

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação de Aspectos do Sono, Qualidade de Vida e MicroRNA
na Doença de Parkinson**

Autor: Regina Margis

Orientador: Dr. Carlos Roberto de Mello Rieder

Tese de Doutorado

2010

Agradecimentos

Ao meu orientador, Carlos Rieder, que acreditou nos meus projetos e esteve presente durante toda caminhada.

Aos meus queridos amigos Suzana Schönwald e Günther Gerhardt pelo companheirismo, paciência e dedicação. À amiga Simone, pelo apoio. À Karina, à Iara e ao Valmir, pela ajuda.

Ao meu irmão, Rogério, que desde muito cedo foi um exemplo de pesquisador e pelo constante incentivo e carinho.

À minha irmã por fazer-me acreditar que é possível.

Em especial, aos meus pais, que em todos os momentos me apoiaram e são um exemplo de amor e dedicação. Muito obrigada.

Este estudo é dedicado à minha família;

em especial, aos meus pais.

Glossário de Símbolos e Abreviaturas

AASM -	Academia Americana de Medicina do Sono
AMP -	Adenosina monofosfato
BDNF -	Fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA -	Ácido desoxirribonucléico complementar
COMT -	Catecol-O-metil transferase
D2 -	Receptor de dopamina –tipo 2
DA -	Dopamina
DAT -	Transportador de dopamina
DNA -	Acido desoxiribonucleico
DP -	Doença de Parkinson
EEG -	Eletroencefalograma
GABA -	Ácido gamaaminobutirico
Gpe -	Globo pálido externo
Gpi -	Globo pálido interno
H ₂ O -	Água
Hz -	Hertz
HY -	Escala Hoehn-Yahr
IGF-1 -	Insulin growth factor -1
LCR -	Líquido cefalorraquidiano
MgCl ₂ -	Cloreto de magnesio
miR -	MicroRNA

miRNA	-	MicroRNA
μM	-	Micromolar
μV	-	Microvolt
mM	-	Milimolar
ms	-	Milisegundo
MP	-	Matching pursuit
N1	-	Estágio 1 do sono não-REM
N2	-	Estágio 2 do sono não-REM
N3	-	Estágio 3 do sono não-REM
NREM	-	Não-REM
nt	-	Nucleotídeos
PAC	-	Padrão alternante cíclico
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PDQ-39	-	Questionário da doença de Parkinson – 39 itens
PDSS	-	Escala de sono da doença de Parkinson
qPCR	-	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT-PCR	-	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
REM	-	Movimento rápido de olhos
RISC	-	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	-	Acido ribonucleico
mRNA	-	Acido ribonucleico mensageiro
SED	-	Sonolência excessiva diurna
SF-36	-	Questionário do Estado de Saúde – forma curta
SNC	-	Sistema nervoso central

SNe	-	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNP	-	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SNr	-	Substância negra <i>pars reticular</i>
SPECT	-	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TPPP	-	Proteína promotora da polimerização da tubulina
UPDRS	-	Escala unificada para doença de Parkinson
UTR	-	Região não traduzida
WHOQOL-		Qualidade de vida da Organização Mundial da Saúde

Índice

Resumo	10
Introdução	13
Revisão da Literatura	19
1. Doença de Parkinson	19
1.1. Neurobiologia da Doença de Parkinson	19
1.1.1. Fisiopatologia	19
1.1.2. Achados Anatomopatológicos e Neuroquímicos	21
1.2. Manifestações Clínicas da Doença de Parkinson	28
1.2.1. Sintomas Motores	28
1.2.2. Sintomas Não motores	33
A. Geral	33
B. Sono	36
1.3. Qualidade de Vida e Doença de Parkinson	42

2. Sono	43
2.1. Macroestrutura do Sono	44
2.2. Microestrutura do Sono	46
2.2.1. Fusos do Sono	46
2.2.2. Padrão Alternante Cíclico	51
2.3. Avanço da idade: efeito na macro e microestrutura do sono	54
2.4. Macro e Microestrutura do Sono na Doença de Parkinson	57
3. MicroRNA	59
3.1. MicroRNA: detecção	62
3.2. MicroRNA na Doença de Parkinson	64
Objetivos	67
Referências da Revisão Bibliográfica	68
Capítulos: artigos e relatório de patente de invenção	100
Capítulo 1: Psychometric properties of the Parkinson's Disease Sleep Scale - Brazilian version	100

Capítulo 2: WHOQOL-OLD assessment of quality of life in elderly patients with Parkinson’s disease: influence of sleep and depressive symptoms	121
Capítulo 3: Sleep spindles in <i>de novo</i> Parkinson’s disease	146
Capítulo 4: Polysomnographic Study of Sleep in Untreated Parkinson’s Disease..	161
Capítulo 5: MicroRNA expression analysis in blood: a potential Parkinson’s Disease biomarker	188
Capítulo 6: Relatório descritivo de patente de invenção: método para diagnóstico e monitoramento de alfa-sinucleinopatias pela determinação de níveis de miRNAs em amostras biológicas	219
Considerações Gerais	237
Anexo	241
Anexo I: Escala de sono na doença de Parkinson	242

Resumo

No presente trabalho foram estudados aspectos relacionados ao sono, à qualidade de vida e achados de microRNA nos indivíduos com doença de Parkinson (DP).

Foi realizada a tradução e validação da Escala de Sono na DP (PDSS) para uso no Brasil. A consistência interna foi avaliada pelo alfa de Cronbach apresentando valor igual a 0.82. Todos os itens da versão brasileira da PDSS (PDSS-BR) apresentaram correlação direta estatisticamente significativa com o escore total da escala. A confiabilidade teste-reteste do escore total apresentou valor de 0.94. A PDSS-BR apresentou correlação com o Índice de Qualidade de Sono de Pittsburg (PSQI) e com a Escala de Sonolência de Epworth ($r_s = -0.63$ e $r_s = -0.32$, respectivamente; $p = 0.001$). Os achados psicométricos da PDSS-BR foram satisfatórios e semelhantes aos de estudos previamente desenvolvidos em outros países.

Também foi avaliada a qualidade de vida dos pacientes com DP com o instrumento de Avaliação de Qualidade de Vida em Idosos da Organização Mundial da Saúde (WHOQOL-OLD). Foi constatado que indivíduos com maior gravidade da DP apresentaram pior escore total da WHOQOL-OLD ($r_s = -0.43$; $p \leq 0.001$). Os pacientes com estágios mais avançados apresentam pior índice de qualidade de vida nas facetas de habilidade sensorial e de participação social em comparação com os pacientes em estágio mais leve. Na faceta de habilidade sensorial existe uma

associação com o sono, avaliado pelas escalas PSQI e PDSS-BR ($r_p = -0.46$ e $r_p = 0.41$, respectivamente; $p < 0.001$).

Em relação ao sono na DP também foi realizada análise da estrutura do sono baseado em exames de polissonografia (PSG), tendo sido estudadas duas medidas de microestrutura do sono: densidade dos fusos do sono (FS) e padrão alternante cíclico (PAC). Foi realizada quantificação automática dos FS no estágio N2 do sono não-REM (*rapid eye movement*) de cada indivíduo. Pacientes com DP sem tratamento (ntPD) apresentaram maior densidade de FS que os do grupo controle nas derivações parietais, central esquerda e frontal direita ($p < 0.05$). Diferenças entre pacientes e controles foram constatadas ao analisar tanto fusos lentos (11-13Hz) quanto rápidos (frequência superior a 13 Hz). Na análise do PAC identificou-se aumento da porcentagem do subtipo A3 e redução na duração de todos os subtipos-A do PAC no grupo ntPD em relação aos controles. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na densidade dos FS e no PAC na comparação entre os momentos anterior e posterior ao tratamento com levodopa.

Ainda, visando maior compreensão da DP e identificação de instrumentos que possam ser utilizados como marcadores da doença, foi avaliada a expressão de microRNAs no sangue de pacientes com DP. Foi identificado que os microRNAs: miR-1, miR-16-2*, miR-22*, miR-26a2*, miR-29a and miR-30a apresentaram diferença nos níveis de expressão relativa no sangue dos pacientes com DP. A análise combinada dos níveis de expressão relativa de miR-1, miR-22* and miR-29 permitiu distinguir pacientes com DP, sem tratamento em estágios iniciais da manifestação motora da doença, de indivíduos saudáveis ($p < 0.05$). Enquanto, a análise conjunta

dos níveis de expressão de miR-16-2*, miR-26a2* e miR30a diferenciou pacientes tratados de não-tratados ($p < 0.05$).

Assim, o presente estudo identificou e disponibilizou diferentes medidas que podem colaborar na avaliação de pacientes com DP.

Introdução

A doença de Parkinson é reconhecida como entidade nosológica desde a publicação, em 1817, do estudo de James Parkinson: *An Essay on Shaking Palsy*. É uma doença neurodegenerativa que acomete homens e mulheres de diferentes etnias e classes sociais. Apresenta uma prevalência de 1.8 casos por 100 habitantes com idade superior a 65 anos, número que varia entre 0.6 casos por 100 habitantes com idade entre 65 e 69 anos até 2.6 casos por 100 habitantes entre 85 e 89 anos (De Rijk e col, 2000). No Brasil, um estudo com base populacional identificou a prevalência de 3.3% para doença de Parkinson (DP) em indivíduos com idade acima de 60 anos; sem diferença estatisticamente significativa entre os homens e as mulheres (Barbosa e col, 2006). No estudo brasileiro foi observado que 72% dos indivíduos identificados pelos investigadores como portadores de DP não haviam sido, até então, diagnosticados como tal. Ressalta-se que o diagnóstico de DP está associado a uma mortalidade duas vezes maior do que a da população em geral para a mesma faixa etária (Morgante e col, 2000); desta forma reafirmando a importância do reconhecimento e diagnóstico da DP.

As manifestações clínicas da DP incluem tremor em repouso, rigidez, bradicinesia, perturbações da marcha e da postura (Hughes e col, 1992) Apesar de ser identificada como um distúrbio do movimento, a DP está associada a um amplo espectro de sintomas não-motores (Adler, 2005, Poewe, 2008; Chaudhuri e Naidu,

2008). Os quais consistem, entre outros, em transtornos do sono, sintomas neuropsiquiátricos, autonômicos, gastrointestinais e sensoriais. Muitas das manifestações não-motoras podem ocorrer nos estágios iniciais da doença ou precederem o diagnóstico de DP. Nas últimas décadas, estudos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos disponibilizaram evidências a favor da existência de uma fase pré-motora (Braak e col, 2004; Tolosa e col, 2007) na qual podem ocorrer sintomas como redução do olfato, constipação, transtornos de humor, sonolência excessiva diurna, transtorno comportamental do sono REM (*rapid eye movement*) (Tolosa e col, 2007).

Assim, tem sido demonstrado que os sintomas não-motores podem ocorrer tanto precedendo o diagnóstico, como em fases iniciais ou tardias da DP e exercerem um papel determinante na qualidade de vida do paciente (Schrag e col, 2000a; Kuopio e col, 2000; GPDS Comitee 2002; Carod-Artal e col, 2007; Scalzo e col, 2009). A incapacitação na DP pode resultar de diferentes achados tal como comprometimento motor, manifestações não-motoras (Poewe, 2008; Adler, 2005) e efeitos adversos do tratamento. Apesar do impacto da doença na vida dos indivíduos (Morgante e col, 2000) os sintomas não-motores ainda não são apropriadamente reconhecidos na prática clínica (Barbosa e col, 2006). Estudo desenvolvido nos Estados Unidos da América identificou que nas visitas de rotina a neurologistas, as alterações de sono não eram identificadas pelos neurologistas numa taxa superior a 40% das consultas e que sintomas como depressão, ansiedade e fadiga; acima de 50% (Shulman e col, 2002).

Apesar das limitações em ferramentas diagnósticas para DP, instrumentos para avaliação e quantificação dos sintomas motores e não-motores podem e devem ser utilizados na prática clínica. Considerando os sintomas da DP existem escalas como a Escala Unificada para Doença de Parkinson (UPDRS) e a Escala Hoehn-Yahr (HY); a última permite o estagiamento da doença. Os sintomas não-motores também podem ser quantificados através do uso de escalas. Podem ser utilizados instrumentos padrão e o resultado ser interpretado considerando um ponto de corte corrigido para indivíduos parkinsonianos, como ocorre com o Inventário de Beck para Depressão (Leetjens e col, 2000; Visser e col, 2006; Schrag e col, 2007) ou ser utilizada uma escala específica para DP, como, por exemplo, na avaliação de distúrbio do sono: a Escala de Sono na Doença Parkinson (Chaudhuri e col, 2002).

No que se refere a sintomas não-motores da DP, destaca-se os transtornos do sono; tanto pela elevada frequência de queixas relacionadas ao sono pelos pacientes com DP (Lees e col, 1988; Tandberg e col, 1998), como pela potencial ocorrência destas manifestações em diferentes estágios da doença. As alterações do sono podem ser quantificadas clinicamente por meio de entrevistas, escalas e exames (por exemplo, a polissonografia de noite inteira). Acrescenta-se, o interesse na avaliação do sono de pacientes com DP também se deve a limitações metodológicas de alguns estudos de sono previamente realizados, assim como a ausência de consenso entre as pesquisas quanto à microestrutura do sono no que se refere a fusos de sono (Pucca e col, 1973; Comella e col, 1993; Happe e col, 2004) e a ausência de informações relativas a padrão alternante cíclico na DP. Tanto os fusos do sono como parâmetros

do padrão alternante cíclico (PAC) correspondem a medidas de microestrutura do sono.

A análise dos fusos de sono nessa população de pacientes desperta interesse ao considerar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP e os processos talâmicos relacionados à formação dos fusos (Steriade, 2000; Fuentealba e Steriade, 2005); os quais potencialmente poderiam sofrer interferência relacionada à doença. O PAC está relacionado à interpretação eletroencefalográfica da flutuação do despertar; considerando que uma queixa entre os pacientes com DP consiste em sono fragmentado, passa a ser adequado analisar essa medida nesses indivíduos.

Ainda, no que tange à avaliação desses pacientes, diversos estudos têm quantificado alterações bioquímicas no sangue ou no líquido céfalo-raquidiano (LCR) de indivíduos com DP; assim como, investigado genes ou polimorfismos associados a apresentações da DP e resposta ao tratamento. No entanto, até o momento, o diagnóstico de DP é baseado em critérios do exame clínico (Hughes e col, 1992; Gelb e col, 1999). Atualmente, o diagnóstico definitivo para DP só é possível com confirmação pela necropsia (Gelb e col, 1999).

A ausência de um marcador diagnóstico sérico para esta doença dificulta o adequado diagnóstico da DP. A excelência de um marcador sérico traria, entre outras vantagens, a facilidade para acesso a amostra biológica (sangue) o que permitiria o maior uso na prática clínica, assim como em pesquisas. Este marcador poderia contribuir para o reconhecimento da DP em estágios iniciais – momento no qual o quadro nosológico pode não ser identificado quer pela baixa intensidade dos sintomas ou pela interpretação de “normalidade” de sintomas como tremor e lentidão

em idosos da nossa população. O biomarcador também poderia contribuir na determinação da fisiopatologia e mecanismos de ação de drogas (Rascol, 2009). A busca por um potencial biomarcador da DP tem ocorrido; no entanto, o grande número de fatores que interagem na etiologia da DP, como genes (e os diversos mecanismos relacionados à expressão dos mesmos), determinantes ambientais e processos relacionados ao envelhecimento, dificultam a identificação deste biomarcador. De fato, o estudo de genes em doenças como a DP é um constante desafio para a genômica médica. A análise de microRNAs surge como uma nova ferramenta. É proposto que a maioria dos microRNAs regule a expressão do gene numa etapa pós-transcrição, interferindo na tradução e/ou na estabilidade do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) (Bartel, 2004; Filipowicz e col, 2008). Os microRNAs têm sido identificados como marcadores moleculares em diferentes tipos de câncer e vem sendo estudados em doenças neurodegenerativas (Nelson e cols 2008; Bartels e Tsongalis, 2009; Pauley e cols 2009) podendo ser proposto que os microRNAs possam exercer um papel na DP.

Logo, considerando a prevalência da doença de Parkinson, a elevada frequência de queixas relacionadas ao sono, a potencial incapacitação e redução da qualidade de vida dos indivíduos com DP, o presente trabalho buscou obter informações relativas ao sono e à qualidade de vida nesses pacientes. Também avaliou medidas moleculares relacionadas à ocorrência da doença visando poder contribuir para uma maior compreensão da DP. Nos estudos para análise do sono, inicialmente, foi realizada a tradução e validação da Escala de Sono na Doença de Parkinson (PDSS), permitindo uma análise das propriedades psicométricas da versão

brasileira da PDSS (Artigo1). Em consideração ao fato da DP poder interferir na qualidade de vida dos pacientes e apresentar a sua maior incidência em indivíduos idosos, foi avaliada a qualidade de vida de pacientes com DP, e sua relação com o sono, através do instrumento WHOQOL-OLD (World Health Organization Quality of Life – Old); que consiste numa escala específica para pessoas idosas (Artigo 2). O sono dos pacientes com DP também foi estudado quanto a sua microestrutura, a partir de exames de polissonografia, no que se refere à avaliação dos fusos de sono e do padrão alternante cíclico (Artigo 3 e Artigo 4). Enquanto que o estudo de avaliação de medidas relativas à biologia molecular consistiu na análise de expressão de microRNAs em sangue de pacientes (Artigo 5 e Artigo 6).

Revisão da Literatura

1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa complexa tanto no que se refere à neurobiologia, quanto ao diagnóstico e às manifestações clínicas. A sua etiologia ainda não está estabelecida. Na maioria dos casos é atribuída à interação de diversos fatores, englobando aspectos ambientais e da genética; sendo que a doença de Parkinson com início precoce tem sido relacionada, com maior frequência, a fatores genéticos.

1.1. Neurobiologia da Doença de Parkinson

1.1.1. Fisiopatologia

Rigidez, bradicinesia e tremor em repouso são as principais manifestações motoras da doença de Parkinson idiopática (DP) as quais, classicamente, são associadas a alterações funcionais dos núcleos da base.

De acordo com o modelo de funcionamento, os núcleos da base estão funcionalmente interpostos entre o córtex e o tálamo; a informação cortical é recebida pelos núcleos da base através do estriado. Esta informação é processada e transmitida ao globo pálido segmento interno (GPi) e substância negra *pars* reticular (SNr) que são os núcleos de saída dos núcleos da base. Esta transmissão aos núcleos

de saída pode ocorrer por duas vias: diretamente do estriado aos núcleos de saída (via direta); ou via globo pálido externo (GPe) e núcleos subtalâmicos (via indireta). O GPi e a SNr projetam em direção a núcleos de distribuição talâmicos (núcleo ventral anterior e ventral lateral) os quais projetam para áreas corticais. A ativação da via direta provoca uma desinibição dos neurônios da região alvo dos núcleos da base, enquanto a ativação da via indireta leva a uma inibição destes neurônios (Obeso e col, 2000; Rieder e col, 2004).

Para o entendimento da fisiopatologia da DP convém ressaltar que o estriado além de receber projeções glutamatérgicas excitatórias corticais também recebe projeções dopaminérgicas de neurônios localizados na substância negra *pars compacta* (SNc). Estes neurônios dopaminérgicos exercem um efeito excitatório, através da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1, sobre os neurônios estriatais que dão origem à via direta; e um efeito inibitório, por meio da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D2, que dão origem à via indireta.

A perda de neurônios dopaminérgicos na SNc, inclusões intraneuronais de corpos de Lewy e severa deficiência de dopamina (DA) em caudado, putamen, globo pálido, nucleo acumbens e núcleo subtalâmico são característicos da DP (Hornykiewicz, 1998). Em cérebros normais os níveis de DA em GPe é aproximadamente seis vezes superior ao identificado em GPi. Análise bioquímica em oito cérebros de indivíduos com DP identificou uma perda de dopamina de 82% em GPe e de 51% em GPi; ocorrendo diferentes graus de perda de DA nas diferentes subdivisões do GPe e do GPi – ocorrendo os níveis próximos ao normal em GPi ventral (rostral e caudal) nos indivíduos que apresentavam tremor como sintoma

predominante. Avaliando caudado e putamen, no mesmo estudo, os autores observaram uma perda de DA de 89% e 98%, respectivamente (Rajput e col, 2008). Ressalta-se que na via estriado-GPe além da ação do GABA como neurotransmissor, também ocorre a ação da encefalina que é derivada da pré-proencefalina; cujo nível de mRNA está elevado antes do aparecimento dos sintomas, tendo sido proposto como um possível mecanismo compensatório para reduzir a hiperatividade gabaérgica para o GPe (Bezard e col, 2003).

