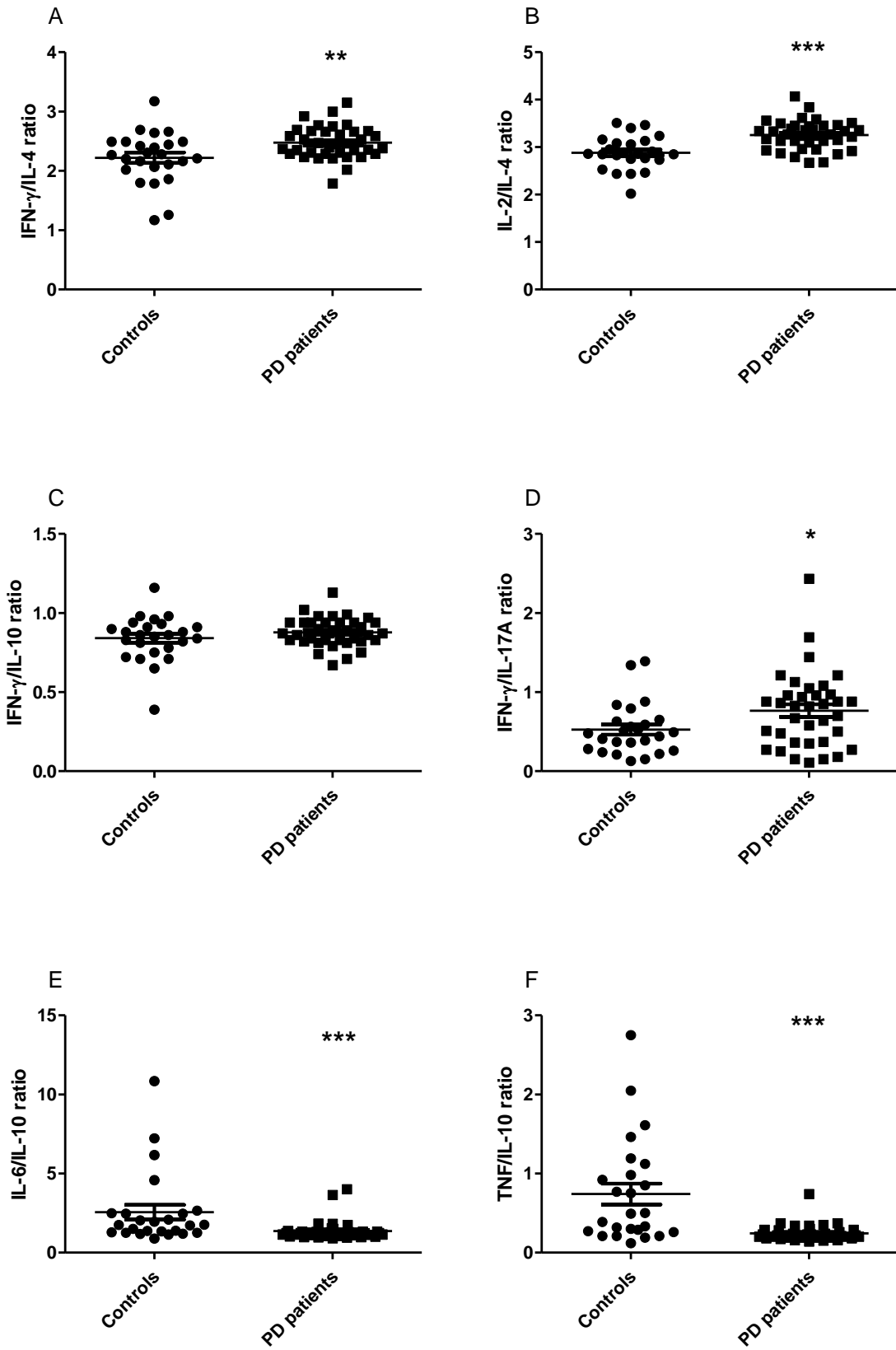
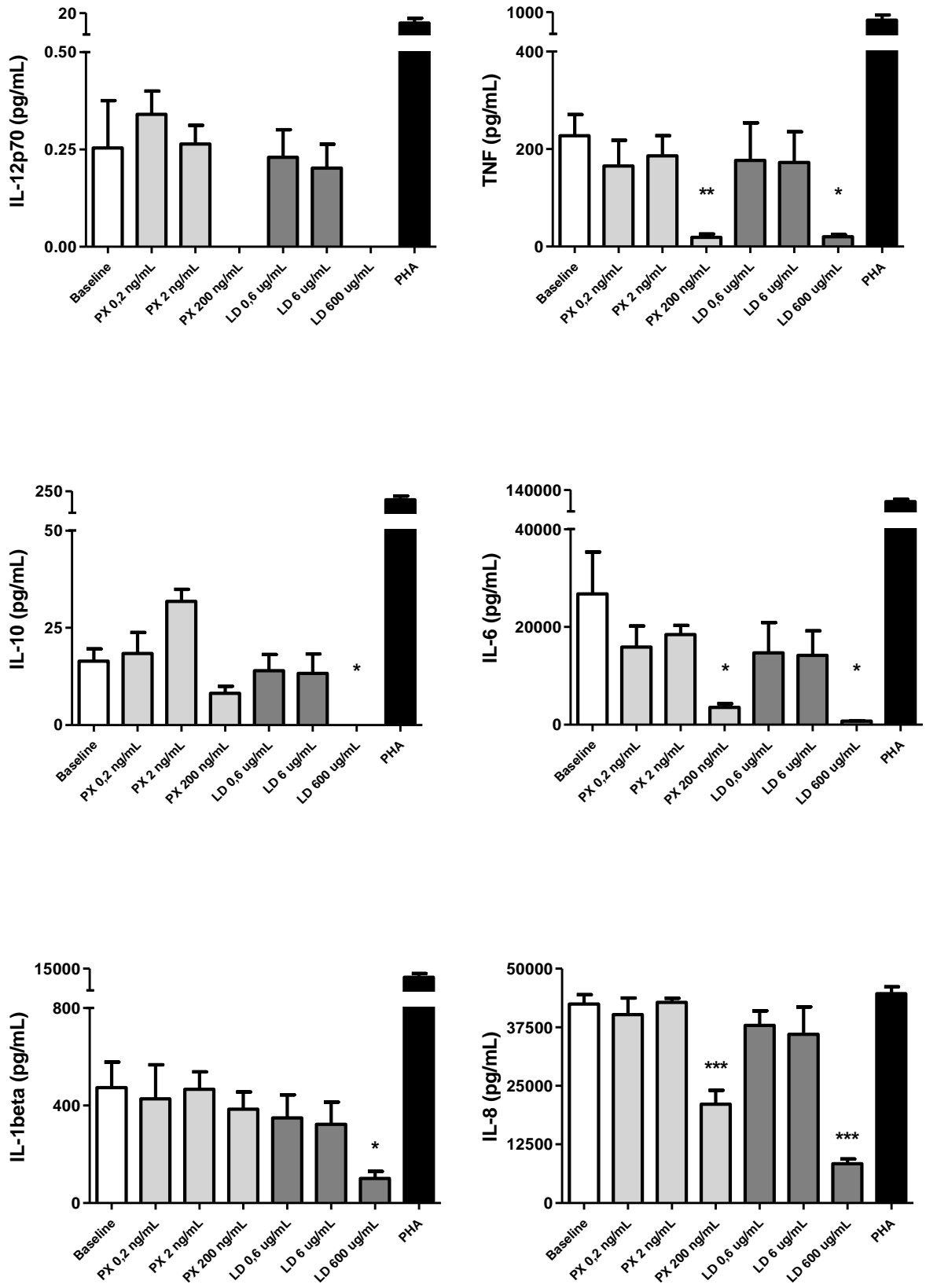


Figure 3



5.3 Imunofenotipagem – Análise dos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos e das proteínas de sinalização intracelulares

Para análise da expressão dos diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos e das proteínas de sinalização intracelulares foram incluídos 11 pacientes com DP e 15 controles. As tabelas 7 e 8 mostram as características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos nessas análises. Os resultados foram semelhantes àqueles descritos para a subpopulação de indivíduos incluídos na dosagem plasmática de citocinas e fatores neurotróficos.

Comparados aos controles, pacientes com DP apresentaram maior porcentagem de linfócitos expressando receptores serotoninérgicos 5-HTR1B, 5-HTR2B, 5-HTR2C, 5-HTR3 e 5-HTR4. Por outro lado, os linfócitos dos indivíduos controles apresentaram maior porcentagem de expressão do receptor 5-HTR2A. Não houve diferença entre pacientes com DP e controles em relação à porcentagem de expressão nos linfócitos do receptor 5-HTR1A e do transportador de serotonina, 5-HTT (figura 3).

Em relação aos receptores dopaminérgicos, encontramos aumento na porcentagem de linfócitos que expressam os receptores do tipo D2 (DRD2, DRD3 e DRD4) de pacientes com DP quando comparados aos controles. Por outro lado, a porcentagem de expressão de receptores do tipo D1 (DRD1 e DRD5) foi semelhante em pacientes e controles (figura 5). Apesar da diferença encontrada na análise dos receptores dopaminérgicos do tipo D2, não houve diferença entre pacientes e controles em relação à expressão das proteínas pDARPP32. Além disso, pacientes com DP demonstraram aumento significativo na porcentagem de linfócitos que expressam pAKT (Ser 473) (figura 5).

Tabela 7: Características clínicas (não motoras) e demográficas dos participantes da pesquisa incluídos nas análises dos receptores de serotonina e dopamina e proteínas de sinalização intracelulares.

	Pacientes com DP (n = 11)	Controles (n = 15)	Valor p
Gênero (feminino/masculino)	6/5	8/7	1,00 ^a
Idade em anos [média ± dp (mediana)]	66,76 ± 10,00 (65,60)	62,97 ± 8,09 (60,62)	0,36 ^b
Escolaridade em anos [média ± dp (mediana)]	3,91 ± 2,51 (4)	6,80 ± 4,90 (8)	0,16 ^b
MEEM [média ± dp (mediana)]	23,09 ± 3,94 (24)	27,40 ± 3,04 (29)	0,03^b
BAF [média ± dp (mediana)]	11,36 ± 3,47 (12)	13,07 ± 3,28 (14)	0,22 ^b
Conceitualização	1,64 ± 0,92 (2)	1,67 ± 1,18 (2)	0,78 ^b
Flexibilidade mental	1,45 ± 1,21 (1)	1,93 ± 1,10 (2)	0,32 ^b
Programação	1,55 ± 1,04 (2)	2,47 ± 0,74 (3)	0,02^b
Sensibilidade à interferência	2,09 ± 1,04 (2)	2,00 ± 1,25 (3)	1,00 ^b
Controle inibitório	1,64 ± 1,12 (1)	2,00 ± 1,07 (2)	0,40 ^b
Autonomia ambiental	3,00 ± 0,00 (3)	3,00 ± 0,00 (3)	1,00 ^b
BDI [média ± dp (mediana)]	7,73 ± 4,86 (8)	3,00 ± 2,93 (3)	0,01^b
Medicamentos em uso (frequência em %)			
Anti-hipertensivos (%)	55	40	0,69 ^a
Antidiabéticos (%)	9	13	1,00 ^a
Hipolipêmicos (%)	18	40	0,39 ^a
Levotiroxina (%)	18	6	0,56 ^a
Antidepressivos	27	13	0,62 ^a

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; dp = desvio padrão; BAF = Bateria de Avaliação Frontal; MEEM = Mini-Exame do Estado Mental; BDI = Inventário de Depressão de Beck. ^aTeste Exato de Fisher; ^bTeste Mann-Whitney.

Tabela 8: Características clínicas (motoras) dos pacientes com doença de Parkinson incluídos nas análises dos receptores de serotonina e dopamina e proteínas de sinalização intracelulares.

	Pacientes com DP (n = 11)
Tempo de diagnóstico em anos [média ± dp (variação)]	4,21 ± 3,42 (0,4 – 10)
UPDRS [média ± dp (variação)]	56,60 ± 27,06 (16 – 94)
UPDRS I [média ± dp (variação)]	3,30 ± 2,54 (0 – 8)
UPDRS II [média ± dp (variação)]	17,00 ± 7,50 (4 – 31)
UPDRS III [média ± dp (variação)]	36,40 ± 21,71 (10 – 67)
H&Y [média ± dp (variação)]	2,60 ± 0,46 (2 – 3)
S&E em % [média ± dp (variação)]	73,00 ± 12,52 (50 – 90)
Medicamentos em uso [frequência (%)]	
Levodopa	9 (81,81)
Pramipexol	5 (45,45)
Entacapona	2 (18,18)
Amantadina	4 (36,36)

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; dp = desvio padrão; UPDRS = Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson; H&Y = Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn and Yahr; S&E = Escala de Atividades de Vida Diária de Schwab e England.

Tabela 9: Expressão de receptores e transportados serotoninérgicos, receptores dopaminérgicos e proteínas de sinalização intracelular em linfócitos de pacientes com Doença de Parkinson e controles.