Em decorrência da perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra há uma redução de entrada de dopamina no estriado. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNc induz a uma cascata de alterações que afeta todos componentes do circuito dos gânglios da base. Os núcleos de saída (GPi e SNr) tornam-se hiperativos. Esta hiperatividade deve-se ao aumento da estimulação glutamatérgica que os núcleos de saída recebem dos núcleos subtalâmicos. Assim, ocorre um aumento da atividade GABAérgica dos núcleos de saída, o que provoca uma inibição do tálamo motor e possivelmente uma redução na sinalização talamocortical. Foi proposto que as manifestações parkinsonianas são resultado de alterações em diferentes níveis cerebrais e que decorrem da falha dos mecanismos compensatórios para estabilizar os núcleos da base (Obeso e col, 2000).

1.1.2. Achados Anatomopatológicos e Neuroquímicos

O achado neuropatológico característico da DP é a presença, na substância negra do mesencéfalo, de corpúsculos de Lewy; os quais têm como maiores

componentes a presença de filamentos que consistem em agregados de proteína, entre elas a alfa-sinucleína. Atualmente, o diagnóstico definitivo para DP só é possível com a confirmação pela necropsia. Os critérios propostos para confirmação histopatológica da DP consistem em redução substancial de células nervosas na substância negra acompanhada de gliose; pelo menos um corpúsculo de Lewy na substância negra ou no *locus ceruleus* (devem ser examinadas pelo menos quatro diferentes seções em cada uma dessas áreas antes de concluir que os corpúsculos de Lewy estão ausentes) e; nenhuma evidência patológica para outra doença que produza parkinsonismo, por exemplo: paralisia supranuclear progressiva, degeneração cortico-gânglio-basal, atrofia de múltiplos sistemas (Gelb e col, 1999).

Segundo Braak e colaboradores, a formação dos corpos de Lewy no cérebro inicia em sítios de indução definidos e avançam numa sequência topográfica previsível (Braak e col, 2004). Foi proposto, baseado em estudos de necropsia, que a DP progride em seis estágios neuropatológicos (Braak e col, 2004; Braak e col, 2006). No estágio 1 é observado o acometimento do núcleo motor dorsal do nervo vago e estruturas olfatórias anteriores. No estágio 2 as lesões no núcleo motor dorsal do nervo vago se intensificam e corpos de inclusão também ocorrem nos núcleos inferior e maior da rafe e porção celular magna, da formação reticular contígua; os corpúsculos de Lewy podem ocorrer pela primeira vez no *locus ceruleus*. Assim, durante os primeiros dois estágios a patologia em sítios não olfatórios está restrita a bulbo e tegmento pontino. No estágio 3 aparecem as manifestações parkinsonianas; nesse estágio o processo se estende e cruza o limite superior do tegmento pontino. Corpúsculos de Lewy ocorrem na SNC; o processo patológico também é visto na

amígdala, núcleo pedunculopontino tegmental colinérgico e núcleo magnocefaloso colinérgico. No estágio 4 é observado franco envolvimento da amígdala e comprometimento do mesocórtex temporal anteromedial. Nos estágios 5 e 6 os pacientes apresentam uma ampla variação de sintomas clínicos relacionados a DP e o processo degenerativo se expande; os corpos de inclusão se estendem ao neocórtex. A progressão da patologia cortical nos estágios de 4 a 6 repete, em ordem reversa, o processo de mielinização (Braak e col, 2004; Braak e col, 2006).

A progressão da DP também foi avaliada por um estudo multicêntrico (*Sydney Multicenter Study of Parkinson's Disease*) no qual os casos responsivos à levodopa foram acompanhados longitudinalmente e os dados publicados em diferentes momentos do seguimento: 3, 5, 10, 15 e 20 anos. Os autores destacaram o achado de que a maioria dos indivíduos que alcançaram o estágio final da doença o fez em idades semelhantes, apesar de diferentes idades de início dos sintomas (Halliday e col, 2008). A descrição da progressão da patologia foi baseada em cérebros que eram enviados para necropsia. Tendo sido identificado na coorte, segundo os autores, três principais fenótipos clínico-patológicos: (1) indivíduos que apresentaram síndrome demencial dominante e doença neocortical severa; (2) casos com início da DP quando mais jovens, os quais apresentaram um curso clínico típico da DP compatível com estagiamento da doença proposto por Braak e cols (2004); (3) indivíduos com DP que apresentaram início de doença mais tardio, menor sobrevida e curso mais complexo da doença. Segundo os autores, os dados encontrados não são compatíveis com o conceito unitário de patogênese dos corpos de Lewy. Descreveram que existia uma proporção dos casos que tinha um grande número de

corpos de Lewy difusos que tanto ocorriam no início da doença clínica ou, rapidamente, infiltravam o cérebro (Halliday e col, 2008).

Em outro estudo, a análise *postmortem* de substância negra identificou aumento do nível de septina-4 com um paralelo aumento de alfa-sinucleína nos indivíduos com DP (Shehadeh e col, 2008). Foi observada a co-agregação de alfa-sinucleína e septina-4 nos corpos de Lewy na substância negra; e que a septina-4, como um componente pré-sináptico e dos corpos de Lewy, é requerida para a supressão da neurotoxicidade da alfa-sinucleína (Ihara e col, 2007).

A alfa-sinucleína é uma proteína que interage com uma variedade de proteínas incluindo as envolvidas na regulação vesicular da transmissão de dopamina (Murphy e col, 2000). Por sua vez, a dopamina tem um papel crítico na formação de agregados de alfa-sinucleína com elevado peso molecular (Kao, 2009). Acúmulo de alfa-sinucleína pode interferir na solubilidade e distribuição de alfa-tubulina provocando disfunção neuronal. Superexpressão de alfa-sinucleína compromete o tráfego dependente de microtúbulo (Lee e col, 2006) e, na sua forma agregada, está relacionada à patogênese da DP. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a proteína promotora da polimerização da tubulina (TPPP/p25) interage com sistema tubulina/microtúbulo. De fato, o principal alvo de TPPP/p25 é tubulina/microtúbulo (Hlavanda e col, 2002). O acúmulo anormal de TPPP/p25 tem sido associado com agregados de alfa-sinucleína; sendo proposto que a regulação de TPPP/p25 pode ser um marcador específico para condições patológicas associadas à abundante agregação de alfa-sinucleína, tal como é observado na DP (Kovács e col, 2004; Kovács e col, 2007).

A co-agregação alfa-sinucleína/tubulina parece preceder a degeneração neurítica (Lee e col, 2006). O microtubulo é um alvo comum para toxinas da DP e parkina (Feng, 2006). A parkina é uma proteína-ubiquitina E3 ligase que ubiquitina α e β tubulina e acelera sua degradação pelo 26s proteossoma. Esse efeito está abolido nas mutações de parkina associadas à DP (Ren e col, 2003). Acúmulo de alfa-sinucleína interfere com parkina e com a solubilidade e distribuição de α -tubulina, provocando alterações de citoesqueleto e disfunções neuronais. A superexpressão de alfa-sinucleína reduz α -tubulina ubiquitinada e isso poderia provocar o acúmulo de α -tubulina insolúvel. A parkina protege neurônios dopaminérgicos contra toxinas despolimerizantes de microtubulos através da atenuação da ativação da proteína-cinase associada a microtubulo (Ren e col, 2009). A despolimerização do microtubulo desencadeia rápida degradação de tubulina. Ressalta-se que a despolimerização do microtubulo exerce maior toxicidade em neurônios dopaminérgicos que nos não-dopaminérgicos. Neurônios dopaminérgicos têm longos axônios que se projetam ao estriado; estima-se que uma alta porcentagem do volume celular seja constituído por axônio o qual possui grande quantidade de microtubulos, os quais são polímeros de tubulina α/β . O comprometimento do transporte baseado em microtubulo provoca aumentado acúmulo de vesículas no corpo celular e elevadas concentrações citosólicas de dopamina provindas de vesículas. Isso promove aumento do estresse oxidativo e da morte celular decorrente da oxidação de dopamina (Ren, 2005).

Ainda em relação à DA, a recaptção de DA pelo transportador de DA (DAT) é um importante mecanismo de sinalização da terminação dopaminérgica no cérebro.

No sistema nervoso central de mamíferos o DAT é expresso em neurônios dopaminérgicos (Sorkina e col, 2005). A alfa-sinucleína está envolvida na função do DAT por regular a modulação de dopamina sináptica (Shindu e col, 2004). A partir da análise de sangue periférico foi constatado que os pacientes com DP apresentavam expressão aumentada de receptores de dopamina em linfócitos (Barbantini e col 1999) e do CLTB - gene que codifica uma isoforma de clathrina (Scherzer e col, 2007). Ressalta-se que a clathrina está relacionada à internalização de receptores D2 de dopamina (Paspalas e cols, 2006).

Ainda, no que diz respeito aos achados neuroquímicos relacionados à fisiopatologia da DP, acrescenta-se que os receptores de adenosina A2a funcionalmente se opõem as ações dos receptores de dopamina D2 nos neurônios GABAérgicos do estriado. Foi identificado que a adenosina estimula neurônios na via indireta através de receptores de adenosina A2a localizados no estriado e globo pálido externo (Xu et al, 2005). Receptores A2a também foram identificados como associados a receptores metabotrópicos de glutamato mGlu5. O achado que a ativação motora induzida por antagonista mGlu5 necessita de receptores A2a e D2 reforçou o conceito de interdependência destes três receptores na modulação do funcionamento motor. Destaca-se ainda, relacionado ao papel da adenosina na DP, que foi identificado aumento da atividade de adenosina deaminase nos linfócitos de pacientes com DP em uso de antiparkinsonianos em relação a indivíduos controle (Chiba e col, 1995).

Considerando os diferentes processos implicados na fisiopatologia da DP, também fatores neurotróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

(BDNF) apresenta expressão alterada nestes pacientes. Estudos *in vitro* demonstraram que o BDNF promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e os protege de danos provocados por toxinas (Murer e col, 2001). O BDNF é um inibidor da morte celular mediada por apoptose e de neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por neurotoxina. Foi observado em estudo com a rotenona, a qual é utilizada em pesquisas com modelos animais de DP, que os fatores neurotróficos tal como fator de crescimento neural (NGF), BDNF, fator neurotrófico derivado da glia protegem contra toxicidade seletiva da rotenona em neurônios dopaminérgicos através da ativação da via MAP cinase e estabilização do microtubulo (Jiang e col, 2006a).

Indivíduos com DP, em relação a controles, apresentam reduzida expressão de BDNF na substância negra (Parain e col, 1999; Mogi e col, 1999) e níveis aumentados no LCR (Salehi e col, 2009). Essa elevação observada em LCR pode ser causada por aumento da produção nas células gliais resultante do dano cerebral (Knott e col, 2002). Em condições fisiológicas, os neurônios apresentam o principal papel na síntese do BDNF, enquanto que em situações de dano cerebral as células da glia produzem BDNF. Foi proposto que essa produção de BDNF pelas células da glia nos pacientes com DP poderia representar uma resposta ativa à neurodegeneração (Salehi e col, 2009). Também deve ser considerado o efeito do avanço da idade na habilidade do BDNF em proteger a atividade neuronal. Estudos com modelos animais demonstraram que elevada expressão de BDNF após dano estriatal pode ser benéfico a neurônios dopaminérgicos, entretanto essas mudanças na expressão de BDNF podem ser perdidas com a idade (Collier e col, 2005; Batchelor e col, 1999).

E foi proposto que a perda de regulação do BDNF pode estar relacionada à ocorrência de doenças neurodegenerativas. Acrescenta-se que as alterações nos níveis de neurotrofinas como BDNF também foram identificadas em indivíduos com transtornos de humor como o transtorno afetivo bipolar (Oliveira e col, 2009).

Diferentes doenças neurodegenerativas também apresentam alteração nos níveis séricos e cerebrais de IGF-1 (Insulin-like-growth factor-1) (Busiguina e col, 2000). Tuncel e colaboradores (2009) informaram que os níveis de IGF-1 no sangue estavam aumentados em pacientes com DP tratados em comparação a indivíduos controle; dados que não atingiram significância estatística. O IGF-1 está relacionado à preservação e homeostase do sistema nervoso e receptores de IGF-1 foram identificados na substância negra (De Keyser e col, 1994). Estudo *in vitro* demonstrou que o IGF-1 protege as células neuronais da toxicidade induzida por dopamina (Offen e col, 2001). E que a ativação da via de IGF-1 pode proteger a toxicidade da alfa-sinucleína e suprimir sua agregação através da ativação da via PI3K/Akt (Kao e col, 2009).

1.2. Manifestações Clínicas da Doença de Parkinson

1.2.1. Sintomas Motores

A doença de Parkinson tem um progressivo padrão de manifestações motoras que iniciam de forma insidiosa. Os sintomas motores cardinais da DP são: acinesia e bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade postural.

A acinesia é definida como redução da quantidade de movimento, com limitação para iniciar e executar atos motores voluntários e automáticos na ausência de paralisia. Bradicinesia significa lentidão na execução do movimento. A bradicinesia/acinesia pode ser observada em diferentes exemplos, como: redução do movimento pendular dos braços durante a deambulação, dificuldade de manter um movimento repetitivo (como abrir e fechar as mãos ocorrendo uma tendência do movimento reduzir e esgotar), mímica facial menos expressiva, redução da expressão gestual, redução da movimentação em diversas tarefas, micrografia. A acinesia súbita, ou congelamento, que consiste numa hesitação no início da marcha ou frenação súbita dos movimentos dos membros inferiores (podendo provocar quedas). Outra manifestação motora relacionada à acinesia é a festinação.

O tremor característico da DP é um tremor distal observado em repouso com frequência de 3 a 6 Hz. O tremor torna-se mais evidente quando a mão está em repouso durante situações de estresse. No entanto, pacientes com DP também podem apresentar tremor de ação. No início da doença o tremor ocorre em um lado do corpo e assim permanece por um período variável de tempo; após também acomete o outro lado do corpo. Outra manifestação é a rigidez muscular. O paciente sente-se rígido e com pouca mobilidade. Há acometimento, principalmente, da musculatura flexora podendo provocar alterações típicas da postura. A instabilidade postural é outra manifestação observada nesses pacientes. Há uma perda da readaptação postural com a evolução da doença; podendo ocorrer quedas.

As características clínicas da DP e a sua progressão são muito variáveis para cada paciente. Existem diferentes propostas para os critérios a serem considerados no

diagnóstico clínico da DP. Os critérios propostos pelo Banco de Cérebros de Londres (Hughes e col, 1992) têm sido utilizados e consistem em três etapas. Na primeira etapa é avaliada a presença de sintomas compatíveis com a síndrome parkinsoniana, na qual é necessária a presença de bradicinesia associada ao menos a uma das seguintes manifestações: rigidez muscular, tremor de repouso, instabilidade postural. Numa segunda etapa são considerados os critérios de exclusão para a DP, ou seja, o indivíduo não pode apresentar: história de acidentes vasculares encefálicos de repetição com progressão em degraus de sintomas, história de traumas cranianos repetidos, antecedente comprovado de encefalite, crises oculógiras, uso de neuroléptico desde o início dos sintomas da doença, mais que um caso de acometimento familiar, remissão prolongada de sintomas, persistência de acometimento unilateral após três anos, paralisia ocular supranuclear, sinais cerebelares, acometimento autonômico precoce e acentuado, demência em fases iniciais da doença, sinais piramidais, presença de lesões expansivas intra-cranianas (tumores, hidrocefalia à neuroimagem), exposição ao MPTP, má-resposta terapêutica a altas doses de levodopa. Na terceira etapa estão os critérios denominados como de sustentação para o diagnóstico da DP, sendo necessário três ou mais dos seguintes: início unilateral, acometimento assimétrico; doença progressiva; assimetria persistente afetando principalmente o lado de início da doença; resposta excelente à levodopa (melhora de 70 a 100%); resposta à levodopa por cinco anos ou mais; discinesia induzida pela terapia com levodopa; evolução clínica igual ou superior a dez anos.

As manifestações motoras podem ser avaliadas e quantificadas com a utilização de escalas como a Escala Unificada para Doença de Parkinson (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) (Fahn e col, 1987; MDS Society Task Force, 2003) assim como ser feito o estagiamento da DP utilizando a Escala de Hoehn-Yahr (HY) (Hoehn e Yahr, 1967; Goetz, 2004).

Os pacientes que desenvolvem os sintomas da doença de Parkinson antes dos quarenta anos de idade são identificados como tendo DP de início precoce (Giovanini e col, 1991). Foi descrito que os pacientes com início precoce apresentam predomínio de rigidez e bradicinesia, apresentam significativa resposta a baixas doses de levodopa, mas precocemente apresentam efeitos colaterais motores (Giovanini e col, 1991) como discinesias (Arevalo e col, 1997). Flutuações motoras são mais comuns nos pacientes com início precoce que em indivíduos com início mais tardio da doença.

Existe uma heterogeneidade na manifestação dos sintomas da DP, podendo ser observado subtipos de apresentação clínica como citado a seguir (Lewis e col, 2005): com, ou sem, predominância de tremor, quadro com rápida progressão da doença e início precoce dos sintomas de DP. Considerando a subdivisão dos pacientes de acordo com a manifestação clínica como (1) com predominância de tremor, (2) com predominância de sintoma rígido-acinético ou (3) com apresentação mista (quando não é observada a predominância entre as manifestações dos dois primeiros subtipos) foi constatado, a partir de estudo de seguimento clínico longitudinal (1968-2006) e estudo de necropsia, que o curso da doença era mais

favorável no subgrupo com predominância de tremor. A idade de início era menor e a progressão da doença mais lenta nesse subgrupo (Rajput e col, 2009).

Diversas abordagens já foram propostas, e continuam sendo desenvolvidas, para o tratamento dos sintomas motores da DP: como orientações educativas, exercícios, medicamentos (agonistas dopaminérgicos ergolínicos e não ergolínicos, inibidores da monoaminoxidase B, anticolinérgicos, amantadina, levodopa e associações com inibidores da catecol-O-metil-transferase) (Olanow e col, 2001), cirurgia (palidotomia, talamotomia), estimulação cerebral profunda em núcleo subtalâmico (Herzog e col, 2003) ou GPi entre outras. Revisão sobre as estratégias e indicações terapêuticas está além do escopo desse trabalho. No entanto, deve-se ressaltar que a levodopa tem sido utilizada desde a década de 1960 e permanece sendo considerada uma droga eficaz no tratamento da DP (Olanow e col, 2001). Nos estágios iniciais da doença a levodopa propicia a melhora da maioria, se não de todos, os sintomas (Lewis e col, 2003). Ela atua como precursora da dopamina. A levodopa é rapidamente absorvida pelo intestino, tendo uma meia-vida de 1 a 2 horas. No sangue periférico a levodopa é metabolizada pela dopa-descarboxilase convertendo-se em dopamina e pela catecol-O-metil-transferase convertendo-se em 3-O-metil dopa. No tratamento com a levodopa é rotineiramente associado o uso de inibidores periféricos da dopa-descarboxilase, com intuito de aumentar a concentração da droga no sistema nervoso central.

1.2.2. Sintomas Não-motores

A. Geral

A partir dos achados descritos por Braak e colaboradores (2004) foi destacado o envolvimento de diferentes estruturas cerebrais, além dos núcleos da base, na fisiopatologia da DP o que auxilia a compreender as diferentes manifestações não-motoras. De fato, a DP apresenta um amplo espectro de sintomas não-motores (Adler, 2005; Poewe, 2008; Chaudhuri e Naidu, 2008) os quais consistem, entre outros, em transtornos do sono, sintomas neuropsiquiátricos, autonômicos, gastrointestinais e sensoriais. Na tabela 1 são citadas diferentes manifestações não-motoras que podem ocorrer na DP (Adler, 2005; Ziemssen e Reichmann, 2007; Tolosa e col, 2007; Poewe, 2008; Chaudhuri e Naidu, 2008).

As disfunções não-motoras podem ocorrer em qualquer estágio da doença. A partir de estudos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos foi demonstrada a existência de uma fase pré-motora (Chaudhuri e col, 2006; Tolosa e col, 2007) na qual podem ocorrer sintomas como redução do olfato (Ziemssen e Reichmann, 2007), constipação, transtornos do sono (Schenck e Mahowald, 2002) e do humor (Leetjens e col, 2003; Tolosa e col, 2007).