	Pacientes com DP (n = 11)	Controles (n = 15)	Valor <i>p</i>
Receptores e transportador serotoninérgicos			
5-HTR _{1A}	1,31 ± 1,20 (1,10)	1,12 ± 1,37 (0,57)	0,30 ^a
5-HTR _{1B}	0,85 ± 0,66 (0,63)	0,46 ± 0,69 (0,14)	0,05^a
5-HTR _{2A}	69,43 ± 27,74 (76,50)	95,33 ± 5,10 (97,40)	0,001^a
5-HTR _{2B}	2,83 ± 2,65 (2,58)	0,78 ± 0,59 (0,50)	0,01^a
5-HTR _{2C}	7,98 ± 9,60 (5,24)	2,61 ± 3,05 (1,41)	0,03^a
5-HTR ₃	1,28 ± 0,76 (1,34)	0,53 ± 0,51 (0,37)	0,02^a
5-HTR ₄	2,63 ± 1,59 (2,35)	1,05 ± 0,82 (0,67)	0,01^a
5-HTT	74,14 ± 28,52 (88,90)	86,59 ± 8,60 (85,60)	0,66 ^a
Receptores Dopaminérgicos			
DRD1	1,45 ± 0,74 (1,16)	1,31 ± 0,78 (1,08)	0,47 ^a
DRD2	1,41 ± 1,17 (1,35)	0,24 ± 0,22 (0,34)	0,001^a
DRD3	1,94 ± 1,86 (1,00)	0,65 ± 0,57 (0,41)	0,01^a
DRD4	0,94 ± 1,13 (0,43)	0,11 ± 0,07 (0,10)	<0,001^a
DRD5	2,63 ± 1,54 (2,47)	2,32 ± 2,05 (1,73)	0,44 ^a
Proteínas Intracelulares			
pDARPP32 (Thr34)	1,37 ± 0,75 (1,26)	1,44 ± 0,80 (1,33)	0,88 ^a
pDARPP32 (Thr75)	92,87 ± 16,51 (98,50)	98,87 ± 1,28 (99,30)	0,11 ^a
pAKT (Thr308)	2,78 ± 2,19 (1,72)	1,74 ± 0,88 (1,38)	0,80 ^a
pAKT (Ser473)	2,09 ± 2,08 (1,09)	0,61 ± 0,67 (0,35)	0,004^a

Resultados expressos em % de linfócitos positivos [média ± desvio padrão (mediana)].

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; 5-HTR = receptor de serotonina; DR = receptor de dopamina;

DARPP32 = Fosfoproteína regulada por dopamina e cAMP; AKT = proteína quinase B. ^aTeste Mann-Whitney

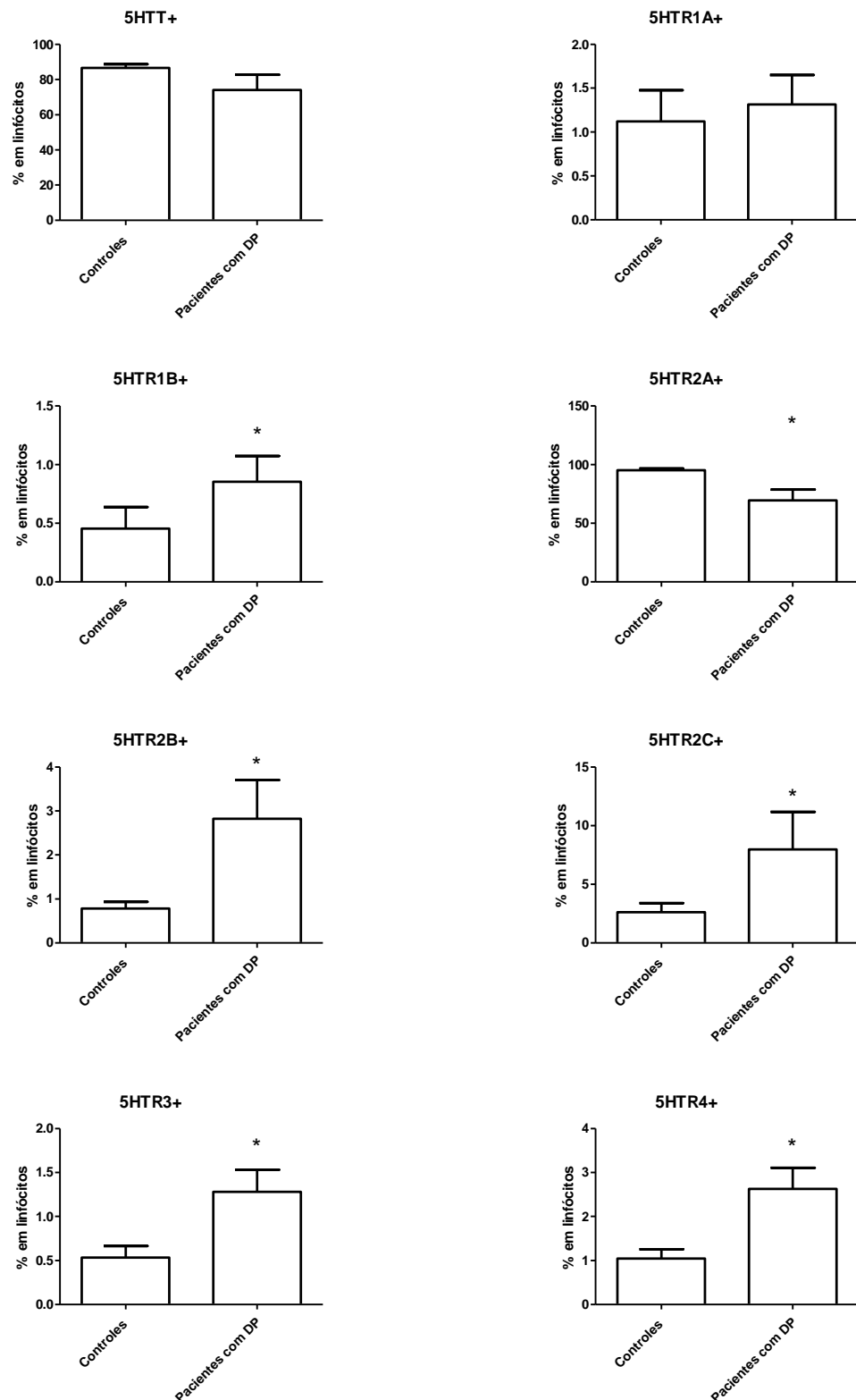


Figura 3: Análises por citometria de fluxo da expressão de receptores serotoninérgicos em linfócitos. Os resultados demonstraram que pacientes com doença de Parkinson (DP) apresentam maior porcentagem de linfócitos do sangue periférico que expressam os receptores serotoninérgicos (5HTR) 5HTR1B, 5HTR2B, 5HTR2C, 5HTR3 e HTR4 e do transportador de serotonina (5HTT). Já a porcentagem de linfócitos que expressam o receptor 5HTR2A está reduzida em pacientes com DP.

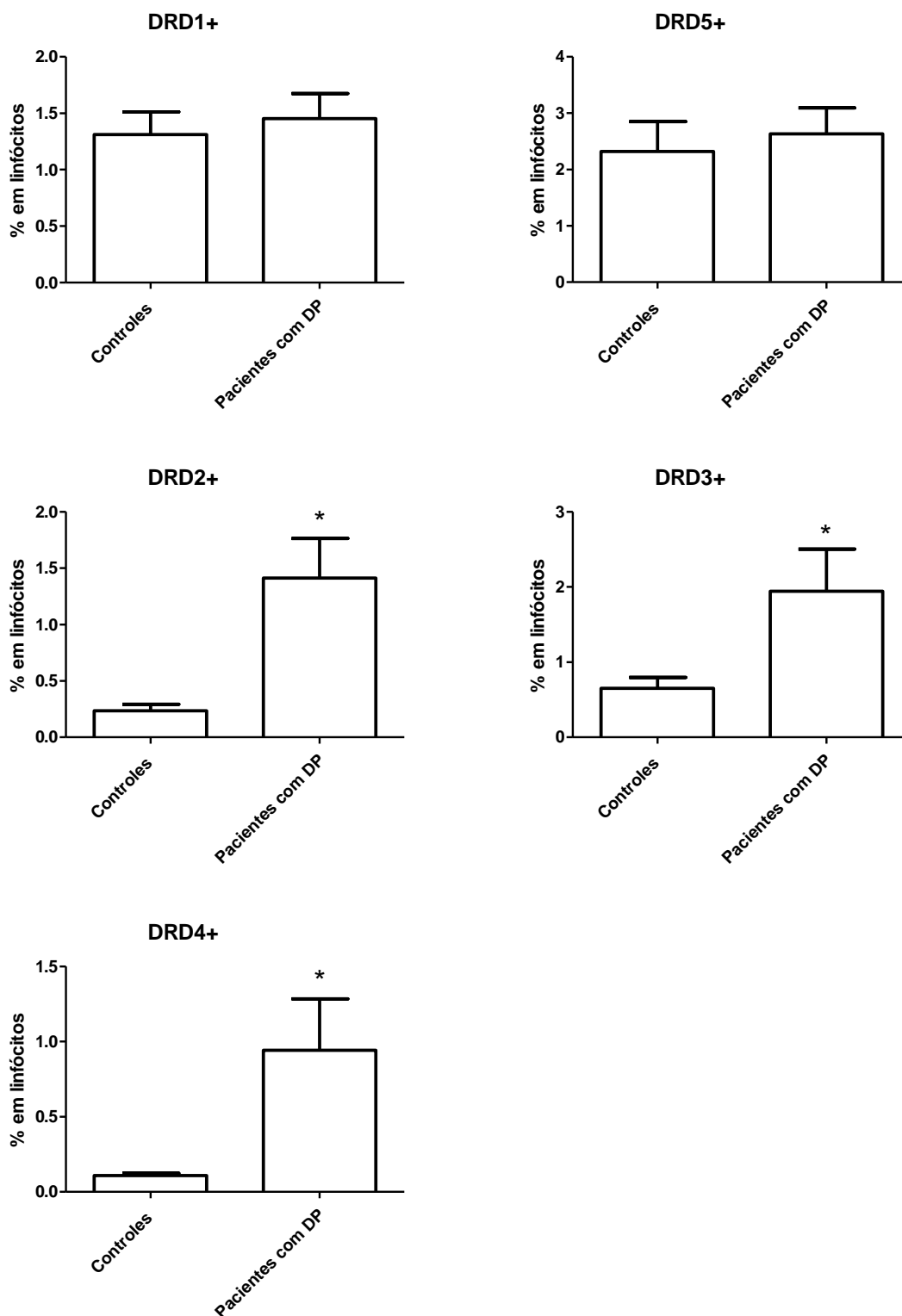


Figura 4: Análises por citometria de fluxo da expressão de receptores dopaminérgicos em linfócitos. Os resultados demonstraram que pacientes com doença de Parkinson (DP) apresentam aumento na porcentagem de linfócitos do sangue periférico que expressam receptores dopaminérgicos (DR) DRD2, DRD3 e DRD4 em comparação aos controles. Não há alteração, no entanto, em relação aos receptores DRD1 e DRD5.

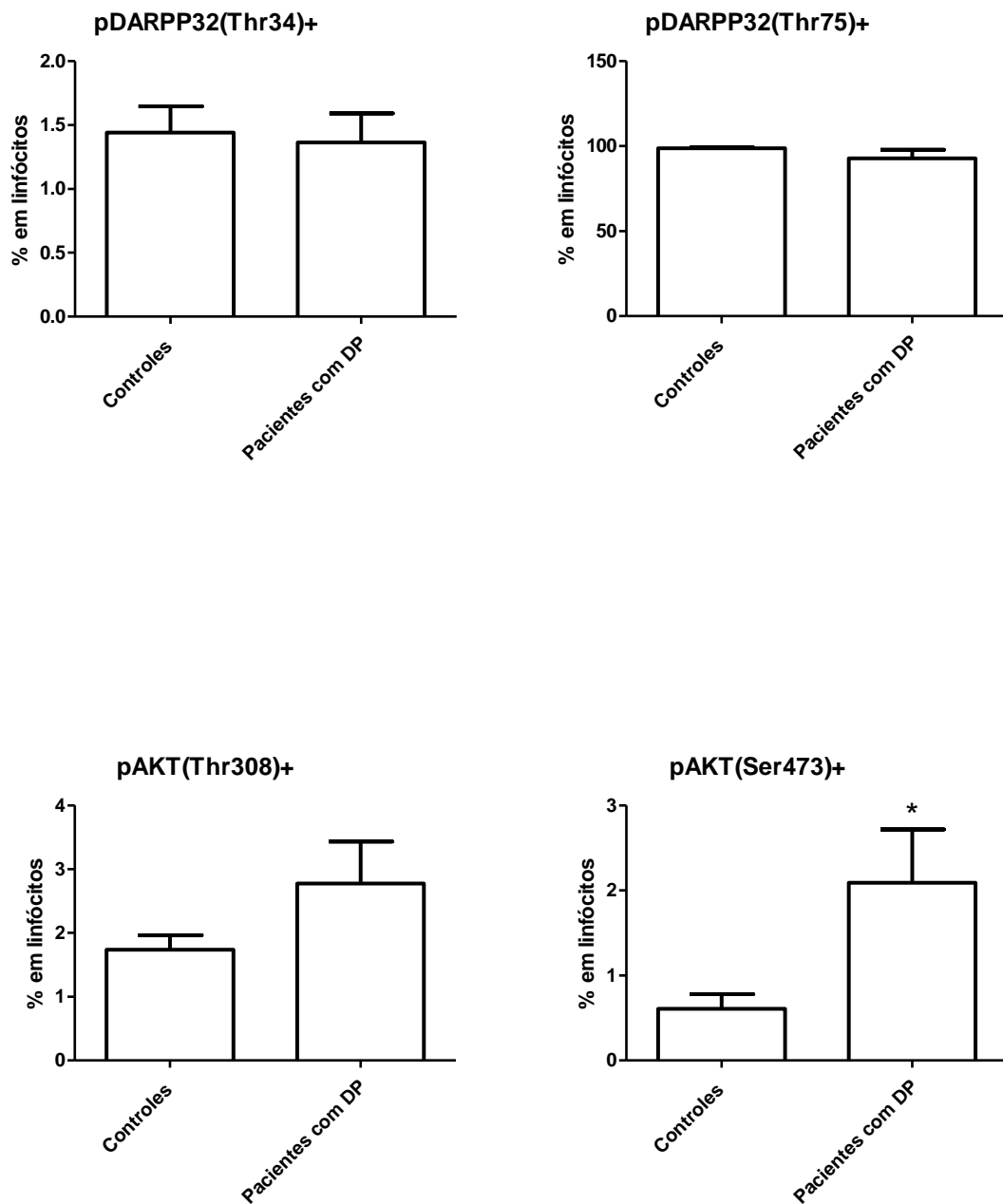


Figura 5: Análises por citometria de fluxo da expressão das proteínas pDARPP e pAKT em linfócitos. Apesar de apresentarem aumento na porcentagem de linfócitos que expressam receptores dopaminérgicos DRD2, DRD3 e DRD4, pacientes com doença de Parkinson (DP) não demonstraram alterações em relação à porcentagem de linfócitos do sangue periférico que expressam receptores as proteínas de sinalização intracelular pDARPP e pAKT (Thr308). Entretanto, a porcentagem de linfócitos que expressam pAKT (Ser473) encontra-se aumentada em pacientes com DP. As análises foram realizadas por citometria de fluxo.

6 PESQUISA REALIZADA DURANTE O DOUTORADO SANDUÍCHE

Visando agregar conhecimentos e qualidade à pesquisa, uma parte do doutorado foi realizada na Universidade KULeuven, Bélgica, sob orientação do professor Pieter Vanden Berghe. Durante o período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, trabalhamos investigando alterações em vias serotoninérgicas em biópsias duodenais de pacientes com DP. Assim, continuamos na linha de pesquisa sobre SNM e alterações periféricas na DP, mas com enfoque diferente do que havia sendo pesquisado.

6.1 Introdução

Apesar de a DP ser considerada uma doença predominantemente motora, manifestações não motoras, sobretudo relacionadas ao trato gastrointestinal, são de grande relevância clínica para a doença. Estudos sugerem que constipação intestinal e doenças inflamatórias intestinais precedem os sintomas motores da DP, podendo até serem considerados sinais prodrômicos ao parkinsonismo idiopático (Miciele et al, 2003; Strang, 1965; Warren and Marshall, 1983).

Embora os sinais cardinais da DP sejam atribuídos ao déficit de dopamina, o sistema serotoninérgico também está afetado nessa doença. Neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe sofrem degeneração na DP idiopática, levando a déficits serotoninérgicos em várias áreas corticais como parte do córtex frontal, córtex cingular anterior, córtex entorrinal e formação hipocampal. Além disso, os níveis de serotonina estão reduzidos no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP. As alterações no sistema serotoninérgico podem contribuir para uma série de sintomas não motores sofridos por pacientes com DP, como depressão, transtornos compulsivos e psicóticos (Huot et al, 2011). Alguns estudos têm sugerido que o sistema serotoninérgico esteja envolvido não apenas em sintomas não motores, mas também nas manifestações típicas da DP. Os níveis de serotonina estão particularmente reduzidos no LCR de pacientes com instabilidade postural e distúrbios da marcha (Iacono et al, 1997). Ainda, estudos sugerem que a disfunção serotoninérgica desempenha papel importante na geração do tremor postural (Loane et al 2013) e discinesia induzida por L-DOPA (Huot et al 2011).

A grande maioria da serotonina em nosso organismo é encontrada no trato gastrointestinal (TGI, quase 95% do total de serotonina no corpo). No TGI, 90% da

serotonina é sintetizada pelas células enterocromafins e os 10% restantes por neurônios entéricos. Dentro do TGI, a serotonina desempenha papel essencial na transmissão entérica, início do reflexo peristáltico e sinalização TGI – cérebro. Tanto no cérebro quanto no TGI a serotonina é sintetizada em duas etapas a partir do aminoácido essencial triptofano, sendo a triptofano-hidroxilase (TpH) a enzima limitante deste processo. Já foram descritas duas isoformas da TpH: enquanto as células enterocromafins contêm a TpH1, os neurônios entéricos expressam a TpH2. A ação da serotonina é terminada por sua recaptação através do transportador para recaptação da serotonina (SERT) (Cirillo et al, 2012). A ação farmacológica da serotonina é complexa uma vez que sua ação envolve vários subtipos de receptores (5-HTR). Até o momento, sete tipos e vários subtipos de receptores serotoninérgicos foram descritos. No TGI, 5-HTR3 e 5-HTR4 possuem papel crucial na iniciação do reflexo peristáltico e mediação da motilidade intestinal. De fato, várias transtornos relacionados à motilidade intestinal têm sido associadas a distúrbios no sistema serotoninérgico e fármacos que atuam em receptores serotoninérgicos têm sido usados no tratamento de desordens do TGI, como síndrome do intestino irritável e constipação (Sullivan et al, 2006).

Embora ainda não esteja claro se na DP ocorrem alterações no sistema serotoninérgico no TGI, sabe-se que a constipação é uma característica proeminente associada à DP. De fato, agonistas do receptor 5-HTR4 têm sido usados para tratar constipação na DP. O Tegaserod é um agonista parcial do receptor 5-HTR4 que aumenta o peristaltismo através da estimulação de neurônios aferentes primários intrínsecos. Estudos com tegaserod e mosapride para tratamento da constipação na DP obtiveram resultados promissores (Sullivan et al. 2006; Asai et al, 2005).

O sistema serotoninérgico tem sido subinvestigado no TGI de pacientes com DP apesar de: 1) constipação ser um sintoma muito comum na DP, sendo os agonistas serotoninérgicos utilizados para tratar essa condição; 2) Alterações na transmissão serotoninérgica no SNC têm sido descritas na DP; 3) Corpos de Lewy e morte neuronal também têm sido descritas não apenas no SNC, mas também TGI de pacientes com DP. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar o sistema serotoninérgico na mucosa do TGI de pacientes com DP em comparação com controles. Nossa hipótese é de que o sistema serotoninérgico apresenta alterações no TGI dos pacientes com DP. Para testar essa hipótese, nós avaliamos a expressão de mRNA de proteínas relacionadas ao sistema serotoninérgico: TpH1, SERT, e dos receptores 5-HTR3c, 5-HTR3e e 5-HTR4 na mucosa duodenal de

pacientes com DP e comparamos a controles, que eram os cônjuges dos pacientes. Além disso, através de imunohistoquímica foram realizadas análises para verificar a presença de serotonina e células enterocromafins na mucosa.

6.2 Justificativa

A maior prevalência de doenças do TGI em pacientes com DP, sobretudo precedendo os sintomas motores da doença, leva-nos ao questionamento de um processo fisiopatológico em que se desenvolve em tecidos periféricos, concomitante ou precedente à degeneração de neurônios do SNC. A investigação de alterações em tecidos periféricos pode auxiliar não apenas na elucidação da causa da DP, mas também na descoberta de biomarcadores da doença. Os biomarcadores têm particular relevância em doenças degenerativas crônicas por muitos motivos. Em primeiro lugar, para auxiliar no diagnóstico precoce em estágios que ainda permitam uma terapia modificadora da doença. Ou seja, tratamentos que afetam a evolução dos mecanismos fisiopatológicos da doença e não apenas os sintomas. Em segundo lugar, para monitorar a progressão da doença e, por último, determinar a eficácia de qualquer intervenção terapêutica.

6.3 Métodos

6.3.1 Sujeitos e avaliação clínica

Este estudo incluiu oito pacientes com DP diagnosticados de acordo com o critério do banco de cérebros do Reino Unido (United Kingdom PD Brain Bank criteria). Os pacientes foram recrutados da clínica de distúrbios do movimento da Universidade de Leuven, Bélgica. Os parceiros dos pacientes foram recrutados como controles. As endoscopias e todos os procedimentos subsequentes foram conduzidos simultaneamente para cada par de paciente/controle. Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem admitidos no estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital da Universidade de Leuven, Bélgica.

6.3.2 Endoscopia do trato gastrointestinal superior

Oito biópsias duodenais foram retiradas de cada indivíduo por endoscopistas utilizando fórceps padrão para biópsias com agulha (fórceps para biópsia de uso único NBF01-11123180, diâmetro 2,3 mm, largura de abertura 6,7 mm; Micro-Tech, Nanjing, China). Após serem removidas, as biópsias foram imediatamente imersas em solução de Krebs a 4°C previamente oxigenada (95% O₂/ 5% CO₂) e mantidas em gelo por no máximo 1 hora até serem dissecadas. A seguir, as biópsias foram colocadas em uma placa de Petri alinhadas com Sylgard e dissecadas sob um estereomicroscópio. A camada relativa à mucosa foi cuidadosamente removida e colocada em reagente para estabilização do RNA (RNAlater®, Invitrogen, Merelbeke, Belgium) ou solução de Krebs, para propósitos de extração de RNA ou fixação, respectivamente.

6.3.3 Imunohistoquímica

As amostras de mucosa foram fixadas por 30 min à temperatura ambiente em paraformaldeído 4% em PBS. Após fixação, as amostras foram lavadas com PBS (3 lavagens de 10 min) e colocadas em solução crioprotetora (sacarose 30% em PBS) e armazenadas a 4 °C por pelo menos 24h. Em seguida, as amostras são embebidas em Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Torrance, USA) e congeladas em nitrogênio líquido. Após congelamento, as amostras são armazenadas em freezer -80°C até o momento do corte em criostato. Utilizando um criostato, foram feitos cortes de 14 µm de espessura, os quais foram coletados em lâminas cobertas de poli-L-lisina. Os cortes foram armazenados em freezer -80 °C até a marcação para imunohistoquímica. Para isso, os cortes foram então incubados em tampão de bloqueio (soro de burro 4% e triton X-100 0,5% em PBS) por 2h à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram incubadas por 12h com os anticorpos primários contra serotonina (*mouse anti-human serotonin*; 1:100; Dako, Glostrup, Germany) e cromogranina A (*rabbit anti-chromogranin A*; 1:500; Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluídos em tampão de bloqueio. Após essa incubação as amostras foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 min) e incubadas com os anticorpos secundários por 2h (*donkey anti-mouse Alexa fluor 594*; 1:1000; Molecular Probes, Invitrogen e *donkey anti-rabbit Alexa fluor 488*; 1:1000; Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Os núcleos foram marcados com 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 3 µg/ml; Invitrogen). Após três lavagens de 10 min com PBS, as preparações foram montadas com solução de montagem Citifluor® (Citifluor Ltd., Leicester, UK) e lamínulas. As marcações imunohistoquímicas foram visualizadas em um microscópio

epifluorescente (BX 41 Olympus, Belgium). As contagens foram realizadas utilizando um aumento de 20 vezes. Após escolher um campo baseado na marcação nuclear com DAPI (azul), foram contados as células duplamente positivas para cromogranina A (verde) e serotonina (vermelho). As imagens confocais foram obtidas utilizando um microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta (Cell Imaging Core, KU Leuven, Belgium).

6.3.4 Análise da expressão de mRNA (Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa, quantitativa – qRT-PCR)

O RNA total foi extraído da mucosa utilizando um mini kit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Germany) e β -mercaptoetanol. As amostras de RNA foram transcritas a cDNA utilizando transcriptase reversa SuperScript® II (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). O cDNA obtido foi amplificado através de reação em cadeia polimerase (PCR) realizada em sistema LightCycler®480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) utilizando LightCycler®480 SYBR Green I Master mix. Foram avaliadas as expressões dos mRNAs de SERT, TpH1, 5-HTR3c, 5-HTR3e e 5-HTR4 na mucosa duodenal utilizando sequências de iniciadores (*primers*) específicas (tabela 1). Foi utilizado um calibrador intercorridas e uma curva padrão para cada gene avaliado. Os níveis de expressão relativos para todas as amostras foram calculados usando o programa LightCycler®480 e estão expressos relativos ao gene do RNA ribossomal S18 humano e corrigidos por variabilidade intercorridas.