Tabela 1: Manifestações não-motoras da Doença de Parkinson

Transtornos do Sono

Sonolência excessiva diurna
Sonhos vívidos
Insônia
Transtorno respiratório no sono
Sono REM sem atonia
Transtorno comportamental do sono REM
Síndrome de pernas inquietas
Movimento periódico de membros

Sintomas Neuropsiquiátricos

Depressão
Ansiedade
Apatia
Anedonia
Desatenção
Alucinações, ilusões
Delírios
Demência
Delirium
Sintomas obsessivos *
Comportamentos compulsivos*
Confusão
Disfunção sexual (hipersexualidade*)

Sintomas Sensoriais

Dor
Alteração do olfato

Sintomas Gastrintestinais

Sialorréia
Disfagia
Refluxo gastro-esofágico
Retardo no esvaziamento gástrico
Náuseas, vômitos
Constipação
Incontinência fecal

Sintomas Autonômicos

Tontura
Hipotensão ortostática
Distúrbios vesicais
Xeroftalmia
Hiperhidrose

Outros sintomas

Seborrea
Alteração de peso

*geralmente induzido por droga

Os sintomas depressivos e as alterações do sono afetam, respectivamente, em torno de 45% (Cummings, 1992) e 60% (Tandberg e col, 1998) dos pacientes com DP. Essas taxas apresentam variação entre os diferentes estudos, de acordo com as características da população investigada, sintomas, ou manifestação não-motora, que está sendo avaliada; tanto no que tange a critérios diagnósticos, como instrumentos e escalas utilizadas (Burn, 2002).

Os sintomas depressivos em indivíduos com DP podem ser compreendidos, em determinados pacientes, como uma reação ao diagnóstico de doença crônica debilitante; no entanto é inegável que os diversos mecanismos neuroquímicos envolvidos na DP exerçam um papel na ocorrência de depressão; como as deficiências de neurotransmissores no sistema monoaminérgico mesocortical, nas projeções dopaminérgicas mesocorticolímbicas e nas projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas mesocorticais (Poewe, 2008). Acrescenta-se que tais sintomas depressivos podem ocorrer anos antes do diagnóstico de DP ser estabelecido; especialmente nos três anos que antecedem o diagnóstico há aumento na incidência de depressão (Leentjens e col, 2003).

Queixas de cansaço, redução de energia, lentificação psicomotora, dificuldade de concentração, redução de apetite e insônia, podem ocorrer tanto no episódio depressivo como na DP (Leentjens, 2004; Weintraub e Stern, 2005; Lemke, 2008) e isso, por vezes, pode dificultar o reconhecimento destes sintomas como pertencentes a um transtorno de humor. Acrescenta-se, que os indivíduos com DP diferem de outros pacientes com episódio depressivo, pois na DP os pensamentos de culpa, auto-

acusação e tentativas de suicídio são menos prevalentes (Cummings, 1992; Lemke, 2008). A depressão, como manifestação não-motora da DP, foi nesse texto destacada devido a prevalência de tais sintomas e a necessidade de reconhecimento dos mesmos para adequado tratamento. A presença de depressão nesses pacientes está associada a pior qualidade de vida (Kuopio e col, 2000; Schrag e col, 2000a), mais rápida progressão do comprometimento motor e incapacitação relacionada a doença (Burn, 2002). Logo, a identificação de sintomas depressivos é de crucial importância tanto na prática clínica - para melhor cuidado do paciente - assim como, para controlar tal fator quando da realização de pesquisas científicas e para a utilização adequada dos instrumentos de avaliação (Visser e col, 2006; McDonald e col, 2006; Schrag e col, 2007).

B. Sono

Estudo que avaliou diferentes quadros neurodegenerativos identificou que o transtorno comportamental do sono REM, que se caracteriza por comportamento anormal emergindo durante o sono REM causando dano ou interrupção do sono associada a perda da atonia do sono REM (American Academy of Sleep Medicine, 2005), ocorre com maior frequência nas alfa-sinucleinopatias (como doença de Parkinson, atrofia de múltiplos sistemas e demência de corpos de Lewy) comparado a outros quadros degenerativos (Boeve e col, 2001). É descrita a coexistência de transtorno comportamental do sono REM com transtornos parkinsonianos; e, por vezes, o transtorno do sono pode ser a manifestação inicial da DP (Schenck e Mahowald, 2002).

Queixas relacionadas ao sono ocorrem em 60% (Tandberg e col, 1998; Karlsen e col, 1999) a 98% (Lees e col, 1988) dos pacientes com DP. Existem diferentes estruturas e neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia da DP que potencialmente podem alterar a estrutura do sono. A degeneração de centros de regulação central do sono no tronco cerebral e nas vias tálamo-corticais tem sido estudada quanto a sua relação na fisiopatologia das alterações do sono na DP.

A degeneração de neurônios dopaminérgicos, no sistema nervoso central, afeta os centros regulatórios do sono. Neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo possuem conexões com estriado e tálamo (Stenberg, 2007). Acredita-se que esses neurônios modulem a excitabilidade tálamo-cortical, a qual influencia o ciclo sono-vigília. A ação glutamatérgica em circuito gânglio basal também repercute no ciclo sono-vigília. A degeneração de áreas como o núcleo da rafe e *locus ceruleus*, que correspondem aos estágios pré-clínicos 1-2 do estagiamento proposto por Braak (2004), parecem exercer um papel no alerta talamocortical e no ciclo sono-vigília; tendo sido proposto que a sua degeneração poderia comprometer a arquitetura do sono. O *locus ceruleus* pela ação da noradrenalina apresenta papel na regulação do sono REM (Stenberg, 2007). A área peri-*locus ceruleus* tem sido relacionada à função de inibição dos motoneurônios espinais (via núcleo magnocefaloso); assim a perda desta função pode estar envolvida à perda da atonia do sono REM, a qual é observada no transtorno comportamental do sono REM. Os núcleos pedunculopontino e retro-rubral têm forte influência na atonia do sono REM e têm sido implicados na patogênese do transtorno comportamental do sono REM (Rye, 2004; Mahowald e Schenck, 2005).

Apesar da possibilidade dos mecanismos associados a fisiopatologia da DP contribuírem para a ocorrência de alterações do sono nesses pacientes, deve-se também considerar o papel da interferência dos sintomas relacionados à doença (como alteração motora, dificuldade urinária, insônia, manifestações neuropsiquiátricas) e das medicações utilizadas (Stocchi e col, 1998; Chaudhuri e col, 2006; Chaudhuri e Schapira, 2009). Assim, as alterações do sono noturno relacionadas à DP podem ser agrupadas como, por exemplo: alteração motora (acinesia ou dificuldade de se mover na cama, síndrome de pernas inquietas e movimentos periódicos dos membros); alteração urinária (noctúria, noctúria com hipotensão postural secundária); insônia (fragmentação do sono, dificuldade de manutenção do sono; insônia inicial); parassonias e problemas neuropsiquiátricos (vocalizações noturnas, sonambulismo, transtorno comportamental do sono REM, sonhos vívidos, pesadelos, depressão). Da mesma forma, as manifestações do sono podem estar vinculadas ao tratamento: sintomas motores relacionados ao tratamento (tremor relacionado a período-*off* noturno, distonia, discinesias, câimbras musculares, parestesias, dor relacionadas ao período-*off*); sintomas urinários relacionados ao tratamento (incontinência urinária relacionada a período-*off*); medicações que alteram o sono.

O sono noturno nos pacientes com DP geralmente tem baixa eficiência (Shpirer e col, 2006) e tende a ser fragmentado com despertares frequentes e prolongados (Pappert e col, 1999; Comella, 2003). Logo, é permitido o questionamento dos mecanismos subjacentes, na arquitetura do sono, potencialmente envolvidos na fragmentação do sono e na flutuação do despertar. Na avaliação

clínica observa-se que a baixa eficiência do sono pode provocar sonolência excessiva diurna, fadiga, alterações do humor e comprometer a capacidade cognitiva do indivíduo.

A prevalência da sonolência excessiva diurna (SED) varia entre os estudos de acordo com a população estudada e o critério utilizado para avaliação, sendo identificado taxas de 15.5% (Tandberg e col, 1999) nos pacientes com DP em relação a 1% em indivíduos controle até índices de 51% nos pacientes com DP (Hobson e col, 2002; Monaca e col, 2006). Foi descrito a ocorrência de SED ocorrendo com mais frequência em indivíduos com DP em vigência de tratamento que no grupo controle (Brodsky e col, 2003; Shpirer e col, 2006). A SED pode decorrer do avanço da doença, fragmentação do sono noturno (como descrito acima), insônia (Dauvilliers e col, 2007), parassonia, depressão e também resultar do efeito de fármacos (Kumar e col, 2002; Hobson e col, 2002) (por exemplo: medicação dopaminérgica ou ansiolítica); no entanto, não há um consenso quanto a contribuição desses diversos fatores (Arnulf e col, 2002). A identificação e o controle da sonolência excessiva diurna nos pacientes devem ocorrer, entre outros motivos, por que a SED pode provocar aumento do risco de quedas e acidentes, comprometimento da atenção (Monaca e col, 2006); além de reduzir a interação social. Ainda, entre as alterações do sono identificadas nesses pacientes, deve-se poder avaliar a ocorrência de transtorno de movimento periódico de membros (Wetter e col, 2000) e apnea do sono (Arnulf e col, 2002; Diederich e col, 2005; Shpirer e col, 2006). A apnea do sono pode coexistir nesses pacientes com outros transtornos do sono como transtorno

comportamental do sono REM, síndrome de pernas inquietas e movimentos periódicos dos membros (Arnulf e col, 2002).

Frente aos diferentes aspectos ressaltados acima é evidente a necessidade de adequada avaliação do sono nos pacientes com DP. Isso pode ser feito utilizando a polissonografia que é atualmente aceita como o padrão ouro para avaliação fisiológica do sono (aspectos relacionados à polissonografia - macroestrutura e microestrutura do sono - serão abordados na seção 2, abaixo), como pela utilização de questionários e escalas.

Entre as escalas que avaliam a doença de Parkinson as questões relacionadas ao sono são mínimas; por exemplo, a escala *UPDRS* tem apenas uma questão que avalia a presença ou a ausência de alteração do sono. Entre as escalas específicas para avaliação das alterações do sono, apesar de amplamente utilizadas como a Escala de Sonolência de Epworth (Johns, 1991) e o Índice de Qualidade de Sono de Pittsburg (Buysse e col, 1989) existe a limitação de não considerarem as alterações relacionadas às manifestações da DP que, por si, interferem no sono como destacado previamente.

Nesse contexto, tem sido proposto o uso da Escala de Sono na Doença de Parkinson (*Parkinson's disease sleep scale – PDSS*) (Chaudhuri e col, 2002). A PDSS foi desenvolvida e validada na Inglaterra, já tendo sido traduzida para diferentes idiomas (Martinez-Martin e col, 2004; Suzuki e col, 2007; Wang e col, 2008a).

A PDSS é uma escala composta por quinze itens, a ser preenchida pelo próprio paciente, que permite identificar vários tipos de manifestações noturnas que possam interferir no sono (Chaudhuri e col, 2002; Chaudhuri e Martinez-Martin, 2004), considerando os sete dias anteriores. A pontuação em cada item varia entre zero (sintoma grave ou sempre vivenciado) e dez (sem o sintoma). A pontuação máxima da escala é 150 (paciente livre de sintomas). A escala visa avaliar manifestações como insônia, sintomas motores noturnos, inquietude, distonia, dor, câimbra, sintomas neuropsiquiátricos, nocturia, percepção de sono reparador e sonolência durante o dia. A Escala de Sono da Doença de Parkinson na sua versão Brasileira está apresentada no anexo 1.

Estudo comparando indivíduos com DP sem tratamento, pacientes com DP em estágio avançado e grupo controle utilizando a PDSS e polissonografia confirmou os achados de comprometimento do sono nos indivíduos com DP em relação aos controles e tais alterações foram identificadas no grupo sem medicação. De fato, problemas específicos como câimbras noturnas, nocturia, distonia, tremor e sonolência diurna distinguiu os pacientes (do subgrupo sem tratamento) em relação ao grupo controle (Dhawan e col 2006).

Tais achados reafirmam que aspectos relacionados ao sono devem ser investigados nesses pacientes mesmo nos estágios iniciais da doença, sendo controlados ao longo do acompanhamento clínico.

1.3. Qualidade de Vida e Doença de Parkinson

Diferentes fatores associados à DP podem interferir na qualidade de vida. De fato, estudos têm demonstrado que sintomas motores da DP (Chrischilles e col, 1998; Schestatsky e col, 2006; Carod-Artal e col, 2007; Hirayama e col, 2008; Rahman e col, 2008) como instabilidade postural, dificuldade na marcha (Schrag e Quinn, 2000), discinesias e flutuações motoras (Carod-Artal e col, 2007) podem ser preditores de qualidade de vida relacionados à saúde. Previamente, nosso grupo avaliou a qualidade de vida de pacientes com DP, através do instrumento de avaliação de qualidade de vida da Organização Mundial da Saúde identificado como WHOQOL-BREF (World Health Organization Quality of Life), e observou uma correlação inversa entre o domínio psicológico da escala e a duração da doença assim como entre o domínio social e severidade da DP (Schestatsky e col, 2006). Em outro estudo, através do instrumento WHOQOL-100 foi constatado que o comprometimento dos níveis de independência e capacidade física estava associado a uma pior qualidade de vida nos pacientes com DP (Valeikiene e col, 2008).

Também foi demonstrado, em estudos prévios, o papel determinante do transtorno de humor (Carod-Artal e col, 2007; Schrag e col; 2000; Kuopio e col 2000; The Global Parkinson's Disease Survey Steering Comitee, 2002; Scalzo e col, 2009) e da disfunção cognitiva (Schrag e col, 2000) na qualidade de vida. Assim, utilizando diferentes instrumentos de avaliação como SF-36 (Questionário do Estado de Saúde – forma curta) (Kuopio e col, 2000) e PDQ-39 (Questionário da Doença de Parkinson – 39 itens) (Schrag e col; 2000; Souza e col, 2007; Carod-Artal e col,

2007; Rahman e col, 2008; Scalzo e col, 2009) foi evidenciada a influência da depressão na qualidade de vida. Da mesma forma, foi destacada pelos diversos autores a necessidade do adequado reconhecimento e tratamento da depressão; assim como da avaliação de diferentes determinantes da qualidade de vida.

Sabe-se que diversos são os fatores que interagem na qualidade de vida de cada indivíduo; tanto no que se refere a situações do presente como do passado, doenças, expectativas e percepções. As necessidades e valores atribuídos aos diversos aspectos da vida podem ser modificados com o envelhecimento e merecem ser considerados quando da avaliação da qualidade de vida, tanto que a Organização Mundial Saúde desenvolveu um instrumento de avaliação de qualidade de vida em idosos identificado pela sigla WHOQOL-OLD (Power e col, 2005). Logo, uma vez que a população de pacientes com DP é constituída por um grande número de indivíduos com idade superior a sessenta anos a possibilidade de utilização do instrumento específico para essa faixa etária como a WHOQOL-OLD (Power e col, 2005; Fleck e col, 2006) deve poder ser considerada na avaliação da qualidade de vida nos pacientes idosos com DP.

2.Sono

O sono consiste num estado ativo e complexo envolvido com diferentes fenômenos comportamentais, eletrofisiológicos e bioquímicos (Tononi e Cirelli, 2006; Stenberg, 2007).

2.1. Macroestrutura do Sono

Em 1968, foi desenvolvido e publicado, sob a direção de Allan Rechtschaffen e Anthony Kales, pela primeira vez, um manual padronizado de escoreamento para sono normal e estes parâmetros foram aplicados até recentemente.

No ano de 2007, a Academia Americana de Medicina do Sono (American Academy Sleep Medicine, AASM) publicou o Manual de Escoreamento do Sono (Iber e col, 2007), o qual tem sido utilizado atualmente. A classificação dos estágios do sono é baseada em achados da polissonografia a partir de informações da atividade cerebral (através do eletroencefalograma), do movimento ocular (registrado pelo eletrooculograma) e do tônus muscular (avaliada pelo eletromiograma).

Segundo o Manual de Escoreamento do Sono da Academia Americana de Medicina do Sono as derivações recomendadas para análise do eletroencefalograma (EEG) na polissonografia consistem em eletrodos na posição frontal, central e occipital referenciados com o processo mastóide contralateral (Iber e col, 2007). Os eletrodos para avaliação do eletrooculograma serão colocados um centímetro lateral e superior ao canto externo do olho e outro eletrodo será colocado a um centímetro lateral e inferior ao canto externo do outro olho e serão referenciados à mastóide contralateral. A recomendação proposta para análise do eletromiograma está baseada em três eletrodos de superfície na região submentoniana.

O sono humano normal pode ser dividido em dois estados principais, de acordo com estudo eletroencefalográfico, em sono REM (abreviatura de *rapid eye*

movement, que significa movimento rápido dos olhos) e sono não-REM. O estágio de sono REM é caracterizado por movimento rápido dos olhos registrado pelo eletro-oculograma, atonia muscular constatada pelo eletromiograma e por um traçado dessincronizado no EEG de frequência mista e baixa amplitude. No estágio de sono não-REM (NREM) normalmente não é observado o movimento rápido dos olhos. O sono NREM, de acordo com características observadas no EEG, é subdividido em três estágios: estágio N1 (NREM1), estágio N2 (NREM2) e estágio N3 (NREM3) (Iber e col, 2007).

O registro do sono humano através da polissonografia (PSG) tem sido amplamente utilizado para o diagnóstico dos transtornos do sono. A PSG consiste no registro do sono do paciente no decorrer de uma noite inteira, possibilitando uma avaliação objetiva dos padrões eletroencefalográficos do sono quanto a sua arquitetura (macro e microestrutura) e correlação com outras variáveis como o tônus muscular o qual é essencial para estagiamento de sono REM, também utilizado para identificar movimentos durante o sono, por exemplo, a partir dos eletrodos em pernas. Da mesma forma, pode-se correlacionar com alterações respiratórias (como, por exemplo, apnéias ou hipopnéias do sono) que podem provocar fragmentação do sono. As correlações entre as diferentes manifestações fisiológicas e os estágios do sono em que ocorrem são importantes para o entendimento das mesmas, por isso é realizado o registro simultâneo de múltiplas variáveis fisiológicas. Assim, a PSG envolve a monitorização contínua durante o sono de diferentes parâmetros tais como: EEG, eletro-oculograma, eletromiograma (sendo esses utilizados no estagiamento do sono), mas também são avaliadas outras características como, por exemplo, aspectos

cardio-respiratórios (fluxo aéreo, esforço respiratório, eletrocardiograma, oximetria). A macroestrutura do sono pode ser avaliada pelo tempo total de sono (TTS), tempo na cama, eficiência do sono, latência para o sono, tempo acordado após adormecer, sono REM, estágios do sono NREM e latência para o sono REM.

2.2. Microestrutura do Sono

Informações contidas na organização da atividade de base e dos grafoelementos combinam-se compondo a macro e a microestrutura no traçado do EEG. A noção de microestrutura se baseia nas observações quantitativas realizadas sobre o sinal do EEG do sono; se trata de informação no limite, ou além, da capacidade humana de discriminação visual. A seguir serão abordados aspectos relacionados aos fusos do sono e ao padrão alternante cíclico (PAC) que consistem em fenômenos transitórios e cíclicos (Nicolas e col, 2001) identificados no traçado EEG do registro polissonográfico.

2.2.1. Fusos do Sono

Os fusos do sono consistem num trem de ondas com frequência entre 11 e 16 Hz com duração igual ou superior a 0.5 segundo. Eles apresentam periodicidade no sono humano (Nicolas e col, 2001). A maior incidência de fusos é identificada no estágio N2 (Dijk e col, 1993); o fuso do sono é um grafoelemento utilizado na descrição dos critérios para o estagiamento como N2. De acordo com o Manual de Escoreamento do Sono da Academia Americana de Medicina do Sono (Iber e col,

2007) o estágio N2 inicia quando, na ausência de critério para N3, ocorre um (ou mais) complexo K (não associados a despertar) e/ou um (ou mais) trem de fusos de sono na primeira metade de uma época de sono ou na última metade da época anterior. No que se refere ao escore do estágio N3, ressalta-se que ele deve ocorrer quando 20%, ou mais, da época é composta por atividade de onda lenta; a qual consiste em ondas com frequência de 0.5Hz a 2.0Hz, com amplitude pico-a-pico superior a 75 μ V medida em região frontal. Deve ser esclarecido que os fusos do sono podem persistir no estágio N3.