Tabela 10: Sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados para o qRT-PCR

Gene	Sequência senso	Sequência anti-senso
SERT	CGTAGTTGTGGCGGGCTCAT	GCCGTGGTCATCACCTGCTT
TpH ₁	TGCAAAGGAGAAGATGAGAGAATTTAC	CTGGTTATGCTCTTGGTGTCTTTC
5-HTR _{3c}	ACACTTCTGCTGGGCTACAAC	TGACCACCATCAGGGACAGG
5-HTR _{3e}	AACGCTCCTGCTGGGCTAC	AGGCGAAGTAGACACCGATG
5-HTR ₄	CAAGGCTGGAATAACATTGGCATA	GTTGACCATGAAGACACAGTACG
S18	ACCAACATCGATGGGCGGCG	TGGTGATCACACGTTCCACCTCA

As sequências dos *primers* são mostradas no sentido 5' – 3'

Reação PCR: 45 ciclos de amplificação 95°C (10 s), 60°C (15 s), 72°C (15 s).

6.3.5 Análises estatísticas

Associações entre variáveis dicotômicas foram avaliadas através do teste exato de Fisher. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal, avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Como utilizamos amostras pareadas, dois grupos (pacientes x controles) foram comparados usando teste t pareado. Comparações entre três grupos foram feitas através do teste ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism™ 4.0 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Um valor de p bilateral menor que 0,05 foi adotado como nível de significância estatística para todos os testes.

6.4 Resultados

Uma visão geral dos resultados encontra-se na tabela 11. Pacientes com DP e controles não diferiram em relação à idade e gênero. Não houve diferença na porcentagem de células enterocromafins positivas para serotonina (figura 6). Embora não tenha atingido significância estatística, houve uma tendência ao aumento nos níveis de expressão de todos os mRNAs avaliados (SERT, TpH1, 5-HTR3c, 5-HTR3e e 5-HTR4; figura 7). O aumento nos níveis de expressão dos mRNAs não foram devidos a diferenças nos níveis do gene constitutivo (*housekeeping gene*, S18) utilizado para normalização dos valores de expressão dos mRNAs (figura 8).

Quatro dos oito pacientes com DP estavam utilizando medicamentos que podem afetar o metabolismo ou transmissão da serotonina (selegilina, rasagilina, amantadina, trazodona). Logo, separamos os pacientes em dois grupos: medicados e não-medicados, em relação ao uso dos medicamentos supracitados. Observamos que os níveis de expressão de mRNA para todas as proteínas avaliadas foram influenciados pelo uso de tais medicamentos (figura 9), uma vez que as diferenças entre pacientes e controles são mais proeminentes quando levamos em consideração apenas os pacientes com DP do grupo ‘não medicados’ (figura 9). Por outro lado, a porcentagem de células enterocromafins produtoras de serotonina não foi afetada pelo uso de medicamentos que alteram o metabolismo/transmissão serotoninérgica (figura 9). Para melhor concluir sobre esses resultados precisamos aumentar o número de indivíduos na pesquisa.

Tabela 11: Parâmetros avaliados em biópsias duodenais de pacientes com doença de Parkinson e controles

	Controles	Pacientes com DP	Valor <i>P</i>
Idade em anos	58.50 ± 12.65	61.25 ± 10.66	0.16 [†]
Genêro, n (Feminino/Masculino)	6/2	2/6	0.13 [§]
SERT mRNA	0.65 ± 0.49	0.92 ± 0.38	0.07 [†]
TpH ₁ mRNA	0.94 ± 0.35	1.09 ± 0.43	0.57 [†]
5-HTR _{3c} mRNA	0.73 ± 0.59	0.87 ± 0.39	0.46 [†]
5-HTR _{3e} mRNA	0.65 ± 0.52	0.88 ± 0.63	0.40 [†]
5-HTR ₄ mRNA	0.79 ± 0.32	1.14 ± 0.29	0.16 [†]
% de células 5-HT+/ChA+	60.97 ± 10.03	58.89 ± 12.91	0.46 [†]

Abreviações: DP = Doença de Parkinson; SERT = transportador para recaptação da serotonina; TpH = Triptofano hidroxilase; 5-HTR = receptor de serotonina; ChA = cromogranina A.

[†] Teste *t* pareado

[§] Teste exato de Fisher

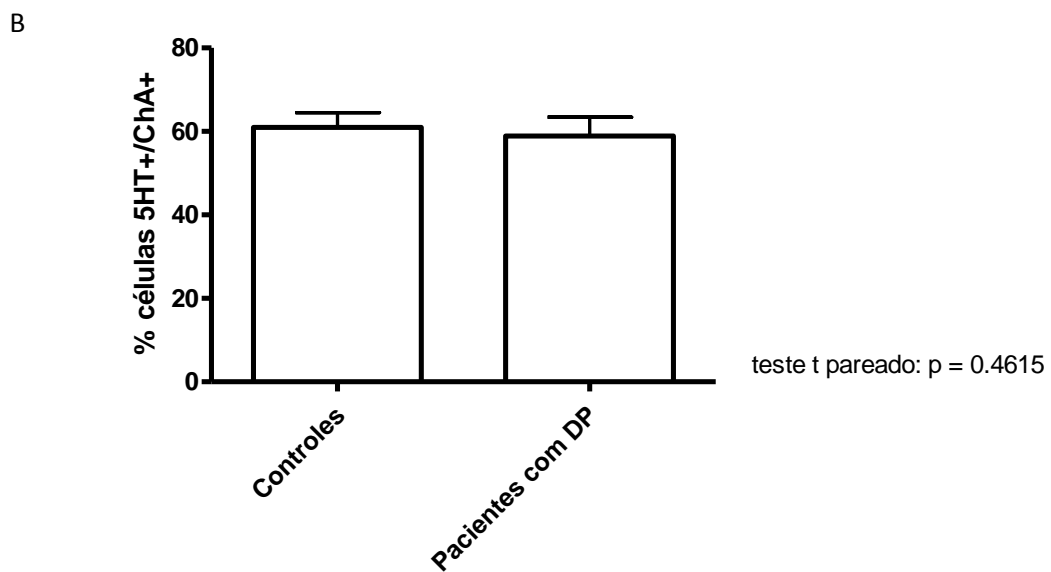
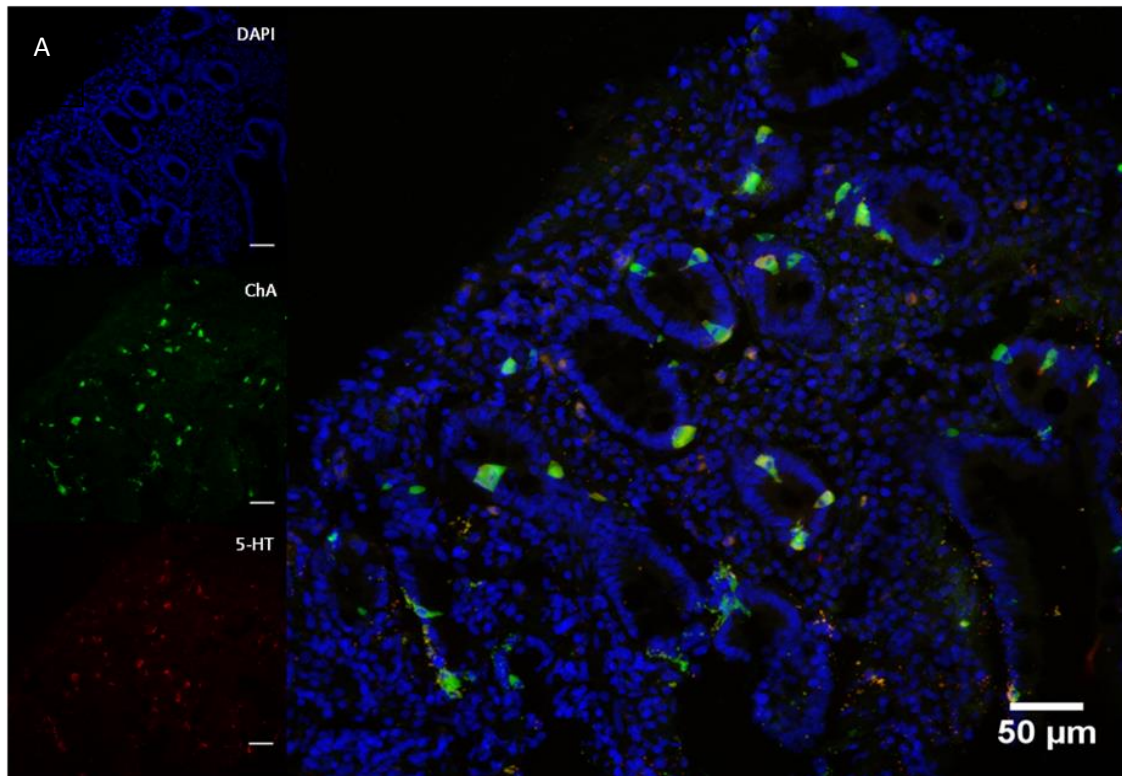


Figura 6: Análise de células enterocromafins produtoras de serotonina na mucosa duodenal de pacientes com doença de Parkinson (DP) e controles. (A) Imagem representativa de um campo para contagem das células. Azul = marcação dos núcleos das células (DAPI); verde = células positivas para cromogranina A (células enterocromafins); e vermelho = células positivas para serotonina. (B) Pacientes com DP e controles não diferiram em relação à porcentagem de células enterocromafins produtoras de serotonina. Anticorpos: *mouse anti-human serotonin*; 1:100; *rabbit anti-chromogranin A*; 1:500.

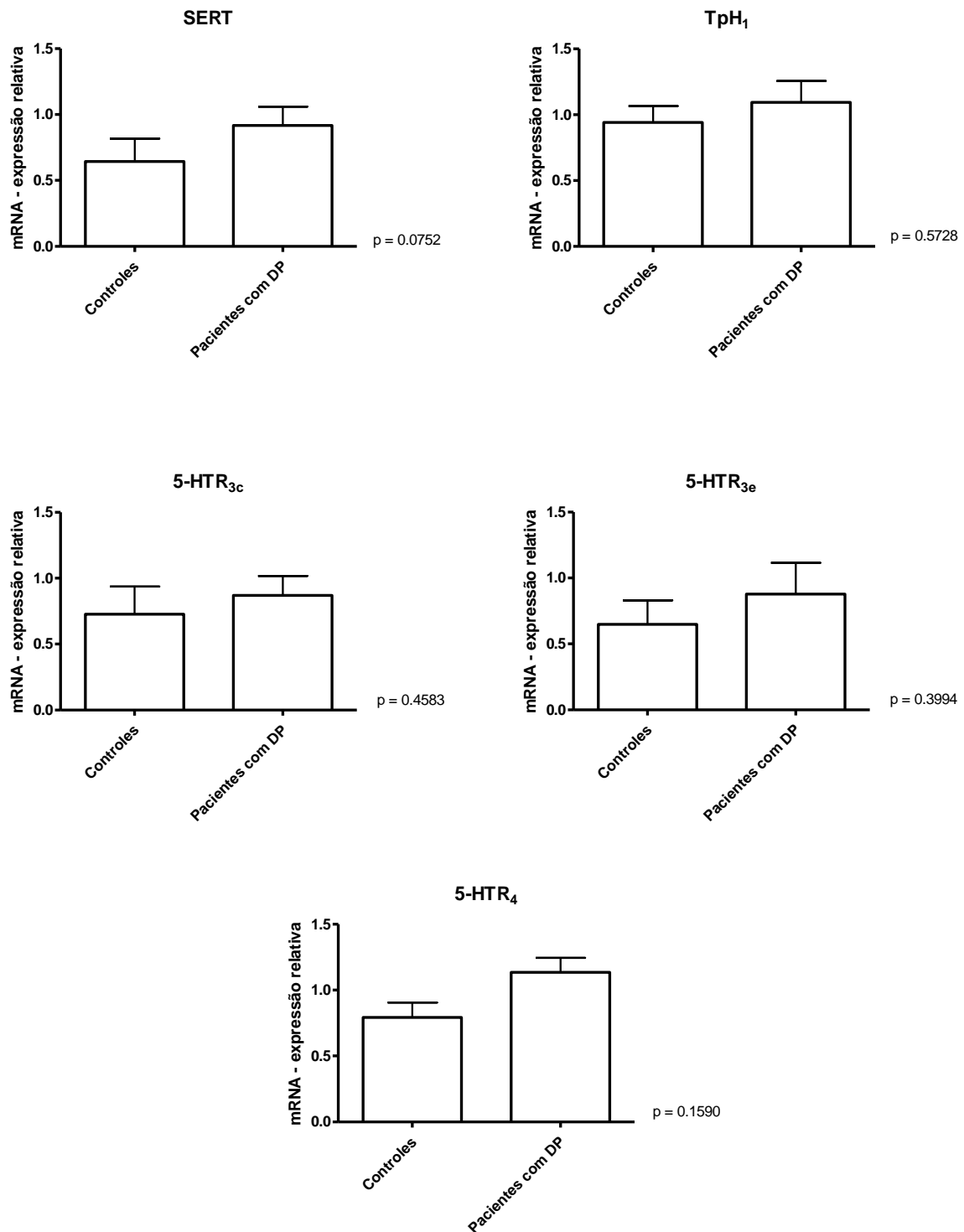


Figura 7: Expressão relativa de mRNA do transportador de serotonina (SERT), triptofano hidroxilase 1 (TpH₁) dos receptores de serotonina (5HTR) encontrados na mucosa gastrointestinal. Embora não tenha atingido significância significativa (teste t pareado), houve uma tendência a aumento de expressão de mRNA em todas as proteínas avaliadas nos pacientes com doença de Parkinson (DP) em relação aos controles.