Os fusos do sono são sequências de ondas eletroencefalográficas num formato “crescendo e decrescendo” que são geradas em células do núcleo reticular talâmico (Fuentealba e Steriade, 2005). Os fusos resultam de descargas repetitivas nas células reticulares gabaérgicas do tálamo, as quais produzem potenciais pós-sinápticos inibitórios rítmicos em neurônios tálamo-corticais. Isso provoca rebote pós-inibitório destas descargas que são transferidos para o córtex e produzem potenciais pós-sinápticos excitatórios em células corticais. Como os neurônios tálamo-corticais dependem tempo de sono nos potenciais inibitórios pós-sinápticos relacionados aos fusos do sono há uma forte inibição da entrada de mensagens na sua rota para o córtex cerebral (Steriade, 2000; Steriade, 2005). Registros de potenciais evocados pela estimulação de axônios pré-talâmicos têm o tálamo como a primeira estação na qual sinais aferentes são completamente bloqueados. Esta obliteração do tálamo leva a deafferentação do córtex cerebral; um requisito para o processo de adormecer. Os fusos do sono ocorrem na fase de despolarização da oscilação lenta (Mölle e col, 2002). Estudos com animais evidenciaram que a frequência do fuso está relacionada

a duração das seqüências de hiperpolarização rebote das células tálamo-corticais (McCormick e col 1997). Com a duração da hiperpolarização de aproximadamente 70ms a freqüência do fuso é de aproximadamente 14Hz a 15Hz e com uma maior duração da hiperpolarização os fusos são mais lentos. Registros intracelulares, em estudos com gatos, de neurônios talâmicos e corticais demonstraram que, devido a hiperpolarização, durante o sono células tálamo-corticais não transferem para o córtex sinais oriundos da estação de *relay* pré-talâmico. No entanto, a comunicação cortico-cortical e cortico-talâmica podem ser mantidas durante o sono. Assim, enquanto as oscilações dos fusos são geradas no núcleo reticular talâmico, elas são sincronizadas por projeções cortico-talâmicas glutamatérgicas (Steriade, 2000).

A detecção dos fusos do sono pode ser feita através de análise visual (Nicolas e col, 2001; Himanen e col, 2002; Happe e col, 2004; Bastien e col, 2009; Selvitelli e col, 2009) ou utilizando detectores automáticos (Wei e col, 1999; Ferrarelli e col, 2007; Huupponen e col, 2008). Muitas pesquisas com fusos do sono nos últimos anos basearam-se na análise visual – tendo como consequência limitações de tamanho amostral ou no cálculo do poder espectral na banda sigma (intervalo de freqüências correspondendo à atividade de fusos) com dificuldade de caracterização de eventos isolados (Landolt e col, 1996).

Em relação à análise do sinal deve-se esclarecer que a série temporal original do EEG é a sua representação no espaço de tempo-amplitude, mas é possível utilizar operação matemática denominada Transformada de Fourier (FT) que permite que o sinal obtido no domínio do tempo seja representado no domínio da freqüência. Assim, a FT permite a sua representação no espaço de freqüência-amplitude; não

havendo a informação de localização temporal e obtendo-se, em troca, a informação sobre o conteúdo espectral (distribuição de frequências) do sinal. A completa localização em tempo e frequência não é possível simultaneamente, pois qualquer ganho numa variável tipo frequência acarreta perda na variável tempo. No entanto, quando um ótimo é atingido, a separação dos blocos em um espaço tempo-frequência torna-se factível na sua maior precisão. O espaço de tempo-frequência é chamado de gráfico ou plano de Wigner e as elevações que aparecem nesse gráfico são chamadas de átomos de Heisenberg, os quais podem ser utilizados na quantificação. Uma ferramenta disponível para análise dos fusos do sono e utilizada pelo nosso grupo é o algoritmo do tipo Matching Pursuit (MP) que consiste em uma rotina para aproximação adaptativa de sinais (Zygierwicz e col,1999; Durka e col, 2001). A decomposição por MP baseia-se na aproximação adaptativa recursiva do sinal, com funções escolhidas de um conjunto de formatos de ondas, denominado dicionário. O sinal é decomposto em forma de ondas que podem ser representadas como átomos, num espaço tempo-frequência (diagrama de Wigner), relacionadas com a voltagem do sinal original. Foi descrito que a concordância do MP com a detecção visual de fusos do sono por três especialistas atingiu 90% para limiares de amplitude acima de 25 μ V em uma amostra de estágio N2, oriunda de três indivíduos (Zygierewicz e col, 1999).

Diferentes características dos fusos do sono podem ser descritas como o seu número, densidade, duração, frequência interna (11-16Hz) e distribuição topográfica. Em relação a topografia, é descrito um predomínio de fusos lentos (frequência inferior a 13Hz) nas áreas frontais do escalpo e um predomínio de fusos rápidos nas

áreas centro-parietais (frequência superior a 13Hz) (Jobert e col, 1992). Em relação a frequência interna dos fusos do sono, deve-se destacar a possível sobreposição de elementos na frequência alfa (8-13Hz) e sigma (11-16Hz) (De Gennaro e col, 2003). Uma comparação de mapas topográficos do EEG durante o estágio N2 antes e após os fusos do sono identificou que, em indivíduos jovens, os fusos do sono com frequência de 12Hz facilitava a atividade de ondas lentas em áreas fronto-centrais; enquanto, 14Hz facilitava a atividade de ondas lentas em áreas centro-parietais (Ueda e col, 2001), sugerindo que a via tálamo-cortical é diferente para os dois tipos de fusos (Ueda e col, 2000; Ueda e col, 2001). Estudo em indivíduos normais utilizando simultaneamente EEG e Ressonância Magnética Funcional identificou um padrão de ativação, em comum, para fusos lentos e rápidos que engloba tálamo, córtex, cíngulo anterior, ínsula anterior esquerda e bilateralmente o giro temporal superior. Não foi identificada diferença significativa na ativação talâmica quando fusos lentos e rápidos foram comparados. No entanto, diferença significativa foi observada na ativação cortical entre fusos lentos e rápidos. Fusos lentos estavam associados com aumento da atividade no giro frontal superior; enquanto os fusos rápidos recrutaram uma série de regiões corticais envolvidas no processamento sensoriomotor, assim como o córtex frontal mesial e hipocampo (Schabus e col, 2007).

Os fusos do sono têm sido avaliados tanto em grupos de indivíduos saudáveis (Wei e col, 1999; Nicolas e col, 2001; Huuponen e col, 2008), descrito acima; como em diferentes doenças ou desafios farmacológicos (Jobert e col, 1992; Paterson e col, 2009). De fato, os fusos do sono foram quantificados, por exemplo, em indivíduos com malformações no desenvolvimento cortical (Selvitelli e col, 2009), com

esquizofrenia (Ferrarelli e col, 2007), insônia psicofisiológica (Bastien e col, 2009), DP (Puca e col, 1973; Comella e col, 1993; Happe e col, 2004). Na seção 2.2.4 são descritos alguns achados envolvendo pesquisas com DP.

2.2.2. Padrão Alternante Cíclico

O padrão alternante cíclico (PAC) é aceito como uma ferramenta para avaliar a microestrutura do sono em condições normais ou patológicas e tem sido utilizado em diferentes estudos (Ferini-Strambi e col, 1995; Droste e col, 1996; Parrino e col, 1998; Parrino e col, 2001; Terzano e col, 2002a; Farina e col, 2003; Manni e col, 2005; Thomas e col, 2004; Ferri e col, 2005a; Parrino e col, 2009). De fato, regras para a técnica de registro e estagiamento do PAC foram estabelecidas (Terzano e col, 2002b) e publicadas num estudo que demonstrou elevada confiabilidade entre avaliadores de diferentes centros de pesquisa (Ferri e col, 2005a).

O PAC é uma atividade do EEG periódica do sono NREM. O PAC é caracterizado por seqüências de eventos eletrocorticais transitórios que são distintos da atividade EEG basal do estágio e que ocorrem em intervalos de até um minuto. (Terzano e Parrino, 2000). O PAC está relacionado à interpretação eletroencefalográfica da flutuação do despertar (Parrino e col, 2001). A presença de PAC é tida como um marcador de sono instável enquanto que a ausência de PAC (fase não-PAC) reflete uma condição de sono consolidado (Terzano e col, 1985). O PAC traduz uma condição oscilatória sustentável entre um maior (fase A) e um menor nível de despertar (fase B). A identificação do PAC deve ser precedida pela

definição dos estágios do sono de acordo com critérios convencionais de estagiamento do sono. A seqüência PAC é composta por sucessão de ciclos PAC. O ciclo PAC é composto por uma fase A e uma fase B. A fase A pode ser dividida em três subtipos (A1, A2, e A3) que diferem na porcentagem de ondas sincronizadas e cuja importância e relevância com os achados clínicos estão sendo estudados (Ferri e col, 2005b). Toda seqüência PAC inicia com a fase A e termina com a fase B. A fenomenologia dos subtipos da fase A são bem definidos e com duração limitada (Parrino e col, 1998; Parrino e col, 2001). Cada fase PAC tem duração de 2-60s. A ausência de PAC por mais de 60s é estagiada como não-PAC. A seqüência PAC não é interrompida pela mudança de estágio, desde que os critérios para PAC sejam respeitados (Terzano e col, 2002b). As seqüências PAC podem se estender ao longo de sucessivos estágios de sono e as fases A podem se apresentar em diferentes padrões na mesma seqüência PAC. As seqüências PAC comumente precedem a transição do sono NREM para REM.

Estudo desenvolvido por Parrino e colaboradores (1998) demonstrou que no PAC o arranjo entre as fases A é baseado numa periodicidade que se mostrou independente da idade. Tal informação foi obtida em estudo que avaliou indivíduos saudáveis em diferentes faixas etárias. Foi identificado que a duração média da fase B permanece aproximadamente igual entre os grupos (variando de 16,2 a 18,8 segundos). Desta forma, o que influencia o tamanho do ciclo PAC é a duração das fases A, sendo o subtipo A3 mais longo que A1 e A2. O ponto de corte em dois segundos para o menor limite da fase B foi determinado como o mínimo possível para a discriminação visual. Ponto de corte de sessenta segundos para o limite

máximo foi convencionado independentemente de distinção entre sono em estágio N2 ou estágio N3. Acima de 90% das potenciais fases A do PAC eram separadas por intervalos nesta variação, com pico entre 20 e 40 segundos e aproximadamente 10% das fases A eram separadas por mais de 60 segundos.

Diferente estrutura de tempo pode ser identificada no PAC comparando estágios N2 e N3 de sono. Em adultos a diferença é evidente, preponderando intervalos com menor duração (<60s) em N3 comparado com o observado no sono N1 e N2; assim, N1 e N2 apresentam maior número de intervalos longos (>60s). Foi demonstrado que existe uma maior tendência para os componentes PAC se organizarem em seqüências regulares durante o sono N3 (sono de ondas lentas) que durante N1 e N2 (Ferri e col, 2006).

Foi demonstrada correlação entre os valores do índice de PAC e a avaliação subjetiva da qualidade de sono; maiores taxas do índice de PAC foram correlacionadas com pior qualidade de sono (Terzano e col, 1990). O PAC tem sido estudado também em diferentes condições clínicas. Pacientes com insônia apresentaram significativo aumento do índice PAC e subtipos A1 e A2 em relação aos indivíduos controles (Terzano e col, 2003). Foi descrito que pacientes com depressão apresentaram aumento significativo no índice PAC enquanto que pela avaliação dos parâmetros de macroestrutura do sono não havia sido encontrada diferença em relação aos controles saudáveis (Farina e col, 2003). Estudo avaliando epilepsia focal e sono identificou que as crises convulsivas ocorriam com maior freqüência na fase PAC em relação a não-PAC e durante a fase PAC as crises ocorriam com maior freqüência na fase A em relação à fase B (Manni e col, 2005).

Também tem sido avaliado o efeito de diferentes fármacos, especialmente sedativos e hipno-indutores no padrão alternante cíclico, por exemplo, foi demonstrado que o zolpidem reduz o índice PAC em insones (Terzano e Parrino, 1992)

Enfim, existem diferentes aspectos relacionados ao PAC que estão sendo estudados e que visam maior compreensão da fisiologia do sono, assim como dos efeitos provocados por diferentes patologias e fármacos (Parrino e col, 1998; Ferri e col, 2006; Guilleminault e col, 2007).

2.2.3. Avanço da idade: efeito na macro e microestrutura do sono

Sabe-se que o sono varia ao longo da vida (Ohayon e col, 2004). Muitos estudos de avaliação do sono no passado não controlavam adequadamente o critério idade na comparação entre os indivíduos facilitando com isso que diferenças inerentes ao processo de amadurecimento e envelhecimento interferissem nos resultados dos estudos. Meta-análise dos parâmetros quantitativos do sono (publicações entre 1960 e 2003) incluindo estudos com indivíduos saudáveis com variadas idades identificou que diversos parâmetros do sono modificam-se ao longo da vida (Ohayon e col, 2004). Considerando pessoas adultas, foi observado redução no tempo total de sono, na eficiência de sono e na porcentagem do sono em estágio N3 com o aumento da idade. Destaca-se que, após os sessenta anos de idade a redução da eficiência do sono permanece significativa. A porcentagem do sono REM reduz do adulto-jovem até a meia-idade, esse decréscimo não é significativo após os 60 anos. Ocorre um aumento do tempo acordado após o adormecer com o avanço da

idade. Estudo publicado no ano de 2005, baseado na análise do sono, pela PSG, de 198 indivíduos com idade entre 20 e 95 anos descreveu que tempo total de sono, índice de eficiência do sono, porcentagem do estágio N3 e porcentagem do sono REM diminuiu com o avanço da idade. Pronunciada redução no tempo total de sono, no índice de eficiência do sono e na porcentagem do estágio N3 do sono NREM foi observada principalmente nos percentis baixos (P25 e P10); indicando, segundo os autores, que o número de indivíduos com comparativamente baixos valores nesses parâmetros aumenta com a idade, assim também a variabilidade nesses parâmetros (Danker- Hopfe e col, 2005).

Além disso, tem sido descrito um aumento no número de despertares, assim como do índice de despertar, em função da idade. No entanto, no artigo publicado por Bonnet e Arand (2007) é destacado que a correlação entre o índice de despertar e a idade torna-se não significativa quando o cálculo é controlado para o tempo total de sono. Atualmente, de acordo com o Manual de Escoreamento do Sono da Academia Americana de Medicina de Sono (Iber e col, 2007), o escoreamento de despertar deve ser feito se, durante os estágios de sono N1, N2, N3 ou sono REM, ocorrer uma abrupta mudança de frequência do EEG, incluindo alfa, teta e/ou frequências maiores que 16 Hz (exceto fusos do sono) com duração mínima de três segundos, tendo no mínimo dez segundos de sono estável precedendo a mudança; sendo que no sono REM é necessário ainda um aumento do tônus muscular observado por aumento no eletromiograma submentoniano com duração de, no mínimo, um segundo.

Em relação aos fusos do sono, foi descrito uma influência da idade na periodicidade desses elementos. Foi constatado que em indivíduos jovens (no estudo

citado, idade média: 22.8 anos) a amplitude, a frequência, a duração e a incidência dos fusos do sono aumenta com a progressão do sono ao longo da noite. Em idosos (idade média no estudo: 66.6 anos) o aumento na amplitude e duração dos fusos ao longo da noite não é tão evidente quanto o observado em jovens; tendo sido constatado que a frequência dos fusos declina com a evolução do sono (Wei e col, 1999).

A redução do número de fusos com o avanço da idade (DeGennaro e col, 2003) foi observado tanto com escoreamento visual (Nicolas e col, 2001) quanto com detectores automáticos de fusos (Wei e col, 1999). Em jovens a variação da densidade dos fusos sono aumenta com o tempo de sono, o que não atingiu significância estatística no grupo dos idosos (Wei e col, 1999).

Assim, há uma progressiva redução no número e densidade de fusos do sono com o envelhecimento e um aumento na frequência interna do fuso (Wei e col, 1999; Nicolas e col, 2001). Essas modificações ocorrem principalmente nas primeiras quatro décadas, exceto o número e densidade dos fusos que mantém a redução até a sexta década de vida (Nicolas e col, 2001).

Em relação ao padrão alternante cíclico, Parrino e colaboradores (1998) identificaram que o PAC apresenta uma frequência em forma de “U” ao longo da vida (adolescentes: média de 43,4%; adultos jovens: 31,9%; meia-idade: 37,5%; idosos: 55,3%). Índice de PAC foi mínimo no adulto jovem (faixa de idade entre 20 e 39 anos) e máximo no idoso (idade superior a 60 anos). Quanto aos ciclos PAC, a média da duração dos ciclos PAC em idosos mostrou-se maior (média de duração do ciclo PAC em idosos: 31s) que a de indivíduos adolescentes e de meia-idade. Nos

estágios 2 e 4 (o atual estágio N3 do sono na classificação anterior era subdividido em estágio 3 e estágio 4 de acordo com a proporção menor ou maior de ondas lentas) a maior duração do ciclo PAC do grupo idoso deveu-se pela maior fase A. A duração da fase B foi estável para todas as idades no sono NREM. O subtipo A3 da fase A do CAP foi o mais longo em todos os grupos etários.

2.2.4. Macro e Microestrutura do Sono na Doença de Parkinson

No que se refere a macroestrutura do sono e doença de Parkinson, diferentes estudos apontam achados de baixa eficiência do sono (Happe e col, 2004), sono fragmentado (Pappert e col, 1998) maior número de despertares, sendo também descrito a redução da porcentagem de sono REM (Emser e col, 1988; Comella e col, 1993). A avaliação por polissonografia de onze pacientes com DP leve (Hoehn-Yahr 1-2) e sete pacientes com DP severa (Hoehn-Yahr 4-5) apresentou eficiência de sono reduzida e estrutura do sono fragmentada nos dois grupos, no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, nos parâmetros de macroestrutura do sono (Young e col, 2002).

Há décadas, os fusos do sono vêm sendo avaliados em grupos de pacientes com parkinsonismo. Algumas pesquisas anteriores informaram a menor produção (Myslobodosky e col, 1982; Emser e col, 1988; Comella e col, 1993) dos fusos do sono nesses indivíduos. No entanto, algumas limitações desses estudos anteriores devem ser consideradas para melhor julgamento quanto a validade dos resultados. A análise destas pesquisas é dificultada, pois, nem sempre, a metodologia empregada

está adequadamente descrita. Os critérios diagnósticos, por vezes, não são especificados, sendo identificados apenas como casos de parkinsonismo (para citar, estudo de Puca e col, 1973; Myslobodosky e col, 1982). Também é constatada grande variação na idade dos sujeitos pesquisados - como observado no estudo de autoria de Puca (Puca e col, 1973) no qual os indivíduos apresentavam idade entre 40 e 76 anos; ou no estudo de Emser (Emser e col, 1988) no qual foram avaliados indivíduos entre 45-65 anos. Assim, além da grande variação da idade; tal informação permite o questionamento sobre a diferença na etiologia da DP, por ter incluído pacientes que iniciaram com os sintomas mais precocemente. Além disso, alguns estudos não apresentavam grupo controle para adequada comparação (Puca e col, 1973; Myslobodosky e col, 1982; Comella e col, 1993). Outro aspecto a ser considerado é o fato de que, a maioria desses pacientes foi avaliado sob efeito de tratamento e de diferentes esquemas de terapêutica; o que sinaliza a carência de informações sobre fusos do sono nos pacientes com DP sem tratamento e permite o questionamento se os achados representam as alterações da doença ou dos tratamentos aos quais esses pacientes foram submetidos.

Estudo que comparou a microestrutura do sono de pacientes com DP, em tratamento, com controles saudáveis e mediu através de SPECT ($[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ SPECT) a ligação ao transportador de dopamina no estriado e a densidade de transportador de serotonina em região de tálamo-hipotálamo não identificou diferença entre DP e controles, na quantidade de complexos-K, complexos K-alfa e fusos do sono. Os grupos apresentaram, ao longo da noite, redução de complexos-K, mas não de fusos

do sono. Também não foi observada correlação entre fusos do sono e o grau de degeneração dopaminérgica (avaliada por SPECT) (Happe e col, 2004).