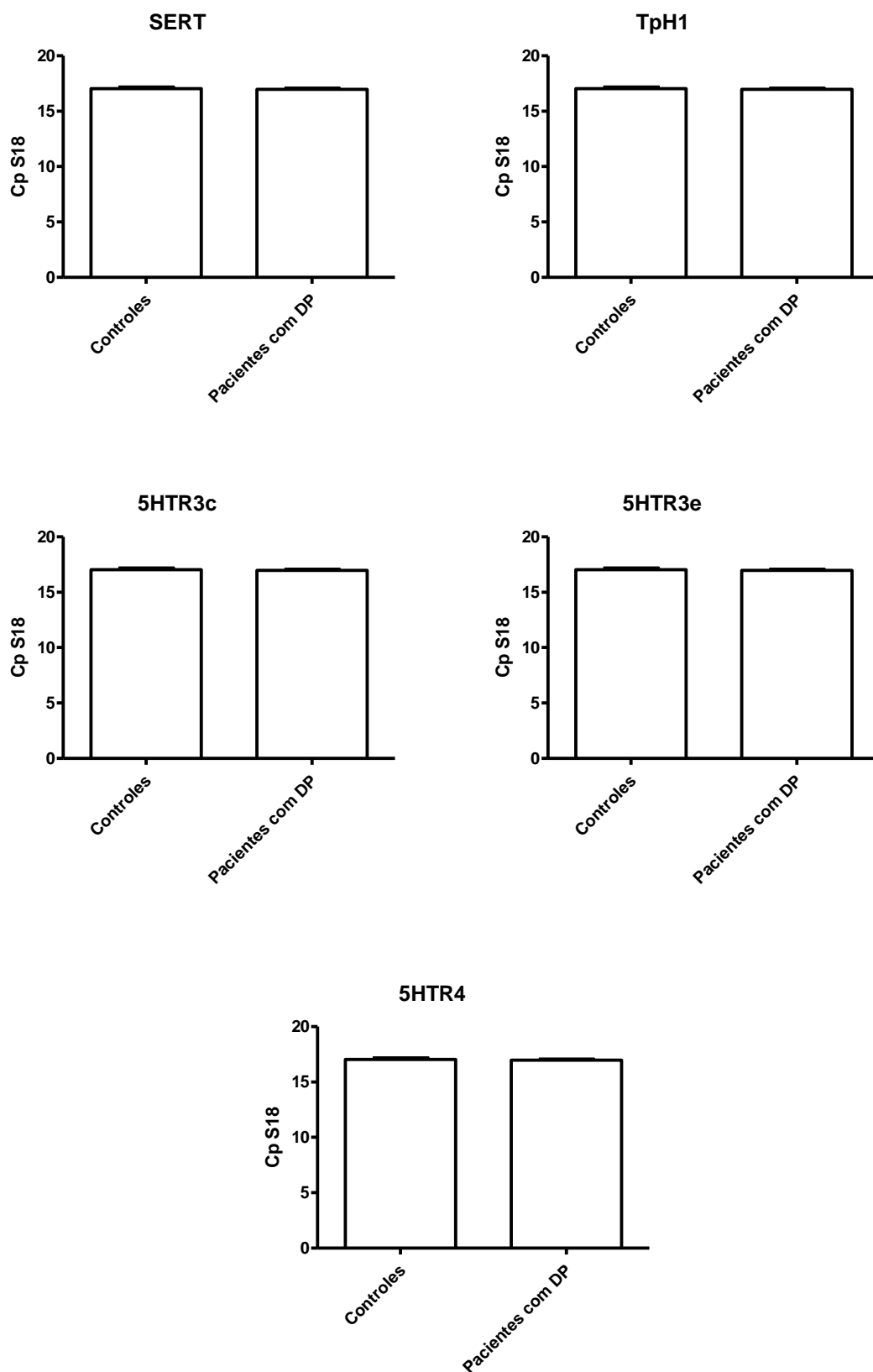


Figura 8: Valores Cp (*crossing point*) obtidos para o gene constitutivo utilizado, proteína ribossomal S18. Os valores relativos obtidos para todos os genes analisados (mostrados na figura 1) não foram influenciados pelo gene constitutivo usado para normalização.

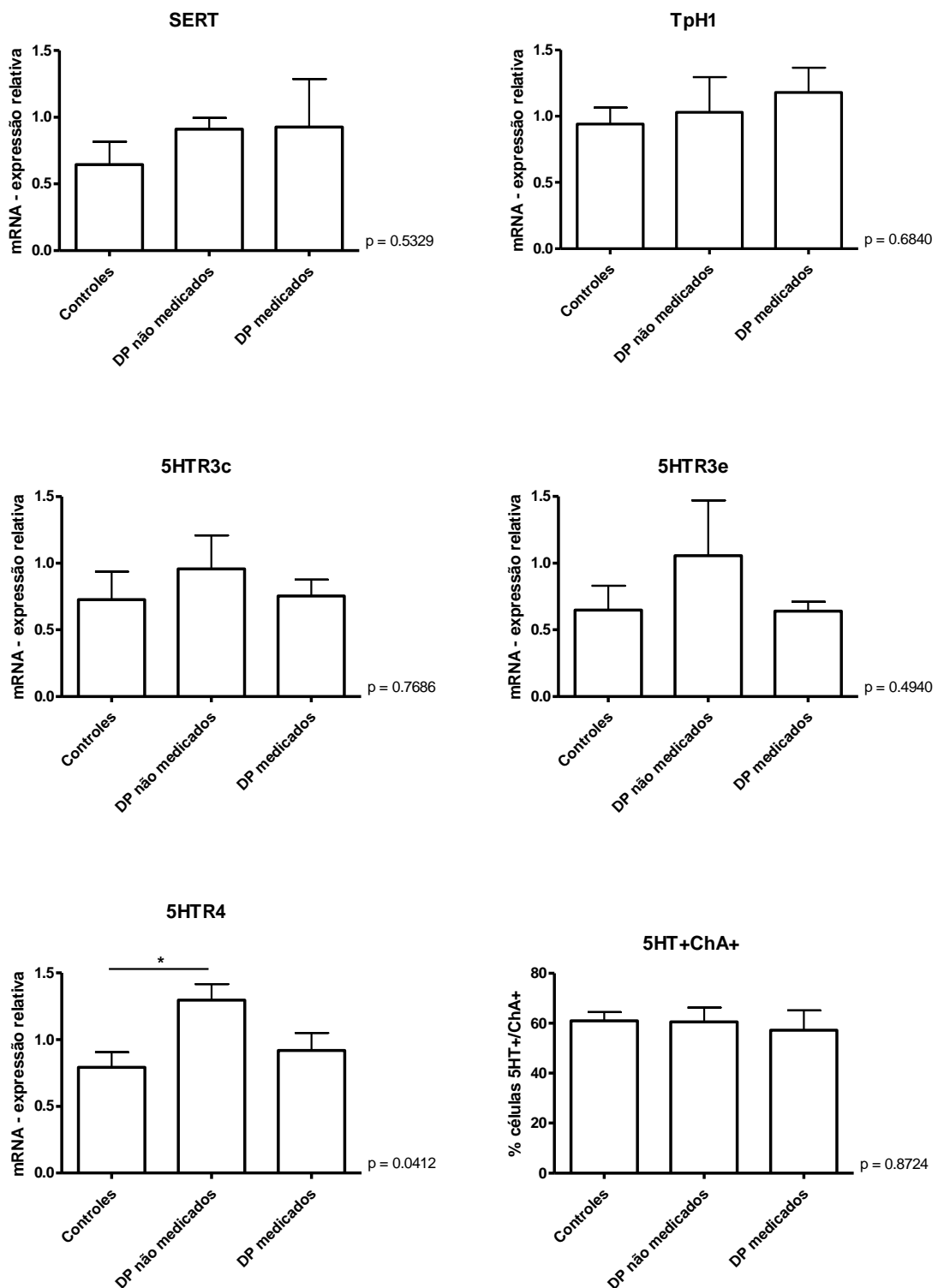


Figura 9: Expressão relativa de mRNA do transportador de serotonina (SERT), triptofano hidroxilase 1 (TpH₁) e dos receptores de serotonina (5HTR) em controles e pacientes com doença de Parkinson (DP). Os termos ‘medicados’ e ‘não medicados’ referem-se ao uso ou não de medicamentos que interferem com o metabolismo e/ou transmissão serotoninérgica. A diferença entre controles e pacientes é mais proeminente no grupo de pacientes ‘não medicados’, exceto para a porcentagem de célula senterocromafins produtoras de serotonina. ANOVA *one-way* seguido por teste de Tukey.

6.5 Conclusões

Demonstramos através da presente pesquisa que o sistema serotoninérgico provavelmente encontra-se alterado no TGI de pacientes com DP quando comparados a controles. Surpreendentemente, o número de células enterocromafins produtoras de serotonina parece não estar alterado nos pacientes com DP. Entretanto, o transportador, a enzima produtora e os receptores de serotonina avaliados parecem estar alterados, como avaliado pela expressão do mRNA das proteínas em questão. O uso de medicamentos que alteram o metabolismo/transmissão serotoninérgica influenciou os resultados obtidos. A diferença entre pacientes com DP e controles foram mais proeminentes quando consideramos apenas que não fazem uso de tais medicamentos. Até o presente momento, foram avaliadas biópsias de apenas 16 indivíduos, sendo 8 pacientes com DP e 8 controles. Precisamos recrutar um número maior de indivíduos. A obtenção de biópsias duodenais de humanos é tarefa difícil, mas os resultados são de grande valia. Assim, a continuidade desse trabalho pela equipe do LENS – Universidade de Leuven é essencial para uma melhor conclusão acerca dos resultados obtidos. No momento, os pesquisadores do LENS estão dando continuidade a essa pesquisa para que possamos aumentar o número de indivíduos participantes e, conseqüentemente, o poder de conclusão da análise estatística.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Pacientes com DP demonstraram pior desempenho cognitivo do que controles, conforme avaliado pelo MEEM e pela BAF. Além disso, de acordo com o BDI pudemos observar que pacientes com DP possuem maior incidência e/ou gravidade de sintomas depressivos do que controles. A gravidade dos sintomas depressivos está associada à gravidade da doença, segundo a UPDRS.

Não encontramos diferenças entre pacientes e controles em relação às concentrações plasmáticas das adipocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos avaliados. Entretanto, os níveis plasmáticos sTNFRs encontram-se significativamente aumentados no plasma de indivíduos com DP. Além disso, aumento nos níveis de sTNFRs estão associados a pior desempenho cognitivo. Comprometimento cognitivo é um dos principais e mais incapacitantes SNM da DP, e é possível que o mesmo ocorra em decorrência da alteração dos níveis de citocinas na DP. Assim, os níveis plasmáticos de sTNFRs podem constituir potenciais biomarcadores para declínio cognitivo na DP. Além disso, maiores níveis plasmáticos da quimiocina IP-10 também estão significativamente correlacionados a pior desempenho cognitivo nos pacientes com DP.

Ainda como parte deste estudo, verificamos que pacientes com DP e controles não diferem em relação à porcentagem de monócitos (CD14+), linfócitos B (CD19+), linfócitos T auxiliares (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+), linfócitos T regulatórios (CD4+CD25+FoxP3+) e células NK (CD56+). Entretanto, verificamos uma redução na porcentagem de linfócitos T (CD3+), especialmente células ativadas (CD4+CD25+) no sangue periférico de pacientes com DP. Confirmando esse resultado, observamos redução nos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias no plasma de pacientes com DP. Vimos que na DP a resposta encontra-se direcionada para um perfil Th1. Os linfócitos T ou células T são os principais efetores da chamada imunidade celular. Existem duas classes principais de células T - as células T citotóxicas e as células T auxiliares (Th). Quando ativada por uma célula apresentadora de antígeno, uma célula T auxiliar pode diferenciar-se em três tipos distintos de células T auxiliares efectoras, denominadas Th1, Th2 e Th17. As células Th1 auxiliam principalmente a ativação de macrófagos e células T citotóxicas; as células Th2 auxiliam na ativação das células B; enquanto as células Th17 que são responsáveis pela indução da inflamação tecidual e a proteção contra patógenos extracelulares. A célula T auxiliar efectora

Th1 secreta IFN- γ e o TNF- α e ativa os macrófagos para fagocitarem antígenos. A célula T auxiliar efetora Th2 irá secretar IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 defendendo o organismo principalmente contra patógenos extracelulares. A célula T auxiliar Th17 secreta principalmente citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) e quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CCL2) (Striz et al, 2014). Outro tipo de célula T que vem sendo recentemente estudado na resposta imunológica são as células T reguladoras (Tregs) que têm o propósito de controlar as respostas dos processos imunes. Ainda são escassos os estudos avaliando células T em pacientes com o diagnóstico de DP, apesar das evidências na literatura sugerirem alterações no perfil Th1/Th2 de tais pacientes (Baba et al, 2005).

Não apenas moléculas plasmáticas e a porcentagem de linfócitos T, mas também a porcentagem de expressão de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos encontra-se alterada no sangue periférico de pacientes com DP. Ainda não está claro se as diferenças encontradas decorrem de mecanismos de adaptação frente às alterações que ocorrem com a doença ou se estão diretamente relacionadas à fisiopatologia da mesma. São necessários mais estudos nesse aspecto.

Nossos resultados, de forma geral, corroboram a hipótese de que há mecanismos imunes e alterações inflamatórias estão envolvidas na doença de Parkinson. Está claro que na DP ocorrem alterações imunes periféricas, as quais representam mais do que uma simples redução ou aumento das funções imunes. Enquanto alguns encontram-se em níveis aumentados, outras encontram-se reduzidas em pacientes com DP em comparação a controles de mesma idade. Ainda trata-se de um grande desafio compreender como o sistema imune está relacionado ao processo degenerativo que ocorre na DP. Algumas alterações observadas podem assemelhar-se àquelas que ocorrem com o envelhecimento. Entretanto, essas mudanças parecem ser mais exacerbadas em indivíduos com DP. Para um melhor entendimento do assunto, mais estudos são necessários, especialmente os que contemplem a DP em suas várias fases e inclua pacientes ainda não submetidos a tratamento farmacológico.

Como perspectivas, pretendemos continuar a pesquisa em vários aspectos. Para compreender melhor as alterações imunes/inflamatórias na DP, acreditamos que é de suma importância a investigação de vias de sinalização intracelulares, como por exemplo via das MAP quinases, via PI3K/AKT/mTOR e via do inflamasoma. Além disso, a avaliação de pacientes com DP com demência e depressão associados enriqueceria a pesquisa no que diz respeito à investigação dos SNM de nosso interesse. Em relação à pesquisa realizada no

doutorado sanduíche, pretendemos aumentar o número de indivíduos recrutados a fim de melhor concluir sobre os resultados obtidos.

8 REFERÊNCIAS

- 1 Asai H, Udaka F, Hirano M, Minami T, Oda M, Kubori T, Nishinaka K, Kameyama M, Ueno S. Increased gastric motility during 5-HT₄ agonist therapy reduces response fluctuations in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005;11(8):499-502.
- 2 Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005;11(8):493-8.
- 3 Barbosa IG, Rocha NP, Huguet RB, Ferreira RA, Salgado JV, Carvalho LA, Pariante CM, Teixeira AL. Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord* 2012;137(1-3):151-5.
- 4 Beato RG, Nitrini R, Formigoni AP, Caramelli P. Brazilian version of the Frontal Assessment Battery (FAB): preliminary data of administration to healthy elderly. *Dement Neuropsychol* 2007;1:59-65.
- 5 Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Psychiatry* 1961;4:561-71.
- 6 Bonnet AM, Jutras MF, Czernecki V, Corvol JC, Vidailhet M. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis.* 2012;2012:198316.
- 7 Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:777-781.
- 8 Calne D. A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders.* 2005; 11: S39-S40.
- 9 Cirillo C, Vanden Berghe P, Tack J. Role of serotonin in gastrointestinal physiology and pathology. *Minerva Endocrinol.* 2011 Dec;36(4):311-24.
- 10 Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2012;62(7):2154-68.

- 11 Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, Talib LL, Mendonça VA, Gattaz WF, Forlenza OV. Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;22(4):1305-11.
- 12 Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: A frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621-6.
- 13 Emre M, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y, Broe GA, Cummings J, Dickson DW, Gauthier S, Goldman J, Goetz C, Korczyn A, Lees A, Levy R, Litvan I, McKeith I, Olanow W, Poewe W, Quinn N, Sampaio C, Tolosa E, Dubois B. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007 ;22(12):1689-707.
- 14 Fahn S, Elton R. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Caine DB, Goldstein M. Eds. *Recent developments in Parkinson's disease*, vol 2. 1987; p153–163, 293–304.
- 15 Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.
- 16 Fontenelle LF, Barbosa IG, Luna JV, de Sousa LP, Abreu MN, Teixeira AL. A cytokine study of adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Compr Psychiatry.* 2012;53(6):797-804.
- 17 Gallagher DA, Schrag A. Psychosis, apathy, depression and anxiety in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;46(3):581-9.
- 18 Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992;55(3):181-4.
- 19 Huot P, Fox SH, Brotchie JM. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2011;95(2):163-212.
- 20 Iacono RP, Kuniyoshi SM, Ahlman JR, Zimmerman GJ, Maeda G, Pearlstein RD. Concentrations of indoleamine metabolic intermediates in the ventricular cerebrospinal fluid of advanced Parkinson's patients with severe postural instability and gait disorders. *J Neural Transm.* 1997;104(4-5):451-9.

- 21 Jain S, Goldstein DS. What ARE Parkinson disease? Non-motor features transform conception of the shaking palsy [Special issue]. *Neurobiol Dis.* 2012;46(3):505-7.
- 22 Kummer A, Teixeira AL. Neuropsychiatry of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009;67(3B):930-9.
- 23 Loane C, Wu K, Bain P, Brooks DJ, Piccini P, Politis M. Serotonergic loss in motor circuitries correlates with severity of action-postural tremor in PD. *Neurology.* 2013;80(20):1850-5.
- 24 Martí MJ, Tolosa E. Parkinson disease: New guidelines for diagnosis of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):190-1.
- 25 McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988;38(8):1285-91.
- 26 Micieli G, Tosi P, Marcheselli S, Cavallini A. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurological Sciences.* 2003;24 Suppl 1:S32-4.
- 27 Noto C, Gadelha A, Belangero SI, Spindola LM, Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL, Cardoso Smith MA, de Jesus Mari J, Bressan RA, Brietzke E. Circulating levels of sTNFR1 as a marker of severe clinical course in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2013;47(4):467-71.
- 28 Pagonabarraga J, Kulisevsky J. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;46(3):590-6.
- 29 Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14(2):223-36
- 30 Rocha NP, Reis HJ, Vanden Berghe P, Cirillo C. Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease: a role for inflammation and immunomodulation? *Neuroimmunomodulation.* 2014a;21(2-3):88-94.
- 31 Rocha NP, Scalzo PL, Barbosa IG, de Sousa MS, Morato IB, Vieira EL, Christo PP, Reis HJ, Teixeira AL. Circulating levels of adipokines in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2014b;339(1-2):64-8.
- 32 Rocha NP, Teixeira AL, Scalzo PL, Barbosa IG, de Sousa MS, Morato IB, Vieira EL, Christo PP, Palotás A, Reis HJ. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors

- are associated with cognitive performance in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014c;29(4):527-31.
- 33 Rocha NP, Scalzo PL, Barbosa IG, de Sousa MS, Morato IB, Vieira EL, Christo PP, Teixeira AL, Reis HJ. Cognitive status correlates with CXCL10/IP-10 levels in Parkinson's disease. *Parkinson's disease.* 2014d (in press).
- 34 Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23(2):183-9.
- 35 Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;363(9423):1783-93.
- 36 Silberman CD, Laks J, Capitão CF, Rodrigues CS, Moreira I, Engelhardt E. Recognizing depression in patients with Parkinson's disease: accuracy and specificity of two depression rating scale. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64:407-411.
- 37 Strang RR. The association of gastro-duodenal ulceration and Parkinson's disease. *The Medical Journal of Australia.* 1965;1(23):842-3.
- 38 Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(9):593-612.
- 39 Sullivan KL, Staffetti JF, Hauser RA, Dunne PB, Zesiewicz TA. Tegaserod (Zelnorm) for the treatment of constipation in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006;21(1):115-6.
- 40 Tumas V, Rodrigues GG, Farias TL, Crippa JA. The accuracy of diagnosis of major depression in patients with Parkinson's disease: a comparative study among the UPDRS, the geriatric depression scale and the Beck depression inventory. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66:152-156.
- 41 Warren JR; Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1983; 1(8336):1273-5.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Aspectos neuroimunofarmacológicos envolvidos na Doença de Parkinson

Introdução: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa clínica. É muito importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos antes de aceitar participar da mesma. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento. Se ainda assim persistirem dúvidas a respeito do estudo, pergunte ao pesquisador responsável.

Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar os níveis de determinadas moléculas/substâncias no plasma (citocinas/quimiocinas) e nos leucócitos/glóbulos brancos do sangue de pacientes com doença de Parkinson e em indivíduos controles. Esse estudo buscará identificar variações na quantidade de expressão dessas moléculas entre os pacientes com doença de Parkinson e idosos sem doenças neurodegenerativas e/ou psiquiátricas, o que poderá contribuir para a sua diferenciação e para o maior entendimento da Doença de Parkinson.

Resumo: A doença de Parkinson (DP) é uma doença degenerativa, crônica e progressiva, que acomete em geral pessoas idosas. Ela ocorre pela perda de neurônios do sistema nervoso central em uma região conhecida como substância negra (ou nigra). Os neurônios dessa região sintetizam o neurotransmissor dopamina, cuja diminuição nessa área provoca sintomas principalmente motores. Os principais sintomas motores se manifestam por tremor, rigidez muscular, diminuição da velocidade dos movimentos e distúrbios do equilíbrio e da marcha. Entretanto, também podem ocorrer outros sintomas, como depressão, alterações do sono, diminuição da memória e distúrbios do sistema nervoso autônomo. A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer e é altamente incapacitante. Entretanto, não se sabe a exata dimensão dos aspectos neuroimunofarmacológicos sobre essa doença.

Procedimentos: Este estudo irá consistir de uma avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações motoras, cognitivas e do comportamento. A aplicação desses testes e questionários não traz constrangimentos ao paciente e o único possível incômodo refere-se ao tempo de duração da entrevista, que pode durar de 40 a 60 minutos. Posteriormente, será realizada coleta de 20,0mL de sangue com material descartável apropriado. Esse sangue será encaminhado para o estudo laboratorial. A coleta de sangue venoso implica em risco mínimo de acidente de punção, caracterizado por extravasamento sanguíneo para o tecido debaixo da pele, provocando uma pequena “mancha roxa” no local. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias.

Critérios de inclusão: Serão incluídos pacientes de ambos os sexos com o diagnóstico estabelecido de doença de Parkinson e que pretendam participar do estudo. Para fins de comparação, também serão incluídos voluntários hígidos (ver Grupo Controle).

Grupo Controle: Este grupo constitui-se dos voluntários que não apresentam diagnóstico para doença de Parkinson ou qualquer outra doença neurodegenerativa ou psiquiátrica. Os dados provenientes dos participantes desse grupo serão utilizados apenas para fim de comparação com os grupos de pacientes supracitados.

Benefícios: Não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico. O participante não terá nenhum benefício direto além de estar contribuindo para o desenvolvimento científico e a melhor compreensão da doença de Parkinson. A participação no estudo também não implicará em ônus financeiro (despesas) para você.

Confidencialidade: Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e, sob certas

circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, além da divulgação dos dados desta para o meio científico desde que não haja quebra de confidencialidade.

Desligamento: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Emergência / contato com a Comissão de Ética: É garantido seu direito a respostas a eventuais dúvidas que surgirem durante o estudo. Assim, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate o Prof. Helton J. Reis pelo telefone 3409-2719 ou o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG) no telefone 3409-4592. O COEP/UFMG localiza-se na Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar, Campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, CEP31270-901.

Consentimento: Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 20,0mL de sangue para ser utilizado na pesquisa descrita acima.