Considerando a análise do poder espectral do sono NREM de indivíduos com DP, em relação a grupo controle; foi descrito um aumento, apesar de não estatisticamente significativo, na atividade EEG na faixa de frequência sigma (12-16 Hz) em indivíduos com PD (Brunner e col, 2002). Ao analisarem as derivações centrais e occipitais (C3-A2; C4-A1; C3-C4; O1-O2) os autores observaram que os indivíduos com DP (previamente ao tratamento), em comparação a indivíduos controles, apresentaram aumento da atividade teta-alfa (6.3–10.9 Hz); os pacientes com DP não apresentaram o declínio fisiológico da atividade alfa no sono REM como observado em controles (Wetter e col, 2001).

Ainda no que se refere a microestrutura do sono e DP, em relação ao padrão alternante cíclico, pelo o que é do conhecimento do autor , até momento dessa revisão não havia sido publicado estudo analisando o PAC na doença de Parkinson.

3. MicroRNA

O microRNA (miRNA) corresponde a uma seqüência de aproximadamente 22 nucleotídeos (nt) de ácido ribonucléico (RNA) não-codificante e tem sido relacionado aos processos de regulação da expressão do gene através do emparelhamento base-específico com o mRNA alvo. A maioria dos miRNAs são transcritos pela polimerase II; no entanto, em humanos alguns miRNAs são transcritos pela polimerase III (Borchert, 2006). No núcleo, o transcrito primário

(pri-miRNA) é processado pela enzima RNase III Drosha resultando em um precursor de miRNA (pré-miRNA) com aproximadamente 70 nt que contém seqüência saliente com 2nt na extremidade 3'. Esta região é reconhecida pela Exportina-5 que transporta o pre-miRNA para o citoplasma. O pre-miRNA é processado pela RNase *dicer* resultando na formação de um intermediário duplo miRNA:miRNA*; que consiste em ~21nt do miRNA maduro e a seqüência complementar (secundária), miRNA*. Subseqüentemente a dupla hélice do miRNA duplo é separada pela helicase, o miRNA maduro é incorporado no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) enquanto o miRNA* é geralmente degradado (Bartel, 2004; Borchert, 2006). Os miRNAs guiam o complexo RISC até o mRNA alvo, que tem uma seqüência alvo complementar ao do miRNA. A ligação entre o miRNA e o seu mRNA alvo necessita tanto a presença do complexo RISC contendo a proteína Argonauta. Não é necessário que a interação entre miRNA e o alvo seja totalmente complementar; de fato, é descrito que o reconhecimento envolve resíduo 2-8 da porção 5'-terminal do miRNA, identificada como seqüência cerne (*seed*), e a seqüência complementar 3'UTR do mRNA alvo. Como consequência deste processo, o mRNA alvo será degradado ou terá sua tradução inibida.

Até o momento entende-se que a maioria dos miRNAs, em espécies animais, atuam através da inibição da efetiva tradução do mRNA dos genes alvo através de um pareamento imperfeito das bases da região 3'UTR (untranslated region) dos mRNA alvo. Esse mecanismo está envolvido com a inibição do início da tradução (Bartel, 2004).

Em muitos casos os miRNAs podem agir como reguladores genéticos; por exemplo o alvo do miRNA codifica um fator regulador e, muitas vezes, pela ação destes reguladores ocorre um comando em sentido contrário (*feed-back*) no sentido de reprimir o miRNA (Flynt e Lai, 2008).

Deve-se saber que, em geral, os mecanismos moleculares que regulam a expressão de um gene podem ser determinados por processos bioquímicos e moleculares inter-relacionados. A regulação pós-transcricional dependente de miRNA é um dos mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica (Liang e col, 2009). Ainda, diferentes mRNA podem ser alvos de diversos miRNAs; e diferentes miRNA podem regular múltiplos mRNAs (Hobert, 2008).

Na última década centenas de miRNAs têm sido identificados e catalogados e podem ser acessados em bancos de dados como, por exemplo, miRBase (Mendes e col, 2009); tendo sido constatado que muitos dos miRNAs são conservados ao longo da evolução das espécies, incluindo plantas e humanos.

Diversas pesquisas têm avaliado os miRNAs e demonstrado o seu envolvimento em diferentes processos biológicos do desenvolvimento, assim como na ocorrência de doenças (Alvarez-Garcia e col, 2005). De fato, estudos têm identificado miRNAs e os relacionados a diferentes processos biológicos das células como proliferação, diferenciação e apoptose. A ocorrência de alterações na expressão de miRNAs foram descritas em células tumorais e tem sido proposto que tais alterações possam contribuir no desenvolvimento do câncer (Meltzer, 2005). Também foi descrito modificação na expressão de miRNA em líquido cefalorraquidiano relacionados à Doença de Alzheimer (Cogswell e col, 2008).

No entanto, não é necessário considerar unicamente situações envolvendo patologias; os processos fisiológicos, assim como a interferência na regulação desses processos, também podem alterar a expressão dos miRNAs. Por exemplo, o sono – sabe-se que diversas estruturas e mecanismos estão relacionados com a regulação do sono - foi constatado que ratos privados de sono apresentaram mudança nos níveis de miRNA em relação ao grupo controle. Foi observado que o tipo de miRNA, assim como seu padrão de expressão (aumento ou redução) variou de acordo com a região (córtex pré-frontal, hipocampo ou hipotálamo) avaliada. O maior número miRNAs alterados, após a privação do sono, foi observado em hipocampo (Davis e col, 2007).

3.1. MicroRNA: detecção

Inicialmente a técnica de *northern-blotting* era tida como o padrão ouro na detecção do miRNAs. Baseados na avaliação de precursores de miRNA utilizando teste da reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction, PCR) em tempo real foi percebido que apenas precursores com valores de expressão mais elevada eram detectados com a técnica de *northern-blotting*. Ressalta-se que muitos precursores estudados têm uma baixa expressão relativa não sendo detectáveis pela técnica de *northern-blotting* (Jiang e col, 2005).

Atualmente, a técnica de PCR em tempo real, ou RT-qPCR, é o padrão ouro na quantificação de ácidos nucleicos devido a sua sensibilidade e especificidade. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para amplificação e quantificação de miRNAs precursores e maduros (Schmittgen e col, 2008). Para análise dos

miRNAs , Schmitgen e colaboradores (2004) descreveram o método de PCR em tempo real para quantificar precursores de miRNA contendo estrutura em grampo (*hairpin*). O método consiste em utilizar *primers* gene-específicos e transcriptase reversa termo-estável para converter o *hairpin* do precursor primário e precursor do miRNA em DNA complementar (cDNA). Após, o cDNA é amplificado e quantificado usando PCR em tempo real e para detecção utiliza-se sondas fluorescentes (TaqMan) ou o corante intercalante SYBR Green. Chen e colaboradores (2005) desenvolveram técnica para identificar miRNAs maduros. Assemelha-se ao teste que analisa os precursores tendo como principal diferença o uso de um *primer* com haste em laço (*stem-loop*) durante a reação da transcriptase reversa.

A quantificação de miRNAs pode ser feita por PCR quantitativo com o emprego de fluoróforos intercalantes como o SYBR-green (ou equivalente) como descrito nos trabalhos de Chen e colaboradores (2005) e de Jiang e colaboradores (2005).

A quantificação do nível de expressão dos miRNAs, tendo-se como base a metodologia de PCR em tempo real, é realizada em duas etapas. Por exemplo, na primeira etapa, uma série de oligonucleotídeos (multi-plex) contendo uma seqüência universal fusionada a uma seqüência microRNA específica de seis nucleotídeos é utilizada para a síntese de cDNA a partir do miRNA. Na segunda etapa, as reações de PCR em tempo real são realizadas utilizando um oligonucleotídeo que é miRNA específico e um oligonucleotídeo complementar a seqüência universal presente no oligonucleotídeo utilizado para a síntese dos cDNAs. As reações de PCR quantitativa

em tempo real (qPCR) são realizadas em equipamento padrão. De forma ilustrativa, considera-se que a PCR apresente etapas das reações que são compostas de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 10s a 94°C, 15s a 60°C e 10s a 72°C. Após, as amostras são aquecidas de 60 para 99°C com um aumento de 0,1°C/s para adquirir os dados produzidos pela curva de desnaturação dos produtos amplificados. As reações de RT-qPCRs são feitas em um volume final de 20 µL composto de 10 µL de cada amostra de cDNA diluída de 50 a 100 vezes, adicionadas de 2 µL de Platinum Taq 10x PCR buffer, 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,4 µL dNTPs 5 mM, 0,4 µL do par de oligonucleotídeos a 10 µM, 3,95 µL H₂O, 2,0 µL SYBR green ou sonda marcada, e 0,05 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL).

3.2. MicroRNA na Doença de Parkinson

Diversos estudos têm identificado miRNAs e os relacionados a diferentes processos biológicos como os envolvidos na plasticidade sináptica, na neurogênese e nos processos neurodegenerativos. Nesse tema, as pesquisas englobam modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*; análises em humanos tem quantificado a expressão de miRNA tanto em tecido cerebral como em LCR. Tem sido proposto que miRNAs possam agir em diferentes estágios de produção ou regulação da degradação de proteínas tóxicas e que mudanças nessas etapas possa exercer um papel no processo neurodegenerativo (Eacker e col, 2009).

Estudo *postmortem* comparando DP e controle (três indivíduos por grupo) quanto a expressão, por RT-qPCR, de uma lista de 224 precursores de miRNA

identificou deficiência de expressão do miR-133b no cérebro de indivíduos com DP em relação ao grupo controle. Em estudos com modelos animais de deficiência de neurônios dopaminérgicos, tanto os camundongos com deficiência do fator de transcrição Pitx3 como os tratados com 6-hidroxidopamina apresentaram reduzida expressão de miR-133b em relação aos camundongos normais. Ainda, foi demonstrado que a elevada expressão de Pitx3 em cultura de células tronco-embrionárias propiciou um aumento da expressão do precursor miR-133. A aumentada expressão de miR-133b induziu a redução dos níveis de Pitx3 em células tirosina-hidroxilase positivas, enquanto que a redução de miR-133b provocou um aumento da proteína Pitx3 nessas células (Kim e col, 2007).

Na busca da compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DP as alterações genéticas também são investigadas nesses pacientes. Estudo que avaliava fatores de risco para DP identificou um polimorfismo (SNP) no gene FGF20 (fibroblast growth factor 20) (Wang e col, 2008b), o qual tem ligação com miR-433. Esse SNP na seqüência 3'UTR do FGF20 modifica a ligação do miR-433, resultando em um aumento na tradução de FGF20. Elevados níveis da proteína FGF20 aumenta a expressão de alfa-sinucleína que, como descrito na seção 1.1.2 deste trabalho, é uma proteína que se acumula nos corpúsculos de Lewy. Estudo publicado no ano seguinte não identificou associação entre a variabilidade de FGF20 e risco para DP (Wider e col, 2009).

Diversos artigos de revisão relacionando miRNA e doenças neurodegenerativas têm sido publicados (Weinberg e Wood, 2009; Eacker e col, 2009; Christensen e Schrott, 2009; Barbato e col, 2009; Roshan e col, 2009; Lau e

Strooper, 2010) entretanto ainda existe pouca sobreposição entre os achados de diferentes estudos. Não havendo, até o momento, evidência direta de relação causa e efeito entre miRNA e as doenças neurodegenerativas.

Objetivos

Objetivos Gerais

- 1) Avaliar o sono de indivíduos com doença de Parkinson.
- 2) Avaliar a qualidade de vida em pacientes idosos com doença de Parkinson.
- 3) Avaliar a expressão de microRNAs no sangue de pacientes com doença de Parkinson.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar as propriedades psicométricas da versão brasileira da “Escala de Sono na Doença de Parkinson”.
- 2) Avaliar a qualidade de vida em pacientes idosos com doença de Parkinson e sua relação com o sono.
- 3) Analisar a microestrutura do sono de pacientes com doença de Parkinson sem tratamento através da avaliação da densidade dos fusos do sono.
- 4) Analisar a microestrutura do sono de pacientes com doença de Parkinson sem tratamento através da avaliação do padrão alternante cíclico.
- 5) Avaliar a expressão de microRNAs em sangue periférico nos pacientes com doença de Parkinson em relação ao grupo controle.

Referências da Revisão Bibliográfica

Adler CH. Nonmotor complications in Parkinson's Disease. *Movement Disorder* 2005; 20 (suppl 11): S23-S29.

Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132:4653-4662.

American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, 2^aed.; Diagnostic and coding manual. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine 2005: 148-152.

Arevalo GG, Jorge R, Garcia S, Scipioni O, Gershanik O. Clinical and pharmacological differences in early- versus late- onset Parkinson's disease. *Movement Disorder* 1997; 12 (30): 277-284.

Arnulf I, Konofal E, Merino-Andreu M, Houeto JL, Mesnage V, Welter ML, Lacomblez L, Golmard JL, Derenne JP, Agid Y. Parkinson's disease and sleepiness. An integral part of PD. *Neurology*, 2002; 58: 1019-1024.

Barbanti P, Fabbrini G, Ricci A, Cerbo R, Bronzetti E, Caronti B, Calderaro C, Felici L, Stocchi F, Meco G, Amenta F, Lenzi GL. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Movement Disorder* 1999; 14(5):764-771.

Barbato C, Ruberti F, Cogoni C. Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* doi: 10.1155/2009/871313, 2009.

Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, Cardoso F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). *Movement Disorders* 2006; 21(6): 800-808.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.

Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 623-631.

Bastien CH, St-Jean G, Turcotte I, Morin CM, Lavallé M, Carrier J. Sleep spindles in chronic psychophysiological insomnia. *Journal of Sleep Research* 2009; 66:59-65.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience* 1999; 19: 1708-1716.

Bezard E, Gross CE, Brotchie JM. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends in Neuroscience* 2003; 26 (4):215-221.

Boeve BF, Silber MH, Saper CB, Ferman TJ, Dickson DW, Parisi JE, Benarroch EE, Ahlskog JE, Smith GE, Caselli RC, Tippman-Peikert M, Olson EJ, Lin SC, Young T, Wszolek Z, Schenck CH, Mahowald MW, Castillo PR, Del Tredici K, Braak H. Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain* 2007; 130: 2770-2788.

Bonnet MH, Arand DL. EEG arousal norms by age. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2007; 3 (3):271-274.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006; 13(12):1097-1101.

Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, de Vos RAI, Del Tredici K. Stages in the development of parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Research* 2004; 318:121-134.

Braak H, Müller CM, Rüb U, Ackermann H, Bratzke H, de Vos RAI, Del Tredici K. Pathology associated with sporadic Parkinson's disease – where does it end? *Journal of Neural Transmission* 2006; 70: 89-97.

Brodsky MA, Godbold J, Roth T, Olanow W. Sleepiness in Parkinson's disease: a controlled study. *Movement Disorders* 2003;18(6): 668-672.

Brunner H, Weter TC, Hoegl B, Yassouridis A, Trenkwalder C, Friess E. Microstructure of non-rapid eye movement sleep electroencephalogram in patients with newly diagnosed Parkinson's disease: effects of dopaminergic treatment. *Movement Disorder* 2002; 17(5):928-933.

Burn DJ. Beyond the Iron Mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2002; 17(3):445-454.

Busiguina, A.M. Fernandez, V. Barrios, R. Clark, D.L. Tolbert, J. Berciano, I. Torres-Aleman. Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors. *Neurobiology of Disease* 2000;7: 657-665.

Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice research. *Psychiatry Research* 1989; 28: 193-213.

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Martinez-Martin P. Determinants of quality of life in Brazilians patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2007; 22(10):1408-1415.

Chaudhuri KR, Pal S, DiMarco A, Whately-Smith C, Bridgman K, Mathew R; et al. The Parkinson's disease sleep scale: a new instrument for assessing sleep and nocturnal disability in Parkinson's disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2002; 73(6):629-635.

Chaudhuri KR, Martinez-Martin P. Clinical assessment of nocturnal disability in Parkinson's disease. *Neurology* 2004; 63 (8 suppl 3):S17-20.

Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; 5:235-245.

Chaudhuri KR, Naidu Y. Early Parkinson's disease and non-motor issues. *Journal of Neurology* 2008; 255 (suppl5):33-38.

Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Neurology* 2009; 8: 464-474.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(20):e179.

Chiba S, Matsumoto H, Saitoh M, Kasahara M, Matsuya M; Kashiwagi M. A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 1995; 132: 170-173.

Chrischilles EA, Rubenstein LM, Voelker MD, Wallace RB, Rodnitzky RL. The health burdens of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 1998;13(3): 406-413.

Christensen M, Schratt GM. microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neuroscience Letters* 2009; 466:55-62.

Cogswell JP, Taylor IA, Waters , Shi Y, Cannon , Keinar K, Kemppainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer 's disease brain and CSF yields putative biomarkers ad insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's Disease* 2008; 14(1):27-41.

Collier TJ, Dung Ling Z, Carvey PM, Fletcher-Turner A, Yurek DM, Sladek Jr JR, Kordower JH. Striatal trophic factor activity in aging monkeys with unilateral MPTP-induced parkinsonism *Experimental Neurology* 2005; 191 (suppl. 1): 60-67.

Comella CL, Tanner CM, Ristanovic RK. Polysomnographic sleep measures in Parkinson's disease patients with treatment-induced hallucinations. *Annals of Neurology* 1993; 34 (5): 710-714.

Comella C. Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2003; 3: 173-180.

Cummings JL. Depression and Parkinson's disease: a review. *American Journal of Psychiatry* 1992; 149: 443-454.

Danker-Hopfe H, Schäfer M, Dorn H, Anderer P et al. Percentile reference for selected sleep parameters for 20-80 year old healthy subjects from the SIESTA database. *Somnologie* 2005; 9: 3-14.

Davis CJ, Bohnet SG et al. Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation *Neuroscience Letters* 2007; 422:68-73.

Dauvilliers Y. Insomnia in patients with neurodegenerative conditions. *Sleep Medicine* 2007; 8 (suppl4):S27-34.

De Gennaro L, Ferrara M. Sleep spindles: an overview. *Sleep Medicine Reviews* 2003; 7(5):423-440.

De Keyser J, Wilczak N, De Backer JP, Herroelen L, Vauquelin G. Insulin-like growth factor-I receptors in human brain and pituitary gland: an autoradiographic study. *Synapse* 1994; 17: 196-202.

De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54(Suppl 5): S21-23.

Dhawan V, Dhoat S, Williams AJ, DiMarco A. The range and nature of sleep dysfunction in untreated Parkinson's disease (PD). A comparative controlled clinical study using the Parkinson's disease sleep scale and elective polysomnography. *Journal of the Neurological Sciences* 2006, 248:158-162.

Diederich NJ, Vaillant M, Leischen M, Mancuso G et al. Sleep apnea syndrome in Parkinson's disease. A case-control study in 49 patients. *Movement Disorders* 2005; 20(11):1413-1418.

Dijk D-J, Hayes B, Czeisler CA. Dynamics of electroencephalographic sleep spindles and slow wave activity in men: effect of sleep deprivation. *Brain Research* 1993; 626: 190-199.

Durka PJ, Ircha D, Blinowska KJ. Stochastic time-frequency dictionaries for Matching Pursuit. *IEEE Transactions on Signal Processing* 2001; 49(3):507-510.

Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL. Understanding microRNAs in neurodegeneration *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10: 837-841.

Emser W, Brenner M, Stober T. Changes in nocturnal sleep in Huntington and Parkinson's disease. *J Neurology* 1988; 235: 177-179.

Fahn S, Elton RL and Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information, 1987; p. 153-163.

Farina B; Della Marca G; Grochocinski VJ; Mazza M; Buysse DJ; Di Giannantonio M; Mennuni GF; De Risio S; Kupfer DJ; Frank E. Microstructure of sleep in depressed patients according to the cyclic alternating pattern. *Journal of Affective Disorders* 2003; 77:227-235.

Feng J. Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. *Neuroscientist* 2006; 12(6): 469-476.

Ferini-Strambi L, Oldani A, Tirloni G, Zucconi M, Castagna A, Lazzarin A, Smirne S. Slow wave sleep and cyclic alternating pattern (CAP) in HIV –infected asymptomatic men. *Sleep* 1995; 18(6): 446-450.

Ferrarelli F, Huber R, Peterson MJ, Massimini M, Murphy M, Riedner BA, Watson A, Bria P, Tononi G. Reduced sleep spindle activity in schizophrenia patients. *American Journal of Psychiatry* 2007; 164: 483-492.