Nome do voluntário participante: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do voluntário participante: _____

Nome médico responsável: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do médico responsável: _____

NATÁLIA PESSOA ROCHA

ALUNA DE DOUTORADO – CO-RESPONSÁVEL PELO PROJETO

TEL.: 34092719

Anexo II – Roteiro de Avaliação

Aspectos neuroimunofarmacológicos envolvidos na Doença de Parkinson

ROTEIRO DE AVALIAÇÃO

DATA: ____/____/____

Dados Gerais:

Nome do paciente: _____ Identificação: _____
 Sexo: () F () M Data de Nascimento: ____/____/____
 Estado Civil: _____ Escolaridade (anos): _____
 Altura: _____ cm Massa corporal: _____ Kg
 Profissão: _____ Estado previdenciário: _____
 Tel: _____
 Endereço: _____ Bairro: _____
 Cep: _____ Cidade: _____ Estado: _____
 Co-morbidades: () HAS () Diabetes () Cardiopatia () Hipotireoidismo
 () Outras: _____
 Tabagista: () Não () Sim Cigarros por dia: _____
 Etilista: () Não () Sim Vezes por semana: _____
 Medicamentos em uso: _____

Critérios de exclusão:

Uso atual (últimas quatro semanas) de antibióticos, anti-inflamatórios não esteróides ou corticóides: _____

Presença de doença inflamatória, auto-imune ou processo infeccioso em atividade nas últimas 4 semanas ou neoplasia: _____

Histórico de outras doenças neurodegenerativas ou doenças psiquiátricas: _____

Informações sobre a Doença de Parkinson:

Início dos sintomas: _____ Tempo de diagnóstico: _____

UPDRS: _____

Hoehn e Yahr: _____ Schwab e England: _____

Informações sobre os medicamentos utilizados para a Doença de Parkinson:

Medicamentos em uso para tratamento da Doença de Parkinson: _____

Dose Levodopa: _____

Início do uso de Levodopa: _____

Latência / duração: _____

Efeitos Colaterais: () Sim () Não

() Discinesias () Fenômeno On-Off () Flutuação () Wearing-Off

() Outros: _____

Alteração do sono: () Sim () Não

Quadros psiquiátricos relevantes (alterações comportamentais, alucinações): () Sim () Não

Avaliações complementares:

MEEM: _____

BAF: _____

BDI: _____

PDQ-39: _____

Anexo III - Escala de Avaliação Unificada para a Doença De Parkinson (UPDRS)

I. ATIVIDADE MENTAL, COMPORTAMENTO E HUMOR

1) Deterioração Intelectual

0 = Nenhum.

1 = Leve. Esquecimentos constantes com lembranças parciais de acontecimentos, porém sem outras dificuldades.

2 = Perda moderada da memória com desorientação e dificuldade moderada no manejo de situações problemáticas complexas. Deterioração funcional leve, ainda que evidente no domicílio, com necessidade de ajudas ocasionais.

3 = Perda grave da memória com desorientação temporal e, muitas vezes também espacial. Dificuldade severa para resolver problemas.

4 = Perda grave da memória com preservação da orientação apenas no que diz respeito a pessoas. Incapaz de emitir juízo de valor ou de resolver situações problemáticas. Requer muita ajuda nos cuidados pessoais. Não se pode deixar sozinho.

2) Transtornos de Pensamento (devido à demência ou a toxicidade medicamentosa)

0 = Nenhum.

1 = Pesadelos.

2 = Alucinações “benignas” com conservação da introspecção.

3 = Alucinações ou delírios esporádicos ou frequentes; perda da introspecção; pode ter dificuldades nas atividades cotidianas.

4 = Alucinações persistentes, delírios ou psicose “ativa”. Não é capaz de cuidar de si mesmo.

3) Depressão

0 = Ausente.

1 = Períodos de tristeza ou culpabilidade superiores ao normal, nunca persistindo durante dias ou semanas.

2 = Depressão persistente (uma semana ou mais).

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

4 = Depressão persistente com sintomas vegetativos e pensamentos ou tentativas de suicídio.

4) Motivação / Iniciativa

0 = Normal.

1 = Com menos energia que o habitual, mais passivo.

2 = Perda de iniciativa ou desinteresse em atividades não rotineiras.

3 = Perda de iniciativa ou desinteresse em atividades diárias/rotineiras.

4 = Isolado, sem nenhuma motivação.

II. ATIVIDADES DE VIDA DIÁRIA (ESPECIFICAR ON/OFF)

5) Linguagem falada

0 = Normal.

1 = Levemente afetada. Sem dificuldades para ser compreendido.

2 = Alteração moderada. Em algumas ocasiões é necessário pedir para repetir o que disse.

3 = Alteração grave. Frequentemente é necessário pedir para repetir o que está falando.

4 = Ininteligível na maioria das vezes.

6) Sialorréia

0 = Normal.

1 = Aumento leve da saliva, mas evidente na boca; pode ocorrer baba noturna.

2 = Aumento moderado da saliva; pode ter uma baba mínima.

3 = Aumento marcante de saliva com alguma baba.

4 = Baba marcante que requer uso constante de lenços.

7) Deglutição

0 = Normal.

1 = Engasga raramente.

2 = Engasga de forma esporádica.

3 = Requer alimentos macios.

4 = Requer alimentação por sonda nasogástrica ou gastrostomia.

8) Escrita

0 = Normal.

1 = Ligeiramente lenta ou pequena.

2 = Moderadamente lenta ou pequena. Todas as palavras são legíveis.

3 = Alteração grave, nem todas as palavras são legíveis.

4 = A maioria das palavras são ilegíveis.

9) Corte de alimentos e manejo de talheres

0 = Normal.

1 = Um pouco lento e torpe, mas não precisa de ajuda.

2 = Pode cortar a maioria dos alimentos, ainda que de um modo torpe e lento; precisa de certa ajuda.

3 = Os alimentos devem ser cortados por outra pessoa, porém; pode alimentar-se lentamente.

4 = Necessita que o alimentem.

10) Vestir-se

0 = Normal.

1 = Um pouco lento, apesar de não necessitar de ajuda.

2 = Em algumas ocasiões necessita de ajuda para abotoar e colocar os braços nas mangas.

3 = Requer uma ajuda considerável, porém pode fazer algumas coisas sozinho.

4 = Precisa de ajuda completa.

11) Higiene

0 = Normal.

1 = Um pouco lento, mas não precisa de ajuda.

2 = Precisa de ajuda para se barbear ou tomar banho, ou é muito lento nos cuidados de higiene.

3 = Requer ajuda para lavar-se, escovar os dentes, pentear-se e ir ao banheiro.

4 = Precisa de cateter de Foley e outras medidas mecânicas.

12) Dar a volta na cama ou arrumar os lençóis

0 = Normal.

1 = Um pouco lento e torpe, mas não precisa de ajuda.

2 = Pode dar a volta sozinho ou arrumar os lençóis, ainda que com grande dificuldade.

3 = Pode tentar, mas não dá a volta nem arruma os lençóis sozinho.

4 = Ajuda total.

13) Quedas

0 = Nenhuma.

1 = Quedas infreqüentes.

2 = Quedas ocasionais, menos de uma vez por dia.

3 = Quedas uma vez por dia em média.

4 = Quedas mais de uma vez por dia.

14) Bloqueio/congelamento durante a marcha

0 = Nenhum.

1 = Bloqueio/congelamento pouco freqüente durante a marcha; pode experimentar uma hesitação ao começar a andar (“start-hesitation”).

2 = Bloqueio/congelamento esporádico durante a marcha.

3 = Bloqueio/congelamento freqüente que ocasionalmente levam a quedas.

4 = Quedas freqüentes causadas por bloqueio/congelamento.

15) Marcha

0 = Normal.

1 = Dificuldade leve. Pode não ocorrer balanceio dos braços ou tender a arrastar uma perna.

2 = dificuldade moderada, porém necessita de pouco ou nenhuma ajuda.

3 = Alterações graves da marcha, com necessidade de ajuda.

4 = A marcha é impossível, ainda que com ajuda.

16) Tremor

0 = Ausente.

1 = Leve e pouco freqüente.

2 = Moderado, incômodo para o paciente.

3 = Grave, dificulta muitas atividades.

4 = Marcante, dificulta a maioria das atividades.

17) Moléstias sensitivas relacionadas com o parkinsonismo

0 = Nenhuma.

1 = Em algumas ocasiões, tem edema, formigamento ou dor leve.

2 = Frequentemente tem edema, formigamento ou dor, não preocupantes.

3 = Frequentes sensações dolorosas.

4 = Dor muito intensa.

III. EXPLORAÇÃO MOTORA

18) Linguagem falada

0 = Normal.

1 = Leve perda de expressão, dicção e/ou volume da voz.

2 = Monótona, arrastada, mas compreensível, alteração moderada.

3 = Alteração marcada, difícil de entender.

4 = Dor muito intensa.

19) Expressão facial

0 = Normal.

1 = Hipomímia mínima; poderia ser normal (“cara de jogador de poker”)

2 = Diminuição leve, mas claramente anormal da expressão facial.

3 = Hipomímia moderada; lábios separados em algumas ocasiões.

4 = Face fixa ou em máscara, com perda grave ou total da expressão facial; lábios separados 0,6 cm ou mais.

20) Tremor em repouso

0 = Ausente.

1 = Leve e pouco freqüente.

2 = De pequena amplitude e contínuo ou de amplitude moderada e aparição intermitente.

3 = De amplitude moderada e presente quase continuamente.

4 = De amplitude marcada e presente quase continuamente.

21) Tremor de ação ou postural das mãos

0 = Ausente.

1 = Leve; presente durante a atividade.

2 = De amplitude moderada, presente durante a atividade.

3 = De amplitude moderada, presente ao manter uma postura assim como durante a atividade.

4 = De amplitude marcada, dificulta a alimentação.

22) Rigidez (Avaliada através da mobilização passiva das articulações maiores, com o paciente sentado e relaxado. Não avaliar o fenômeno da roda denteada)

0 = Ausente.

1 = Leve ou só percebida quando ativada por movimentos contralaterais ou outros movimentos.

2 = Leve a moderada.

3 = Marcada, mas permite alcançar facilmente a máxima amplitude de movimento.

4 = Grave, a máxima amplitude do movimento é alcançada com dificuldade.

23) Destreza digital (O paciente bate o polegar contra o indicador rápido sucessivamente com a maior amplitude possível, cada mão separadamente)

0 = Normal.

1 = Ligeiramente lento e/ou redução da amplitude.

2 = Alteração moderada. Fadiga clara e precoce. O movimento pode se deter ocasionalmente.

3 = Alteração grave. Frequentemente indecisão ao iniciar o movimento ou paradas enquanto realiza o movimento.

4 = Apenas pode realizar o exercício.

24) Movimento das mãos (O paciente abre e fecha as mãos rápido e sucessivamente com a maior amplitude possível, cada mão separadamente)

0 = Normal.

1 = Lentidão leve e/ou redução da amplitude.

2 = Alteração moderada. Fadiga clara e precoce. O movimento pode se deter ocasionalmente.

3 = Alteração grave. Freqüente indecisão em iniciar o movimento ou paradas enquanto realiza o movimento.

4 = Apenas realiza o exercício.

25) Movimentos das mãos rápidos e alternantes (Movimentos de pronação-supinação das mãos, vertical ou horizontalmente com a maior amplitude possível e ambas as mãos simultaneamente)

0 = Normal.

1 = Lentidão leve e/ou redução da amplitude.

2 = Alteração moderada. Fadiga clara e precoce. O movimento pode se deter ocasionalmente.

3 = Alteração grave. Freqüente indecisão em iniciar o movimento ou paradas enquanto realiza o movimento.

4 = Apenas realiza o exercício.

26) Agilidade das pernas (O paciente bate o calcanhar contra o solo em sucessão rápida, levantando a perna por completo. A amplitude deveria situar-se em 7 a 8 cm)

0 = Normal.

1 = Lentidão leve e/ou redução da amplitude.

2 = Alteração moderada. Fadiga clara e precoce. O movimento pode se deter ocasionalmente.

3 = Alteração grave. Freqüente indecisão em iniciar o movimento ou paradas enquanto realiza o movimento.

4 = Apenas realiza o exercício.

27) Levantar de uma cadeira (O paciente tenta levantar-se de uma cadeira de madeira ou metal de encosto vertical mantendo os braços cruzados sobre o tórax)

0 = Normal.

1 = Lento ou necessita de mais de uma tentativa.

2 = Levanta-se com apoio nos braços da cadeira.

3 = Tende a cair para trás e pode tentar várias vezes ainda que se levante sem ajuda.

4 = Não pode se levantar sem ajuda.

28) Postura

0 = Erguido normalmente.

1 = Não totalmente erguido, levemente encurvado, pode ser normal em pessoas idosas.

2 = Postura moderadamente encurvada, claramente anormal; pode estar inclinado ligeiramente para um lado.

3 = Postura intensamente encurvada com cifose; pode estar inclinado moderadamente para um lado.

4 = Flexão marcada com extrema alteração postural.

29) Marcha

0 = Normal.

1 = A marcha é lenta, pode arrastar os pés e os passos podem ser curtos, mas não existe propulsão nem festinação.

2 = Caminha com dificuldade, mas necessita pouca ou nenhuma ajuda; pode existir certa festinação, passos curtos ou propulsão.

3 = Grave transtorno da marcha que exige ajuda.

4 = A marcha é impossível, ainda que com ajuda.

30) Estabilidade postural (Observa-se a resposta a um deslocamento súbito para trás, provocado por um empurrão nos ombros, estando o paciente de pé com os olhos abertos e os pés ligeiramente separados. Avisar o paciente previamente)

0 = Normal.