Ferri, R; Bruni, O; Miano,S; Smerieri A; Spruyt K; Terzano MG. Inter-rater reliability of sleep cyclic alternating pattern (CAP) scoring and validation of a new computer-assisted CAP scoring method *Clinical Neurophysiology* 2005; 116: 696-707. (a)

Ferri R, Bruni O, Miano S, Terzano MG. Topographic mapping of the spectral components of the cyclic alternating pattern (CAP). *Sleep Medicine* 2005; 6: 29-36.(b)

Ferri R, Bruni O, Miano S, Plazzi G, Spruyt K, Gozal D, Terzano MG. The time structure of the cyclic alternating pattern during sleep. *Sleep* 2006; 29(5):693-699.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetic* 2008; 9: 102-114.

Fleck MP, Chachamovich E, Trentini C. Development and validation of the Portuguese version of the WHOQOL-OLD module. *Revista de Saúde Pública* 2006; 40(5):785-791.

Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature Reviews* 2008; 9: 831-842.

Fuentealba P, Steriade M. The reticular nucleus revisited: intrinsic and network properties of a thalamic pacemaker. *Progress in Neurobiology* 2005; 75: 125-141.

Gelb D, Oliver E, Gilman SAN. Diagnostic criteria for Parkinson Disease. *Archives Neurology* 1999; 56:33-39.

Giovannini P, Piccolo I, Genitrini SW, Soliveri P, Girotti F, Geminiani G, Scigliano G and Caraceni T. Early-onset Parkinson's disease. *Movement Disorder* 1991; 6(1): 36-42.

Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, StebbinsGT, Counsell C et al. Movement disorder society task force report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: status and recommendations. *Movement Disorder* 2004; 19(9): 1020-1028.

Guilleminault C, Lopes MC, Hagen CC, Rosa A. The cyclic alternating pattern demonstrates increased sleep instability ad correlates with fatigue and sleepiness in adult with upper airway resistance syndrome. *Sleep* 2007; 30(5):641-647.

Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinal followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica* 2008; 115: 409-415.

Happe S, Anderer P, Pirker W, Klosh G, Gruber G, Saletu B, Zeitlhofer J. Sleep microstructure and neurodegeneration as measured by [¹²³I] β-CIT SPECT in treated patients with Parkinson's disease. *J Neurol* 2004, 251: 1465-1471

Herzog J, Volkmann J, Krack P, Kopper F, Pötter M, Lorenz D, Steinbach M, Klebe S, Hamel W, Schrader B, Weinert D, Müller D, Mehdorn HM, Deuschl G. Two-year follow-up of subthalamic deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2003; 18 (11): 1332-1337.

Himanen S-L, Virkkala J, Huhtala H, Hasan J. Spindle frequencies in sleep EEG show U-shape within first four NREM sleep episodes. *Journal of Sleep Research* 2002; 11: 35-42.

Hirayama MS, Gobbi S, Gobbi LTB, Stella F. Quality of life (QOL) in relation to disease severity in Brazilian Parkinson's patients as measured using WHOQOL-BREF. *Archives Gerontology and Geriatrics* 2008; 46:147-160.

Hlavanda E, Kóvacs J, Oláh J, Orosz F, Medzihradsky KF and Ovádi J. Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry* 2002; 41:8657-8664.

Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 2008; 319: 1785-1786.

Hobson DE, Lang AE, Martin WRW, Razmy A, Rivest J, Fleming J. Excessive daytime sleepiness and sudden-onset sleep in Parkinson disease. *JAMA*, 2002; 287 (4):455-463.

Hoehn MH, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-447.

Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 1998;51 (suppl2):S2-S9.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M et al. Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases sleep slow activity . *Nature Neuroscience* 2006; 9 (9) :1169-1176.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1992; 55: 181-184.

Huupponen E, Kulkas A, Tenhunen M, Saastamoinen A, Hasan J, Himanen S-L. Diffuse sleep spindles show similar frequency in central and frontopolar positions. *Journal of Neuroscience Methods* 2008; 172:54-59.

Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF, for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, Terminology and technical specifications, 1sted.: Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2007.

Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity. *Neuron* 2007; 53: 519-533.

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(17): 5394-5403.

Jiang Q, Yan Z, Feng J. Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(39): 29391-29400.

Jobert M, Poiseau E, Jänig P, Schulz H, Kubicki S. Topographical analysis of sleep spindle activity. *Neuropsychobiology* 1992; 26: 210-217.

Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991; 14(6):540-545.

Kao H-S. Rescue of α -synuclein cytotoxicity by insulin-like-growth factors
Biochemical and Biophysical Research Communications 2009; 385: 434-438.

Karlsen K, Larsen JP, Tandberg E, Jørgensen K. Fatigue in patients with
Parkinson's disease. Movement Disorder 1999; 14(2): 237-241.

Kaynak D, Kiziltan H, Kaynak H, Benbir G, Uysal O. Sleep and sleepiness
in patients with Parkinson's disease before and after dopaminergic treatment.
European Journal of Neurology 2005; 12: 199-207.

Kim J, K. Inoue, J. Ishii, W.B. Vanti, S.V. Voronov, E. Murchison, G.
Hannon, A. Abeliovich. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine
neurons. Science 2007; 317: 1220-1224.

Knott C, Stern G, Kingsbury A, Welcher AA, Wilkin GP. Elevated glial
brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. Parkinsonism and
Related Disorders 2002; 8: 329-341.

Kovács GG, L. László, J. Kovács, P.H. Jensen, E. Linderson, G. Botond, T.
Molnár, A. Perczel, F. Hudecz, et al. Natively unfolded tubulin polymerization
promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies.
Neurobiology of Disease 2004; 17:155-162.

Kovács GG, Gelpi E, Lehotzky A, Höftberger R, Erdei A, Budka H, Ovádi J.
The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of
neurodegenerative diseases. Acta Neuropathologica 2007; 113: 153-161.

Kumar S, Bhatia M, Behari M. Sleep disorders in Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2002; 17: 775-781.

Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Toivone M, Rinne UK. The quality of life in Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2000; 15(2):216-233.

Landolt HP, Dijk D-J, Achermann P, Bobérly AA. Effect of age on the sleep EEG: slow-wave activity and spindle frequency in young and middle-aged men. *Brain Research* 1996; 738: 205-212.

Lau P, Strooper B. Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2010;doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.009.

Lee H-J, Khoshaghideh F, LeeS, Lee S-J. Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of α -synuclein. *European Journal of Neuroscience* 2006; 24: 3153-3162

Lees AJ, Blackburn NA, Campbell V. The Nighttime problems of Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology* 1988; 11(6):512-519.

Leetjens AFG, Verhey FRJ, LuijckxGJ et a. The validity of beck depression inventory as a screening and diagnostic instrument for depression in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2000; 15(6): 1221-1224.

Leetjens AFG, Van den Akker M, Metsemakers JFM, Lousberg R, Verhey FRJ. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Movement Disorder* 2003; 18: 414-418.

Leetjens AFG. Depression in Parkinson's disease: conceptual issues and clinical challenges. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 2004; 17: 120-126.

Lemke MR. Depressive symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 2008; 15 (suppl 1):21-25.

Lewis SJG, Caldwell MA, Barker RA. Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5: 1-20. doi: 10.1017/S1462399403006008

Lewis SJG, Foltynie T, Blackwell AD, Robbins TW, Owen AM, Barker RA. Heterogeneity of Parkinson's disease in the early clinical stages using a data driven approach. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2005; 76:343-348.

Liang R, Bates DJ, Wang E. Epigenetic control of microRNA expression and aging. *Current Genomics* 2009; 10:184-193.

Mahowald MW, Schenck CH. REM sleep parassomnias. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 4^aed. Elsevier Saunders, Philadelphia: 897-912.

Manni R, Zambrelli E, Bellazzi R, Terzagui M. The relationship between focal seizures and sleep: an analysis of the cyclic alternating pattern. *Epilepsy Research* 2005; 67: 73-80.

Marinus J, Viser M, van Hilten JJ, Lammers GJ et al. Assessment of sleep and sleepiness in Parkinson disease. *Sleep* 2003; 26(8): 1049-1054.

Martinez-Martín P, Salvador C, Menéndez-Guisasola L, González S, Tobias A, Almazán J, et al. Parkinson's disease sleep scale: validation study of a Spanish Version. *Movement Disorder* 2004; 19: 1226-1232.

McCormick DA, Bal T. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual Reviews Neuroscience* 1997; 20:185-215.

McDonald WM, Richard IH, de Long MR. Prevalence, etiology and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biological Psychiatry* 2003; 54:363-375.

McDonald WM, Holtzheimer PE, Haber M, Vitek JL, McWhorter K, DeLong M. Validity of the 30-item geriatric depression scale in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2006; 21(10): 1618-1622.

Meltzer PS. Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; 435:745-746.

Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Research* 2009; 37: 2419-2433.

Mogi m, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. p53 protein, interferon- γ , and NF- κ B levels are elevated in parkinsonian brain. *Neuroscience Letters* 2007; 414: 94-97.

Möller M, Marshall L, Gais S, Born J. Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22(24):10941-10947.

Monaca C, Duhamel A, Jaquesson JM, Ozsancak C, Destée A, Guieu JD, Defebvre L, Derambure P. Vigilance trouble in Parkinson's disease: a subjective and objective polysomnographic study. *Sleep Medicine* 2006;7: 448-453.

Morgante L, Salemi G, Meneghini F, Di Rosa AE, Epifanio A, Grigoletto F, Ragonese P, Patti F, Reggio A, Di Perri R, Savettieri G. Parkinson Disease Survival. A Population-Based Study. *Archives of Neurology* 2000; 57:507-512.

Movement disorder society task force on rating scales for Parkinson's disease. The unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS): status and recommendations. *Movement Disorder* 2003; 18(7): 738-750.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 2001; 63:71-124.

Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee V M-Y. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 2000; 20 (9): 3214-3220.

Myslobodsky M, Mintz M, ben-Mayor V, Radwan H. Unilateral dopamine deficit and lateral EEG asymmetry. *Clinical Neurophysiology* 1982; 54:227-231.

Nelson PT, Wang WX, Rajeev BW. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathology* 2008; 18: 130-138.

Nicolas A, Petit D, Rompré S, Montplaisir J. Sleep spindle characteristics in healthy subjects of different age groups. *Clinical Neurophysiology* 2001; 112: 521-527.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neuroscience* 2000; 23: S8-S19.

Offen D, Shtaf B, Hadad D, Weizman A, Melamed E, Gil-Ad I. Protective effect of insulin-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2001; 316: 129-132.

Ohayon MM, Carskadon MA, Guilleminaut C, Vitiello MV. Meta-analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan. *Sleep* 2004; 27(7): 1255-1273.

Olanow CW, Watts RL, Koller WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines. *Neurology* 2001; 56 (supl5):S1-S88.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. Levodopa I the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Movement Disorder* 2004; 19(9): 997-1005.

Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, Aguiar B, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *Journal of Psychiatric Research* 2009; 43(14):1171-1174.

Pappert E, Goetz CG, Niederman FG, Raman R, Leurgas S. Hallucinations, sleep fragmentation and altered dream phenomena in Parkinson's disease. *Movement Disorder* 1999; 14(1):117-121.

Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* 1999; 10(3):557-561.

Parrino L, Boselli M, Spaggiari MC, Smerieri A, Terzano MG. Cyclic alternating pattern (CAP) in normal sleep: polysomnographic parameters in different age groups. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1998; 107: 439-450.

Parrino L, Smerieri A, Rossi M, Terzano MG. Relationship of slow and rapid EEG components of CAP to ASDA arousals in normal sleep. *Sleep* 2001; 24(8): 881-885.

Parrino L, Milioli G, De Paolis F, Grassi A, Terzano MG. Paradoxical insomnia: the role of CAP and arousals in sleep misperception. *Sleep Medicine* 2009; doi 10.1016.

Paspalas CD, Rakic P, Goldman-Rakic PS. Internalization of D2 dopamine receptors is clathrin-dependent and select to dendro-axonic appositions in primate prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 2006; 24:1395-1403.

Paterson LM, Nutt DJ, Ivarsson M, Hutson PH, Wilson SJ. Effects on sleep stages and microarchitecture of caffeine and its combination with zolpidem or trazodone in healthy volunteers *Journal of Psychopharmacology* 2009; 23(5):487-494.

Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 2009; 32: 189-194.

Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* 2008; 15 (suppl 1):14-20.

Pollock BG. The pharmacokinetic Imperative in late-life depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2005; 25 (suppl 1): S19-S23.

Power M, Quinn K, Schmidt S. WHOQOL-OLD Group. Development of WHOQOL-OLD module. *Quality of Life Research* 2005; 14: 2197-2214.

Puca FM, Bricolo A, Turella G. Effect of L-dopa or amantadine therapy on sleep spindles in parkinsonism. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1973; 35: 3427-3430.

Rahman S, Griffin HJ, Quinn NP, Jahanshahi M. Quality of life in Parkinson's Disease: the relative importance of the symptoms. *Movement Disorder* 2008; 23(10),1428-1434.

Rajput AH, Sitte HH, Rajput A, Fenton ME, Pifl C, Hornykiewicz O. Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes. *Neurology* 2008; 70: 1403-1410.

Rajput AH, Voll A, Rajput MI, Robinson CA, Rajput A. Course in Parkinson disease subtypes. A 39-year clinicopathologic study. *Neurology* 2009; 73: 206-212.

Rascol, O. Disease-modification trials in Parkinson disease: target populations, endpoints and study design. *Neurology* 2009; 72 (suppl.7): S51-S58.

Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *Neuroscience* 2003; 23(8): 3316-3324.

Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(40):34105-34112.

Ren Y, Jiang H, Yang F, Nakaso K, Feng J. Parkin protects dopaminergic neurons against microtubule-depolymerizing toxins by attenuating microtubule-associated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(6):4009-4017.

Rieder CRM, Bianchin MM, Schröder N. Aspectos Neuropsiquiátricos da Doença de Parkinson. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. Artmed 2ªed. Porto Alegre, 2004; p: 417-427.

Roshan R, T. Ghosh, V. Scaria, and B. Pillai. MicroRNAs: novel therapeutic targets in neurodegenerative diseases. *Drug Discovery Today* 2009; doi:10.1016.

Rye DB. The two faces of Eve: dopamine's modulation of wakefulness and sleep. *Neurology* 2004; 63 (suppl 3): S2-S7.

Salehi Z, mashayeki F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009; 16: 90-93.

Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Depressive symptoms and perception of quality of life in Parkinson's disease. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 2009; 67(2A): 203- 208.

Schabus M, Dang-Vu TT, Albouy G, Balet E, Boly M, et al. Hemodynamic cerebral correlates of sleep spindles during human non-rapid eye movement sleep. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 2007; 104(32):13164-13169.

Schenck CH, Mahowald MW. REM sleep behavior disorder: clinical, development and neuroscience. Perspectives 16 years after its formal identification in SLEEP. *Sleep* 2002; 25(2): 120-138.

Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, Liao Z, Locascio JL, et al. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 2007; 104 (3):955-960.

Schestatsky P, Zanatto VC, Margis R, Chachamovich E, Reche M, Batista RG, Ficke D, Rieder CRM. Quality of life in a Brazilian sample of patients with Parkinson's disease and their caregivers. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2006; 28(3): 209-211.

Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research* 2004; 32(4):e43.

Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 2008; 44: 31-38.

Schrag A, Jahanshahi M, Quinn N. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2000; 69: 308-312.

Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 2000; 123: 2297-2305.

Schrag A, Barone P, Brown RG, Leetjens AFG, McDonald WM, Starkstein S, Weintraub D, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Goetz CG. Depression Rating Scales in Parkinson's Disease: Critique and Recommendations. *Movement Disorder* 2007; 22(8): 1077-1092.

Selvitelli MF, Krishnamurthy KB, Herzog AG, Schomer DL, Chang BS. Sleep spindle alterations in patients with malformations of cortical development. *Brain & Development* 2009; 31: 163-168.

Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. α -synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS*, 2004; 565:1-5.

Shehadeh L, Mitsi G, Adi N, Bishopric N, Papapetropoulos S. Expression of Lewy body protein septin 4 in postmortem brain of Parkinson's disease and control subject. *Movement Disorder* 2008; 24: 204-210.

Shpirer I, Miniowitz A, Klein C, Goldstein R, Prokhorov T, Theitler J, Pollak L, Rabey JM. Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease: polysomnography study. *Movement Disorders* 2006; 21(9):1432-1438.

Shulman LM, Taback RL, Rabinstein AA, Weiner WJ. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2002; 8:193-197.

Sorkina T, Hoover BR, Zahniser R, Sorkin A. Constitutive and protein kinase c-induced internalization of the dopamine transport is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic* 2005; 6: 157-170.

Souza RG, Borges V, Silva SMCA, Ferraz, HB. Quality of life scale in Parkinson's disease PDQ - 39 - (Brazilian Portuguese version) to assess patients with and without levodopa motor fluctuation. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2007; 65: 787-791.

Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007; 64: 1187-1204.

Steriade M. Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* 2000; 101(20): 243-276.

Steriade M. Brain electrical activity and sensory processing during waking and sleep states. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 4thed. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005: 101- 119.

Stevens S, Comella CL, Stepanski EJ. Daytime sleepiness and alertness in patients with Parkinson's disease. *Sleep* 2004; 27(5): 967-972.

Stocchi F, Barbato L, Nordera G, Berardeli A, Ruggieri S. Sleep disorders in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 1998; 245 (suppl 1):S15-S18.

Suzuki K, Okuma Y, Hattori N, Kamei S, Yoshii F, Utsumi H et al. Characteristics of sleep disturbances in Japanese patients with Parkinson's disease. A study using Parkinson's disease sleep scale. *Movement Disorder* 2007; 22: 1245-1251.

Tandberg E, Larsen J, Karlsen K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorder* 1998; 13(6): 895-899.

Tandberg E, Larsen J, Karlsen K. Excessive daytime sleepiness and sleep benefit in Parkinson's disease: a community-based study. *Movement Disorder* 1999; 14(6): 922- 927.

Terzano, MG; Mancina, D; Salati, MR; Costani, G; Decembrino, A, Parrino, L. The cyclic alternating pattern as physiologic component of normal NREM sleep. *Sleep* 1985; 8:137-145.

Terzano, MG; Parrino, L; Fioriti, G; Orofiamma, B; Depoortere, H. Modifications of sleep structure by increasing levels of acoustic perturbation in normal subjects. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1990; 76: 29-38.

Terzano MG; Parrino L. Evaluation of EEG cyclic alternating pattern during sleep in insomniacs and controls under placebo and acute treatment with zolpidem. *Sleep* 1992; 15 (1): 64-70.

Terzano, MG; Parrino, L. Origin and significance of the cyclic alternating pattern (CAP). *Sleep Medicine Reviews*; 2000 (4):101-123.

Terzano MG, Parrino L, Rosa A, Palomba V, Smerieri A. CAP and arousals in the structural development of sleep: an integrative perspective. *Sleep Medicine* 2002; 3: 221-229.(a)

Terzano, MG; Parrino, L; Smerieri, A; Chervin, R; Chokroverty, S; Guilleminault, C; Hirshkowitz, M; Mahowald, M; Moldofsky, H; Rosa, A; Thomas, R; Walters, A. Atlas, rules and recording techniques for the scoring of cyclic alternating pattern (CAP) in human sleep. *Sleep Medicine* 2002; 3: 187-199.(b)

Terzano MG; Parrino L; Spaggiari MC; Palomba V; Rossi M; Smerieri A. CAP variables and arousals as sleep electroencephalogram markers for primary insomnia. *Clinical Neurophysiology* 2003, 114: 1715-1723.

The Global Parkinson's Disease Survey (GPDS) Steering Committee. Factors Impacting on Quality of life in Parkinson's Disease: results from an International Survey. *Movement Disorder* 2002; 17(1):60-67.

Thomas RJ, Terzano MG, Parrino L, Weiss W. Obstructive sleep disorder breathing with a dominant cyclic alternating pattern – a recognizable polysomnographic variant with practical clinical implications. *Sleep* 2004; 27(2): 229-234.

Tolosa E, Compta y, Gig C. The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism and related Disorders* 2007; 13: S2-S7.

Tononi G. The neuro-biomolecular basis of alertness in sleep disorders. *Sleep Medicine* 2005; 6 (suppl 1): S8-S12.

Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Medicine Reviews* 2006; 10: 49-62.

Tuncel D, Tolun FI, Toru I. Serum insulin-like growth factor-1 and nitric oxide levels in Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation* 2009; ID:132464.

Ueda K, Nittono H, Hayashi M, et al. Estimation of generator sources of human sleep spindles by dipole tracing method. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2000; 54: 270-271.

Ueda K, Nittono H, Hayashi M, Hori T. Spatiotemporal changes of slow wave activities before and after 14Hz/12Hz sleep spindles during stage 2 sleep. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2001; 55: 183-184.

Valeikiene V, Ceremnych J, Alekna V, Juozulynas A. Differences in WHOQOL-100 domain scores in Parkinson's disease and osteoarthritis. *Medical Science Monitor* 2008; 14(4): 221-227.

Visser M, Leetjens AFG, Marinus J, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Reliability and Validity of Beck Depression Inventory in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 2006; 21(5):668-672.

Wang G, Cheng Q, Zeng J, Bai L, Liu GD, Zhang Y et al. Sleep disorders in chinese patients with Parkinson's disease: study of a chinese version of Parkinson's disease sleep scale. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 271:153-7. (a)

Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li Y-J, Züchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson's disease by overexpression of α -synuclein. *The American Journal of Human Genetics* 2008; 82:283-289. (b)

Wei HG, Rel E, Czeisler CA, Dijk D-J. Attenuated amplitude of circadian and sleep-dependent modulation of electroencephalographic sleep spindle characteristics in elderly human subjects. *Neuroscience Letters* 1999; 260:29-32.

Weinberg MS, Wood MJA. Short non-coding RNA biology and neurodegenerative disorders: novel disease targets and therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 2009; 18:R27-39.

Weintraub D, Stern MB. Psychiatric complications in Parkinson's disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 2005; 13: 844-851.

Wetter TC, Collado-Seidel V, Pollmächer T, Yassouridis A, Trenkwalder C. Sleep and periodic leg movement patterns in drug-free patients with Parkinson's disease and multiple atrophy. *Sleep* 2000; 23(3):1-7.

Wetter TC, Brunner H, Högl B, Yassouridis A, Trenkwalder C, Friess E. Increased alpha activity in REM Sleep de novo patients with Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2001; 16(5): 928-933.

Wider C, Dachsel JC, Soto AI, Heckman MG, Diehl NN, Yue M, Lincoln S, Aasly JO, Haugarvoll K, Trojanowski JQ, et al. FGF20 and Parkinson's disease: an association or pathogenicity via α -synuclein expression. *Movement Disorders* 2009; 24 (3): 455-459.

Xu K, Bastia E, Schwarzschild M. Therapeutic potential of adenosine A2a receptor antagonists in Parkinson's Disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 105:267-310.

Young A, Home M, Churchward T, Freezer N, Holmes P, Ho M. Comparison of sleep disturbance in mild versus severe Parkinson's disease. *Sleep* 2002; 25(2): 568-572.

Ziemssen T, Reichmann H. Non-motor Dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2007; 13: 323-332.

Zygierewicz J, Binowska KJ, Durka P, Szelemberger W, Niemcewicz A, Androsiuk W. High. Resolution study of sleep spindles. *Clinical Neurophysiology* 1999; 110: 2136-2147.

Capítulos: artigos e relatório de patente de invenção.

Capítulo 1.

**Psychometric properties of the Parkinson's Disease Sleep Scale -
Brazilian version**

(Artigo publicado: Parkinsonism and Related Disorders 2009; 15: 495-499).

Regina Margis^a, Karina Donis^a, Suzana Veiga Schönwald^b, Simone Chaves Fagundes^c,
Thais Monte^b, Pablo Martín-Martínez^d, K Ray Chaudhuri^e, Flávio Kapczinski^a, Carlos
R. M. Rieder^{a,b*}

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^bService of Neurology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^cService of Pneumology - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^dArea of Applied Epidemiology, National Center for Epidemiology, and CIBERNED; Carlos III
Institute of Public Health - Madrid, Spain

^eKings College/University Hospital Lewisham, Kings College and Institute of Psychiatry –
London, United Kingdom

Key words: PDSS-Brazilian Version, Parkinson's disease, sleep disorder.

Short Title: Brazilian version of Parkinson's Disease Sleep Scale

*Corresponding author: Carlos R. M. Rieder, Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, zip code: 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone:
+55-51-21018182; Fax: +55-51-32221954.

Abstract: Parkinson's Disease Sleep Scale (PDSS) is a specific scale for the assessment of sleep disturbances in subjects with Parkinson's Disease (PD). This cross-sectional study set out to validate the PDSS in a Brazilian Portuguese Version (PDSS-BR). Ninety-five patients with PD participated in the study; their PD symptoms were evaluated by Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS sections I-IV) and Hoehn and Yahr scale. Patients completed Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Epworth Sleepiness Scale (ESS), Beck Depression Inventory (BDI) and PDSS-BR. PDSS-BR internal consistency was satisfactory (Cronbach's α : 0.82; all PDSS-BR items were significantly and positively associated with total score). Test-retest reliability for total PDSS-BR score was 0.94. PDSS-BR score was highly correlated with sleep scales (PSQI, $r_s = -0.63$; $p < 0.0001$ and ESS, $r_s = -0.32$; $p = 0.001$) and moderately with UPDRS-sections I ($r_s = -0.38$, $p < 0.0001$) and II ($r_s = -0.36$, $p < 0.0001$) and BDI ($r_s = -0.55$; $p < 0.0001$). Depressive symptoms, as determined by the BDI, were associated with significantly worse quality of nocturnal sleep, as measured by the PDSS-BR.

The psychometric attributes of the PDSS-BR were satisfactory and consistent with those of previous studies. In summary, PDSS-BR can be useful for clinical and research purposes in Brazil.

1.Introduction

Sleep disturbances are a frequent problem in patients suffering from Parkinson's Disease (PD) [1,2]. A community-based study showed that nearly two-thirds of patients with PD reported sleep disturbances and one third rated their overall nighttime problems as moderate to severe [2]. Sleep complaints in patients with PD include: difficulty falling asleep, frequent awakenings (sleep fragmentation), early morning waking, nocturnal cramps, painful dystonia, nocturnal motor symptoms, nocturia, nocturnal confusion, hallucinations and daytime sleepiness [2,-6]. Some patients present with a combination of symptoms. It has been shown that during routine visits neurologists fail to identify sleep disturbance in 40% of patients [7]. Diagnosis and assessment of sleep problems are based on clinical history, caregivers' reports, questionnaires, sleep logs, polysomnography or videorecordings. Rating scales employed in clinical practice such as Epworth Sleepiness Scale (ESS) [8] and Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) [9] may be used for evaluation but do not systematically address and quantify different aspects of sleep disturbances in PD. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [10] contains one question (item 41) related to sleep disturbances.

Parkinson's Disease Sleep Scale (PDSS) [11] is a specific scale for the assessment of sleep disturbances in subjects with PD: it is a formal instrument for quantifying sleep problems in PD and can be easily administered in the clinic or at the bedside [12]. PDSS is a self-administered visual analogue scale addressing 15 symptoms associated with sleep disturbance. The first item evaluates the global quality of nocturnal sleep. Items 2

to 14 relate to the presence of nocturnal sleep (sleep onset and maintenance insomnia, nocturnal restlessness, nocturnal psychosis, nocturia, nocturnal motor symptoms and sleep refreshment) disturbances. Item 15 addresses somnolence during the day. Patients complete the PDSS based on their experiences over the previous week. Scores for each item range from always (0) to never (10), except for item 1, where scale ranges from awful (0) to excellent (10). The maximum score for the PDSS is 150 (patient is free from all symptoms). PDSS is available in several languages (English, German, Italian, Swedish, Spanish, Japanese) [12]. Translation of the original PDSS from English into a Brazilian Portuguese version was undertaken by our group in a previous study. In this translation study Cronbach's alpha was 0.85. Correlation coefficients between items were all positive and total score intraclass correlation coefficient was 0.88.

The present study was designed to validate a Brazilian version of the Parkinson's Disease Sleep Scale (PDSS-BR). Figure 1.

2. Subjects and Methods

This was an observational, cross-sectional study carried out at The Movement Disorders Clinic of a University Hospital in Southern Brazil from May 2007 to July 2008. All patients gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.1 Patients

Ninety-five patients fulfilling clinical criteria for PD (the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria) [13] were included in the study. Cognition was evaluated by Mini-Mental State Examination (MMSE) [14,15]. Patients had to have a MMSE score equal to or above 20 if they had no schooling and equal to or above 24 for subjects with some schooling [16].

2.2 Assessment

Patients in the study answered a questionnaire that included marital status, disease duration and drug record. PD symptoms were evaluated using Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [10], and Hoehn and Yahr modified version (HY) [17]. Sleep perception was assessed by UPDRS item 41, Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) [9,18] while somnolence was measured by the Epworth Sleepiness Scale (ESS) [8,19]. Depressive symptoms were assessed with the Beck Depression Inventory (BDI) [20,21].

In addition patients completed the Brazilian Version of the PDSS (PDSS-BR) (Figure 1) and a re-test evaluation was carried out on 42 patients $7,71 \pm 2,02$ days after the first assessment.

2.3 Data Analysis

The SPSS for Windows versions 12-14 (SPSS inc.) program was used for all analyses. Descriptive statistics were used as required. Comparison of score distributions between populations was assessed with the Mann-Whitney test. Cronbach's alpha [22], item-total (item-corrected correlation without contribution of the test item) and inter-item correlations (Spearman's rank correlation coefficients) were determined to ascertain internal consistency of PDSS-BR. Test-retest reliability was assessed by intraclass correlation coefficient (ICC). PDSS-BR factor analysis was carried out using the principal components method with varimax rotation.

Kruskal-Wallis analysis was used to evaluate the relationship between PDSS-BR and HY scores. Spearman's rank correlation coefficients were used to determine the association between total PDSS-BR score and other variables concerning sleep (ESS and PSQI), PD (UPDRS sections I-IV) and depressive symptoms (BDI). It was hypothesized *a priori* a high correlation ($r_s \geq 0.50$) between PDSS-BR and the other variables concerning sleep and a moderate correlation ($r_s = 0.35-0.50$) of the PDSS-BR with UPDRS and BDI (association levels as per Juniper et al [23]).

Patients were stratified into two groups according to the cutoff score proposed for depression screening in PD patients [24,25]. Stratified analysis was performed to evaluate differences between these two groups: group with BDI score below 14 ($BDI < 14$) and group with depressive symptoms evaluated by BDI with score equal to or above 14 ($BDI \geq 14$).

3.Results

Table 1 shows the sample characteristics. No significant differences in age, marital status, disease duration, MMSE, HY, UPDRS, PSQI and BDI were found between the sexes, but men showed higher ESS scores than women (Mann-Whitney test $p=0.013$). No significant differences in parameters were found between retest patients and the rest of the sample. Eighty-two (86.3%) patients were taking antiparkinsonian drugs: levodopa(80), pramipexole(19), amantadine (11), biperiden (6), entacapone (8) and tolcapone(3). Thirty-seven (45%) patients were taking a combination therapy. Eleven patients were taking benzodiazepines, thirty-one patients were on antidepressants and six patients were taking antipsychotic drugs.

Mean total PDSS score was 96.34 ± 29.65 (mean \pm standard deviation), ranging from 31 to 150; median, 93.3. There was a uniform score distribution across the range covered by the scale (93 different total scores in 95 patients). Mean item scores are shown in Table 2. For comparison, similar data from the original study by Chaudhuri and colleagues [11], from the Spanish Version Study by Martínez-Martín and colleagues [26], from the Japanese Study by Suzuki and colleagues [27] and from the Chinese Version Study by Wang and colleagues [28] are included in Table 2.

Cronbach's alpha for PDSS-BR was 0.82. All PDSS-BR items were significantly and positively associated with total PDSS-BR score, the items 1,3,4,5 and 12 showing the closest correlation ($r_s >0.6$; $p<0.01$) (Table 3). The highest inter-item correlation coefficient ($r_s =0.63$; $p<0.0001$) was observed between items 1 (overall quality of sleep)

and 3 (difficulty staying asleep). The lowest inter-item correlation coefficient ($r_s = 0.22$; $p = 0.04$) was found between item 4 (restlessness) and 13 (tremor on waking). ICC values obtained from the test-retest evaluation are shown in Table 3. Test-retest reliability for total PDSS-BR score was 0.94.

Factor analysis identified one principal factor that explained 31% of the variance. PDSS-BR items loading on the principal factor were items 1, 2, 3, 5, 8, 12, 14. Values lower than but close to 1.0 were found for three additional dimensions (items 6, 7, 10 and 13; 4, 9 and 15; and 11).

There was no significant relationship between total PDSS-BR scores and age, gender, marital status, MMSE, HY and number of dopaminergic drugs, or use of benzodiazepine, antipsychotic and antidepressant medication.

Concerning sleep evaluation, total PSQI score showed significant association with total PDSS-BR score ($r_s = -0.63$; $p < 0.0001$). Overall quality of nocturnal sleep assessed by PDSS-BR item 1 showed association with total PSQI score ($r_s = -0.61$; $p < 0.0001$). Epworth Sleepiness Scale was correlated with total PDSS-BR score at a moderate level ($r_s = -0.32$; $p = 0.001$). Falling asleep during the day (PDSS-BR item 15) was moderately associated with ESS ($r_s = -0.42$; $p < 0.0001$). Patients (45%) who reported sleep disturbances according to UPDRS item 41 showed lower PDSS-BR scores (87.75 ± 28.2 , mean \pm standard deviation) than patients who reported no sleep disturbances in this question (102.6 ± 29.2) (Mann-Whitney, $p = 0.02$).

Considering the UPDRS scale, we found a moderate association between the total PDSS-BR score and UPDRS-section I (cognition, behavior and mood symptoms, $r_s = -$

0.38, $p < 0.0001$) and UPDRS-section II (daily activities, $r_s = -0.36$, $p < 0.0001$). There was no significant association between UPDRS section III (motor symptoms) and PDSS-BR ($r_s = -0.11$); nor UPDRS-section IV (treatment complications) ($r_s = -0.18$). We found no significant association between the HY stage, and total PDSS-BR score. In summary, significant associations were found between total PDSS-BR scores and UPDRS sections I and II, but not with the HY or UPDRS motor section.

There was a high degree of correlation between depressive symptoms evaluated by BDI and total PDSS-BR scores ($r_s = -0.55$; $p < 0.0001$). Fifty-seven subjects showed $BDI < 14$. These patients (no depressive symptoms) showed statistically significant lower scores in UPDRS sections I and II, PSQI and ESS. They had significantly higher PDSS-BR total scores than the group with $BDI \geq 14$ (Table 4). Statistically significant differences between BDI groups were observed for nine PDSS-BR items (1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12, and 14); however, for the group with $BDI < 14$, total PDSS-BR scores maintained a significant association with PSQI ($r_s = -0.54$, $p < 0.0001$) and ESS ($r_s = -0.41$, $p = 0.001$). Within group $BDI \geq 14$, total PDSS-BR scores only showed a moderate but significant association with total PSQI ($r_s = -0.35$, $p = 0.03$) and UPDRS-section I ($r_s = -0.37$, $p = 0.02$). There was no significant relationship between BDI scores and gender, duration of disease and MMSE scores.

4. Discussion

Parkinson's Disease Sleep Scale is an instrument for sleep evaluation in PD patients. PDSS-BR's internal consistency (Cronbach's $\alpha = 0.82$) is considered

satisfactory for groups [22], and all items were significantly related to total PDSS-BR scores. Correlation coefficients between items were all positive, showing that scores for items lay in the same direction. The highest inter-item correlation coefficient ($r_s = 0.63$; $p < 0.0001$) was observed between items 1 (overall quality of sleep) and 3 (difficulty staying asleep); similar results have been obtained in previous studies [11,26]. Test-retest reliability for total PDSS-BR scores was high (ICC = 0.94); again, similar results were obtained by Chaudhuri and colleagues [11] and Martínez-Martín and colleagues [26], although each item coefficient was higher in Martínez-Martín's study [26]. This difference may be related to the moment of retest evaluation and possible partial response recall. Discrepancies previously identified by Chaudhuri and colleagues [11] and Martínez-Martín and colleagues [26] studies for items 12 and 15 were not observed between our study and the Martínez-Martín study. Some differences can be identified between studies as in original study by Chaudhuri and colleagues [11], in Spanish Version Study [26], in Japanese Study [27] and in Chinese Version Study [28]. This suggests that some discrepancies in mean scores might be explained by different sample compositions.

An exploratory factor analysis identified a principal factor that explained 31% of the variance. This dimension comprises sleep quality, perception of sleep onset difficulties and maintenance insomnia, and two other manifestations (fidgeting and passing urine) potentially interfering with sleep onset and maintenance. This dimension also comprises perception of well-being upon waking (painful posturing and degree of sleep refreshment) which may be consequent to sleep onset and maintenance patterns.

As expected, PDSS showed significant association with PSQI and ESS, denoting the robustness of PDSS Brazilian version. PDSS-BR results were also consistent with patients' reports of sleep disturbances according to the only UPDRS item (41) that evaluates sleep.

No significant correlations were found between PDSS-BR and motor symptoms assessed by UPDRS-III. Chaudhuri and colleagues [11] identified different PDSS scores between subjects with early/moderate and advanced disease. Similar results could not be observed in the current study, one possible reason being that only 10 patients were in advanced HY stages. Moreover, it should be noted that motor manifestations as per PDSS (fidgeting, legs restlessness and early morning tremor) do not equal motor symptoms evaluated by UPDRS-III. It is also necessary to consider that other aspects may interfere with subjective sleep evaluation, such as environmental and behavioural factors, other clinical conditions and mood disorders.

Beck Depression Inventory groups showed association between PDSS-BR and PSQI, but this was more evident for $BDI < 14$. Within this subject category an association was also seen between PDSS-BR and ESS. Considering the $BDI \geq 14$ group, a moderate inverse association was shown between PDSS-BR and UPDRS-section I. As this section evaluates cognitive, behavioural and mood, it is reasonable to have observed this finding in this group. Whole sample evaluation had shown an inverse correlation between PDSS-BR and UPDRS-section II (daily activities), but this correlation was not maintained after stratified analyses. This result may be explained by the sample size in each BDI group ($BDI < 14$ and $BDI \geq 14$ groups composed by 57 and 38 subjects, respectively). Statistical differences between BDI groups were observed for

several PDSS-BR items. This can be explained by the fact that many manifestations such as poor sleep quality, sleep onset difficulties, maintenance insomnia, distressing dreams, hallucinations and unrefreshing sleep may be observed in patients with depressive symptoms. Altogether, these findings reinforce the notion that depressive symptoms may interfere in sleep perception/evaluation, and need to be identified and treated in PD patients.

In conclusion, PDSS, a tool for measuring sleep disturbances in PD, has been successfully validated into Brazilian Portuguese. Psychometric attributes of the PDSS-BR were satisfactory and consistent with those of previous studies. PDSS-BR can be useful for clinical and researches purposes in Brazil.

Table 1: Descriptive Statistics

Measure	%	Mean	SD	Min	Max
Men	49.5				
Age at study (y)		64.65	11.46	33	86
MMSE		27.13	2.54	20	30
Duration of disease (yr)		7.33	5.17	1	31
UPDRS-I		2.54	2.38	0	10
UPDRS-II		14.38	8.26	0	40
UPDRS-III		27.26	15.58	4	68
UPDRS-IV		3.48	3.83	0	15
PSQI		8.48	4.56	0	19
ESS		7.74	4.82	0	21
BDI		12.7	8.28	1	47
HY 1	16.8				
HY 1,5	4.2				
HY 2	38.9				
HY 2,5	9.5				
HY 3	20.0				
HY 4	7.4				
HY 5	3.2				

Total n=95 patients. SD, standard deviation; Min, minimum; Max, maximum; MMSE, Mini-Mental State Examination; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (section I-IV); PSQI, Pittsburg Sleep Quality Index; ESS, Epworth Sleepiness Scale; BDI, Beck Depression Inventory; HY: Hoehn-Yahr stage.

Table 2. Total and individual item scores for the Parkinson's Disease Sleep Scale

PDSS Items	Current study (n= 95)		Chaudhuri et al ¹¹ (n=143)		Martinez- Martin et al ²⁶ (n=100)		Suzuki et al ²⁷ (n=188)		Wang et al ²⁸ (n=126)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1.Overall quality	5.73	3.24	5.90	2.70	5.20	2.76	6.4	3.4	6.96	2.34
2.Falling asleep	6.07	3.81	7.60	2.50	6.15	3.29	7.4	3.4	7.13	2.96
3.Staying asleep	5.68	3.94	5.80	2.90	4.29	3.47	5.7	3.7	6.99	3.12
4.Restlessness	6.23	4.07	6.70	2.70	6.39	3.07	8.6	2.6	7.96	2.84
5.Fidgeting	4.75	4.07	6.40	2.90	6.52	3.18	8.4	2.7	8.20	2.66
6.Distressing dreams	7.23	3.29	7.40	2.60	7.72	2.18	7.9	2.9	7.37	3.05
7.Distressing hallucination	8.76	2.6	8.20	2.20	8.71	1.26	8.5	2.8	9.02	2.40
8.Passing urine	2.69	3.67	2.80	2.94	4.20	2.80	4.2	3.8	5.71	3.66
9.Incontinence of urine	8.62	2.83	8.50	1.80	8.07	2.18	8.7	2.4	9.48	1.75
10.Numbness or tingling	7.29	3.63	7.30	2.60	6.42	2.81	8.4	2.9	8.39	2.97
11.Painful cramps	7.15	3.4	6.70	2.80	7.05	2.66	8.5	2.4	8.67	2.93
12.Waking with painful posturing	5.72	4.3	7.80	2.50	6.23	2.95	8.5	2.7	8.32	3.02
13.Tremor on waking	5.82	4.19	7.00	2.80	6.72	3.18	7.4	3.4	8.94	2.10
14.Tired after waking	5.96	4.03	6.30	2.90	6.00	3.37	7.0	3.3	7.42	3.23
15.Unexpectedly asleep	8.07	3.2	5.40	3.00	8.57	1.56	7.2	3.3	7.75	2.93
PDSS Total Score	96.34	29.65	101.10	21.70	96.89	20.45	112.8	25.4	118.38	26.07

PDSS, Parkinson's Disease Sleep Scale; SD, standard deviation

Table 3. Item-total correlation and test-retest reliability of Parkinson's Disease Sleep Scale

PDSS Item	r_s^*	ICC
1.Overall quality	0.68	0.79
2.Falling asleep	0.57	0.89
3.Staying asleep	0.70	0.87
4.Restlessness	0.62	0.72
5.Fidgeting	0.66	0.81
6.Distressing dreams	0.58	0.53
7.Distressing hallucination	0.47	0.95
8.Passing urine	0.34	0.95
9.Incontinence of urine	0.37	0.96
10.Numbness or tingling	0.50	0.78
11.Painful cramps	0.39	0.67
12.Waking with painful posturing	0.75	0.81
13.Tremor on waking	0.50	0.91
14.Tired after waking	0.59	0.83
15.Unexpectedly asleep	0.35	0.89
PDSS Total Score	--	0.94

PDSS, Parkinson's Disease Sleep Scale r_s , Spearman rank correlation coefficient; ICC, intraclass correlation coefficient; *p<0.01.

Table 4. Comparison of variables scores according to depressive symptoms level.

	BDI <14		BDI ≥ 14		<i>p-value</i>
	(n:57)		(n:38)		
	Mean	(SD)	Mean	(SD)	
Disease Duration	7	(4,5)	7,9	(6,0)	0.4
UPDRS_I	1,8	(1,9)	3,6	(2,6)	0.001
UPDRS II	11,9	(7,5)	18	(8,0)	0.001
UPDRS III	25	(15,7)	30,7	(14,8)	0.08
UPDRS IV	2,4	(3,0)	1,3	(0,9)	0.001
PSQI	6,8	(3,9)	11	(4,4)	0.001
ESS	6,7	(4,3)	9,2	(5,2)	0.013
PDSS-BR Total	107,3	(27,8)	80	(24,0)	0.001

SD, standard deviation; BDI, Beck Depression Inventory; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (section I-IV); PSQI, Pittsburg Sleep Quality Index; ESS, Epworth Sleepiness Scale; PDSS-BR, Brazilian Version of the Parkinson's Disease Sleep Scale.

References

- [1]Lees AJ, Blackburn NA, Campbell, V. The Nighttime Problems of Parkinson's Disease. *Clin Neuropharmacol* 1988;11(6):512-9.
- [2]Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;13(6):895-9.
- [3]Stocchi F, Barbato L, Nordera G, Berardelli A, Ruggieri S. Sleep disorders in Parkinson's Disease. *J Neurology* 1998; 245 (suppl 1):S15-S18.
- [4]Young A, Horne M, Churchward T, Frezzer N, Holmes P, Ho M. Comparison of sleep disturbance in mild versus severe Parkinson's Disease. *Sleep* 2002; 25(5):568-72.
- [5]Dauvilliers Y. Insomnia in patients with neurodegenerative conditions. *Sleep Med* 2007; 8 Suppl 4: S27-34.
- [6]Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008;15 Suppl 1:14-20.
- [7]Shulman LM, Taback RL, Rabinstein AA, Weiner WJ. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2002; 8:193-7.
- [8]Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991;14(6):540-5.

[9] Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice research. *Psychiatry Research* 1989;28:193-213.

[10]Fahn S, Elton RL and Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information, 1987. p 153-63.

[11]Chaudhuri, KR; Pal, S; DiMarco, A; Whately-Smith, C; Bridgman, K; Mathew, R; et al . The Parkinson's disease sleep scale: a new instrument for assessing sleep and nocturnal disability in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73(6):629-35.

[12]Dhawan V, Healy DG, Pal S, Chaudhuri KR. Sleep-related problems of Parkinson's disease. *Age and Ageing* 2006;35: 220-8.

[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 Psychiatr* 1992;55:181-4.

[14]Folstein M., Folstein S., McHugh P. "Mini Mental State": A practical method for grading the cognitive states of patients for the clinician. *J Psy Res* 1975;12:189-98.

- [15] Bertolucci PFH, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O miniexame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr* 1994;52: 1-7.
- [16] Almeida, OP. Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:605-12.
- [17] Hoehn MH, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-47.
- [18] Bertolazi AN, Fagundes SC, Perin C, Schonwald SV, John AB, De Barba M, et al. Validation of the Pittsburgh sleep quality index in the Brazilian Portuguese language. *Sleep* 2008, 31: A347.
- [19] Bertolazi AN, Fagundes SC, Perin C, Schonwald SV, John AB, Miozzo I, et al. A. Validation of the Epworth Sleepiness Scale in the Brazilian Portuguese language. *Sleep* 2008, 31: A347,
- [20] Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961,4:561-71.
- [21] Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck depression inventory and the State-Trait anxiety inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996, 29: 453-7.

[22]Bland JM, Altman DG. Cronbach's alpha. Br J Med J 1997; 314:572.

[23]Juniper EF, Guyatt GH, Jaeschke R. How to develop and validate a new health-related quality of life instrument. In: Spilker B, editor. Quality of life and pharmacoeconomics in clinical trials, 2nd edit. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 49-56.

[24]Visser M, Leetjens AFG, Marinus J, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Reliability and validity of the Beck Depression Inventory in patients with Parkinson's disease. Mov Disord 2006; 21:668-72.

[25]Schrag A, Barone P, Brown RG, Leetjens AFG, McDonald WM, Starkstein S, et al. Depression Rating Scales in Parkinson's Disease: Critique and Recommendations Mov Disord 2007; 22(8):1077-92.

[26]Martinez-Martín P, Salvador C, Menéndez-Guisasola L, González S, Tobias A, Almazán J, et al. Parkinson's disease sleep scale: validation study of a Spanish Version. Mov Disord, 2004; 19: 1226-32.

[27]Suzuki K, Okuma Y, Hattori N, Kamei S, Yoshii F, Utsumi H et al. Characteristics of sleep disturbances in Japanese patients with Parkinson's disease. A study using Parkinson's Disease Sleep Scale. Mov Disord, 2007; 22:1245-51.

[28]Wang G, Cheng Q, Zeng J, Bai L, Liu GD, Zhang Y et al. Sleep disorders in Chinese patients with Parkinson's disease: study of a Chinese version of Parkinson's Disease Sleep Scale. *J Neurol Sci*, 2008; 271:153-7.

Capítulo 2.

WHOQOL-OLD assessment of quality of life in elderly patients with Parkinson's disease: influence of sleep and depressive symptoms

Qualidade de vida (WHOQOL-OLD) em idosos com doença de Parkinson: influência de sintomas do sono e depressivos

(Artigo publicado: Revista Brasileira de Psiquiatria 2010; 32(2): 125-131)

Regina Margis,¹ Karina Carvalho Donis,¹ Suzana Veiga Schönwald,² Carlos R. M. Rieder^{1,2}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Regina Margis.

R. Marques do Pombal, 1824/102. 90540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: regina.margis@terra.com.br

Abstract

Objective: Parkinson's disease is a neurodegenerative disease with a number of motor and non-motor features that can affect quality of life. In this study, we aimed to assess quality of life, as well as to evaluate the potential determinants of quality of life, such as sleep quality, motor and depressive symptoms, in elderly patients with Parkinson's disease. **Method:** This was a cross-sectional study in which we applied the World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults in 57 Parkinson's disease patients over 60 years of age. **Results:** Total World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults score was found to be associated with Parkinson's disease severity ($r_s = -0.43$; $p \leq 0.001$). World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults scores for sensory abilities (facet 1) and social participation (facet 4) were higher among the patients with mild Parkinson's disease than among those in the more advanced stages ($r_s = -0.43$; $p \leq 0.001$). Facet 1 scores were found to be associated with Pittsburgh Sleep Quality Index and Parkinson's Disease Sleep Scale score ($r_p = -0.46$ and $r_p = 0.41$; $p < 0.001$, respectively). The Geriatric Depression Scale score showed an association with the total score on the World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults ($r_p = -0.70$; $p < 0.001$) **conclusion:** Quality of life in Parkinson's disease patients can be assessed by the World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults. Greater Parkinson's disease severity can worsen patient quality of life, as can the presence of depressive symptoms.

Descriptors: Quality of life; Parkinson Disease; Depression; Sleep; Aged

Resumo

Objetivo: A doença de Parkinson é uma enfermidade neurodegenerativa com diversas manifestações motoras e não-motoras que podem provocar impacto na qualidade de vida. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de vida em pacientes com doença de Parkinson com idade superior a 60 anos por meio do questionário *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* e possíveis fatores determinantes, tais como qualidade de sono, sintomas motores e depressivos. **Método:** Foi realizado estudo transversal avaliando a qualidade de vida pelo questionário *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* em 57 pacientes com doença de Parkinson. **Resultados:** *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* total apresentou associação com a severidade da doença de Parkinson ($r_s = -0,43$; $p \leq 0,001$). As facetas de habilidade sensorial e de participação social apresentaram maior pontuação nos indivíduos com estágio leve em comparação ao grupo com doença de Parkinson avançada. *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* (faceta-I) apresentou associação com Índice de Qualidade de Sono de Pittsburg e Escala de Sono na Doença de Parkinson ($r_p = -0,46$ e $r_p = 0,41$; $p < 0,001$, respectivamente). A Escala Geriátrica de Depressão apresentou associação com *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* ($r_p = -0,70$; $p < 0,001$). **Conclusão:** A

qualidade de vida em pacientes com doença de Parkinson pode ser avaliada pelo questionário *World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults* e foi demonstrado que a severidade da doença de Parkinson e os sintomas depressivos podem comprometer negativamente a qualidade de vida.

Descritores: Qualidade de vida; Doença de Parkinson; Depressão; Sono; Idoso

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease affecting 1.8-3.3% of subjects 65 years of age or older.^{1,2} Patients with PD are characterized with motor symptoms—resting tremor, bradykinesia, rigidity and loss of postural reflexes³—as well as with non-motor symptoms—autonomic and sensory dysfunction, sensory and neuropsychiatric manifestations.⁴ The most common non-motor symptoms include sleep disturbances (fragmented sleep, painful dystonia, muscle cramps, motor symptoms, and daytime sleepiness) and depression.⁴⁻⁷

In PD patients, disability can result from distinct features such as motor impairment, non-motor complications,^{4,8} and treatment side effects. Studies have shown that PD-related motor symptoms,⁹⁻¹³ affective disorder,¹³⁻¹⁷ and cognitive dysfunction¹⁴ can be determinants of quality of life. According to the World Health Organization (WHO), quality of life (QOL) is “individuals' perception of their position in life in the context of the culture and value systems in which they live and in relation to their goals,

expectations, standards and concerns”.¹⁸ Studying quality of life in elderly people might require attention to particular characteristics of this population.

The WHO Quality of Life Assessment for Older Adults (WHOQOL-OLD) was originally developed by the WHOQOL group for the investigation of quality of life in older adults.¹⁹ It consists of six facets: sensory abilities; autonomy; past, present and future activities; social participation; (thoughts on) death & dying; and intimacy.

The present study aimed to assess quality of life, as well as to evaluate its possible determinants (such as sleep quality, motor symptoms and depressive symptoms), in PD patients over 60 years of age.

Method

This was an observational, cross-sectional study carried out between May 2007 and July 2008 at the Movement Disorders Clinic of the Porto Alegre *Hospital de Clínicas*, located in the city of Porto Alegre, Brazil, and operated by the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The study design was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital, and all patients gave written informed consent.

1. Patients

We included consecutive patients diagnosed with PD according to the United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria.³ Clinical

interviews were conducted in order to determine whether patients met the inclusion criteria. Exclusion criteria were being below the age of 60 and presenting a low score on the Mini-Mental State Examination (MMSE).^{20,21} A low MMSE score was defined as below 20 for illiterate subjects and below 24 for subjects with any schooling.²²

2. Assessment

Patients were selected for assessment on the basis of their scores on questionnaires evaluating disease severity—the Hoehn and Yahr Scale²³ and the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS)²⁴—as well as on the basis of general clinical findings. Somnolence was measured by the Epworth Sleepiness Scale.^{25,26} Sleep quality was evaluated by the Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI)^{27,28} and the Parkinson’s Disease Sleep Scale (PDSS).^{29,30} Depressive symptoms were measured with the Portuguese-language version of the 30-item Geriatric Depression Scale (GDS30), which has been validated for use in Brazil.³¹⁻³³

The WHOQOL-OLD^{19,34} comprises 24 items (rated on a five-point Likert scale), divided into six facets. Facet 1 evaluates sensory abilities based on the following items: sensory impairment (taste, smell, sight, hearing and touch) affecting daily life; a loss of sensory abilities that affects participation in activities; problems with sensory functioning affecting social interaction; and rating of sensory functioning. Facet 2 evaluates autonomy based on the following items: freedom to make decisions; feeling in control of one’s future; people around oneself being respectful of one’s freedom; ability to do things one would like to do. Facet 3 includes questions regarding past, present and future activities in order to determine the following: satisfaction with the current

availability of opportunities to achieve goals; having received the recognition one deserves in life; satisfaction with what one has achieved in life; and confidence that one has things to look forward to. Aspects of social participation are evaluated in facet 4: perception that one has a sufficient number of activities to perform each day; satisfaction with the way in which one is using one's time; perception of an appropriate activity level; and satisfaction with the number of opportunities one has to participate in community activities. Facet 5 evaluates the attitudes an individual has toward death & dying: concerns regarding the way in which one will die; fear of not being able to control one's own death; fear of dying itself; and fear of a painful death. Facet 6 includes questions related to intimacy in order to determine the following: feeling a sense of companionship in life; experiencing love in life; having opportunities to love; and having opportunities to be loved. Higher scores indicate better quality of life in each domain. This questionnaire was administered on a face-to-face basis, and the period assessed was the previous two weeks. The WHOQOL-OLD was validated for use in Brazil by Fleck et al.³⁴

The UPDRS is a composite scale consisting of six sections, in which most of the items are rated from zero (normal) to four (severely affected): part I (UPDRS-I) consists of four items, assessing mentation, behavior and mood; part II (UPDRS-II) consists of thirteen items describing the ability to perform a number activities of daily living, as well as ratings of any difficulty walking, tremor, and sensory symptoms; part III (UPDRS-III) is a fourteen-item rating of motor signs based largely on items in the Columbia Disability scale; part IV (UPDRS-IV) rates complications of therapy, including questions regarding the duration/severity of dyskinesias and motor

fluctuations, together with a three-item section concerning anorexia, sleep disturbance and orthostatic hypotension—some UPDRS-IV items are rated as present or absent; part V (UPDRS-V) is a modified version of the Hoehn and Yahr scale; and part VI (UPDRS-VI) is a disability scale, estimating the degree of dependency in activities of daily living.

3. Data analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results are expressed as mean \pm standard deviation. The WHOQOL-OLD scores were linearly transformed in order to range from 0 to 100. The normal distribution of all variables was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. Most variables were not significant on the Kolmogorov-Smirnov test, the exceptions being UPDRS-I score, UPDRS-IV score and disease duration. The ratings of PD severity were based on the Hoehn and Yahr scale: patients with scores from 1 to 1.5 were classified as having mild PD; those with scores from 2 to 2.5 were classified as having moderate PD; and those with scores from 3 to 5 were classified as having advanced PD. In order to compare those groups (stratified by PD severity), we used one-way analysis of variance, followed by Dunnett's T3 post hoc test for UPDRS-III and Tukey's post hoc test for other variables.

On the basis of the UPDRS-III scores, we divided the patients into three groups by PD type: the akinetic rigid type (ART) group; the tremor-dominant type (TDT) group; and the mixed type (MT) group. We then calculated a score for each group, as

previously described.³⁵ The tremor score was derived from the sum of UPDRS-III items 20 (tremor at rest) and 21 (postural tremor) divided by seven (the number of sub-items included). The non-tremor score was derived from the sum of the UPDRS-III items 18 (speech), 19 (facial expression), 22 (rigidity), 27 (arising from chair), 28 (posture), 29 (gait), 30 (postural stability) and 31 (body bradykinesia) divided by twelve (the number of sub-items included) for each body region. Patients with a non-tremor score at least twice as high as the tremor score were classified as having ART PD, whereas those with a tremor score at least twice as the non-tremor score were classified as having TDT PD. The remaining patients were classified as having MT PD. The Kruskal-Wallis test was used to compare variables among these groups.

Spearman's correlation coefficient (r_s) was used to test whether the WHOQOL-OLD score was associated with the UPDRS-I score, UPDRS-IV score or disease duration. Pearson's correlation coefficient (r_p) was used to evaluate association between WHOQOL-OLD and other variables.

Patients were divided into two groups (PD with depression and PD without depression) according to the GDS30 cutoff score of 10 proposed for depression screening in PD.³⁶ A GDS30 score ≥ 10 indicates the presence of depressive symptoms. Differences between those two groups were analyzed by Student's t-test. Values of $p < 0.05$ were assumed to indicate statistical significance in all tests.

Results

Fifty-seven patients were evaluated. Of those, 53% were male. In the sample as a whole, the mean age was 70.3 (standard deviation = 6.8) years (range, 60-86 years), the mean MMSE score was 26.8 (sd = 2.7) and the mean disease duration was 7.5 (sd = 5.8) years (range, 1-31 years). Most (73.7%) of the patients were married, the remaining patients being either single (7%), widowed (5.3%) or divorced (14%). Forty-nine patients (86%) were taking at least one antiparkinsonian drug (levodopa, pramipexole, amantadine, biperiden, entacapone or tolcapone); 14 were receiving some combination of these drugs. Nine patients (15.8%) were receiving benzodiazepines, 17 (29.8%) were receiving antidepressants, and four (7%) were taking an antipsychotic drug. Age did not differ significantly among the PD severity groups. The most common PD subtype was MT (in 47.4%), followed by ART (in 43.9%) and TRT (in 8.8%). Motor symptoms of PD (UPDRS-III scores), sleep measures and GDS30 scores are shown in Table 1.

Quality of life (total WHOQOL-OLD score) showed an inverse association with PD severity ($r_s = -0.43$; $p \leq 0.001$) and was worse in advanced compared to mild disease ($p = 0.01$). Sensory abilities and social participation facets scored higher in mild PD than in the advanced PD group (Table 1). In terms of social participation (WHOQOL-OLD facet 4 scores), a significant difference was observed among the ART, TDT and MT groups ($p = 0.03$), scores being lowest in the ART group. There were also significant differences among those same three groups regarding the UPDRS-III and UPDRS-IV scores ($p = 0.04$ and $p = 0.01$, respectively). Facet score correlations with total

WHOQOL-OLD score and UPDRS part scores are presented in Table 2. Scores for the WHOQOL-OLD facets 1, 3 and 4 showed inverse correlations with all UPDRS part scores, as did the total WHOQOL-OLD score. Scores for facets 2 and 6 also showed inverse correlations with the UPDRS-I score. In other words, cognition, behavior and mood symptoms (UPDRS-I score) showed an inverse association with most WHOQOL-OLD facets. Facet 5 scores did not show any correlation with PD severity or UPDRS part scores. In this sample, the WHOQOL-OLD scores did not correlate significantly with age, gender, disease duration or MMSE score.

In our patient sample, sleep measures did not differ significantly among the