1 = Retropulsão, ainda que se recupera sem ajuda.

2 = Ausência de reflexo postural; poderia ter caído se o avaliador não impedisse.

3 = Muito instável; tendência a perder o equilíbrio espontaneamente.

4 = Incapaz de manter-se de pé sem ajuda.

31) Bradicinesia e hipocinesia (Combinação de lentidão, indecisão, diminuição da oscilação dos braços, redução da amplitude dos movimentos e escassez de movimentos em geral)

0 = Ausente.

1 = Lentidão mínima, dando ao movimento um caráter decidido; poderia ser normal em algumas pessoas. Amplitude possivelmente reduzida.

2 = Grau leve de lentidão e escassez de movimentos, evidentemente anormal. Pode haver diminuição da amplitude.

3 = Lentidão moderada, pobreza de movimentos ou amplitude reduzida dos mesmos.

4 = Lentidão marcada e pobreza de movimentos com amplitude reduzida dos mesmos.

V. ESTÁGIOS DE HOEHN E YAHR

0. Ausência de sinais patológicos.
1. Alteração unilateral.
- 1,5. Alteração unilateral com comprometimento axial.
2. Alteração bilateral, sem déficit de equilíbrio.
- 2,5. Alteração bilateral leve com recuperação na prova do empurrão (deslocamento).
3. Alteração bilateral leve a moderada, certa instabilidade postural, fisicamente independente.
4. Incapacidade grave, ainda capaz de caminhar ou permanecer de pé sem ajuda.
5. Confinado a cama ou cadeira de rodas a não ser que receba ajuda.

VI. ESCALA DE ATIVIDADES DE VIDA DIÁRIA DE SCHWAB E ENGLAND

- 100% Completamente independente. Capaz de realizar todas as atividades sem lentidão, dificuldade ou limitação. Praticamente normal. Não é consciente de nenhuma dificuldade.
- 90% Completamente independente. Capaz de realizar todas as atividades com certo grau de lentidão, dificuldade e limitação. Poderia necessitar um tempo duas vezes superior. Começa a ser consciente de suas limitações.
- 80% Completamente independente na maioria das tarefas. Requer um tempo duas vezes superior. Consciente de sua dificuldade e lentidão.
- 70% Não é completamente independente. Tem mais dificuldade em algumas tarefas. Para certas atividades requer um tempo de três a quatro vezes superior. Deve dedicar uma grande parte do dia às tarefas.
- 60% Certa dependência. Pode realizar a maioria das atividades ainda que muito lentamente e com grande esforço. Erros; algumas tarefas são impossíveis.
- 50% Maior dependência. Necessita de ajuda parcial, mais lento, etc. Dificuldade em todas as tarefas.
- 40% Muito dependente. Colabora na maior parte das atividades, mas realiza poucas sozinho.
- 30% Com esforço, às vezes realiza algumas tarefas sozinho ou as começa sozinho. Precisa de uma grande ajuda.
- 20% Não realiza nenhuma atividade sozinho. Pode ajudar ligeiramente em algumas atividades. Invalidez grave.
- 10% Totalmente dependente, inválido. Não consegue fazer nada.
- 0% As funções vegetativas do tipo deglutição, micção e defecação não se realizam normalmente. Permanece na cama.

Anexo IV – Mini-Exame do Estado Mental (MEEM)

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/____/____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana (1 ponto)()
- Dia do mês (1 ponto)()
- Mês (1 ponto)()
- Ano (1 ponto)()
- Hora aproximada (1 ponto)()
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)()
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)()
- Bairro ou rua próxima (1 ponto)()
- Cidade (1 ponto)()
- Estado (1 ponto)()

MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta()
- Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)()
- (alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

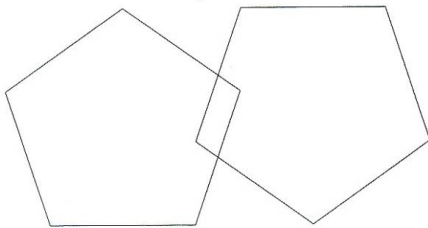
EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)()

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)()
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)()
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão" (3 pts)()
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)()
- Escrever uma frase (1 ponto)()
- Copiar um desenho (1 ponto)()

SCORE: (____/30)



Anexo V – Bateria de Avaliação Frontal

BATERIA DE AVALIAÇÃO FRONTAL (BAF)

Nome:

Prontuário:

Avaliador:

Data da Avaliação:

1) Semelhanças (elaboração de conceitos)	Respostas	Pontuação
Qual é a semelhança entre: - Uma laranja e uma banana? Ajudar o paciente no caso de uma resposta parcial ou nenhuma resposta: “Elas não têm nenhuma semelhança” ou “Elas têm casca” dizendo: “A laranja e a banana são...” Não ajudar o paciente nos itens seguintes. - Uma mesa e uma cadeira? - Uma rosa, uma margarida e uma tulipa? Apenas as respostas referentes às categorias são consideradas corretas (frutas, móveis, flores).	- 3 respostas corretas - 2 respostas corretas - 1 resposta correta - Nenhuma resposta correta	___3 ___2 ___1 ___0
2) Evocação Lexical (flexibilidade mental)	Respostas	Pontuação
“ Diga o maior número possível de palavras, por exemplo animais, plantas, objetos, começando com a letra S. Não diga nome de pessoas e nomes próprios em geral. ” Se o paciente não disser nenhuma palavra nos dez primeiros segundos, dar um exemplo: “serpente”. Se o paciente interromper a seqüência mais de 30 segundos estimula-lo após cada pausa dizendo “Qualquer palavra começando com a letra S.”	- Mais de 9 palavras - De 6 a 9 palavras - De 3 a 5 palavras - Menos de 3 palavras	___3 ___2 ___1 ___0
3) Seqüências motoras (programação)	Respostas	Pontuação
“ Olhe com atenção o que estou fazendo. ” O examinador se assenta em frente do paciente e executa três vezes a seqüência de Luria: “palma-canto-punho”. “ Agora você vai fazer esta seqüência com a mão direita, primeiro ao mesmo tempo que eu e depois sozinho. ” O examinador realiza três vezes a seqüência com a mão esquerda ao mesmo tempo que o paciente e depois lhe pede para continuar sozinho.	- O paciente realiza 6 seqüências corretas. - O paciente faz sozinho pelo menos 3 seqüências consecutivas corretas. - O paciente não é capaz de fazer a seqüência sozinho, mas faz 3 seqüências consecutivas. - O paciente não pode realizar 3 seqüências consecutivas corretas mesmo com o examinador.	___3 ___2 ___1 ___0

2) Evocação Lexical (flexibilidade mental)

Palavras:

4) Instruções geradoras de conflito (sensibilidade à interferência)	Respostas	Pontuação
<p>“Eu bato uma vez e você bate duas vezes.” Para certificar-se que o paciente compreendeu a regra, ele deve realizar uma seqüência de três batidas: 1 – 1 – 1</p> <p>“Eu bato duas vezes e você bate uma vez.” Para certificar-se que o paciente compreendeu a regra, ele deve realizar uma seqüência de três batidas: 2 – 2 – 2</p> <p>A seqüência proposta é a seguinte: 1 – 1 – 2 – 1 – 2 – 2 – 2 – 1 – 1 – 2</p>	<p>- Nenhum erro</p> <p>- 1 ou 2 erros</p> <p>- Mais de 2 erros</p> <p>- O paciente bate o mesmo número de vezes que o examinador pelo menos 4 vezes consecutivas</p>	<p>___3</p> <p>___2</p> <p>___1</p> <p>___0</p>
5) Go-No-Go (controle inibidor)	Respostas	Pontuação
<p>“Eu bato uma vez e você bate uma vez.” Para certificar-se que o paciente compreendeu a regra, ele deve realizar uma seqüência de três batidas: 1 – 1 – 1</p> <p>“Eu bato duas vezes e você não bate”. Para certificar-se que o paciente compreendeu a regra, ele deve realizar uma seqüência de três batidas: 2 – 2 – 2</p> <p>A seqüência proposta é a seguinte: 1 – 1 – 2 – 1 – 2 – 2 – 2 – 1 – 1 – 2</p>	<p>- Nenhum erro</p> <p>- 1 ou 2 erros</p> <p>- Mais de 2 erros</p> <p>- O paciente bate o mesmo número de vezes que o examinador pelo menos 4 vezes consecutivas</p>	<p>___3</p> <p>___2</p> <p>___1</p> <p>___0</p>
6) Comportamento de preensão (autonomia ambiental)	Respostas	Pontuação
<p>O examinador se assenta em frente do paciente. Este deixa as mãos sobre os joelhos com a palma virada para cima. O examinador toca as mãos do paciente e observa a sua reação. Se o paciente segura as mãos do examinador, pedir: “Não segure as minhas mãos.”</p>	<p>- O paciente não segura as mãos do examinador.</p> <p>- O paciente hesita e pergunta o que ele deve fazer.</p> <p>- O paciente segura as mãos sem hesitação.</p> <p>- O paciente segura as mãos mesmo após o pedido para não fazê-lo.</p>	<p>___3</p> <p>___2</p> <p>___1</p> <p>___0</p>

ESCORE:

Anexo VI – Inventário de Depressão de Beck (BDI)

INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK

Nome: _____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve melhor a maneira que você tem se sentido na última semana, incluindo hoje. Se várias afirmações em um grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. Tome o cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.

0. Não me sinto triste.
 1. Eu me sinto triste.
 2. Estou sempre triste e não consigo sair disto.
 3. Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar
-
0. Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro.
 1. Eu me sinto desanimado quanto ao futuro.
 2. Acho que nada tenho a esperar.
 3. Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.
-
0. Não me sinto um fracasso.
 1. Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum.
 2. Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos.
 3. Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.
-
0. Tenho tanto prazer em tudo como antes.
 1. Não sinto mais prazer nas coisas como antes.
 2. Não encontro um prazer real em mais nada.
 3. Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.
-
0. Não me sinto especialmente culpado.
 1. Eu me sinto culpado grande parte do tempo.
 2. Eu me sinto culpado na maior parte do tempo.
 3. Eu me sinto sempre culpado.
-
0. Não acho que esteja sendo punido.
 1. Acho que posso ser punido.
 2. Creio que serei punido.
 3. Acho que estou sendo punido.
-
0. Não me sinto decepcionado comigo mesmo.
 1. Estou decepcionado comigo mesmo.
 2. Estou enjoado de mim.

3. Eu me odeio.

0. Não me sinto, de qualquer modo, pior que os outros.
1. Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros.
2. Eu me culpo sempre por minhas falhas.
3. Eu me odeio.

0. Não tenho qualquer idéia de me matar.
1. Tenho idéias de me matar, mas não as executaria.
2. Gostaria de me matar.
3. Eu me mataria se tivesse oportunidade.

0. Não choro mais do que o habitual.
1. Choro mais agora do que costumava.
2. Agora, choro o tempo todo.
3. Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queira.

0. Não sou mais irritado agora do que já fui.
1. Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava.
2. Atualmente me sinto irritado o tempo todo.
3. Não me irrita mais com as coisas que costumavam me irritar.

0. Não perdi o interesse pelas outras pessoas.
1. Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar.
2. Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas.
3. Perdi todo o meu interesse pelas outras pessoas.

0. Tomo decisões tão bem quanto antes.
1. Adio as tomadas de decisões mais do que costumava.
2. Tenho mais dificuldade em tomar decisões do que antes.
3. Não consigo mais tomar decisões.

0. Não acho que minha aparência esteja pior do que costumava ser.
1. Estou preocupado por estar parecendo velho ou sem atrativos.
2. Acho que há mudanças permanentes na minha aparência que me fazem parecer sem atrativos.
3. Acredito que pareço feio.

0. Posso trabalhar tão bem quanto antes.
1. Preciso de um esforço extra para fazer alguma coisa.
2. Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa.
3. Não consigo mais fazer trabalho algum.

0. Consigo dormir tão bem como o habitual.
1. Não durmo tão bem quanto costumava.
2. Acordo uma a duas horas mais cedo que habitualmente e tenho dificuldade em voltar a dormir.
3. Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir.

0. Não fico mais cansado do que o habitual.
1. Fico cansado com mais facilidade do que costumava.
2. Sinto-me cansado ao fazer qualquer coisa.
3. Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.

0. Meu apetite não está pior do que o habitual.
1. Meu apetite não é tão bom quanto costumava ser.
2. Meu apetite está muito pior agora.
3. Não tenho mais nenhum apetite.

0. Não tenho perdido muito peso, se é que perdi algum recentemente.
1. Perdi mais de dois quilos e meio.
2. Perdi mais de cinco quilos.
3. Perdi mais de sete quilos.

Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim () Não ()

0. Não estou mais preocupado com minha saúde do que o habitual.
1. Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou prisão de ventre.
2. Estou muito preocupado com problemas físico e é difícil pensar em outra coisa.
3. Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.

0. Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo.
1. Estou menos interessado por sexo do que costumava estar.
2. Estou muito menos interessado em sexo atualmente.
3. Perdi completamente o interesse por sexo.

Score: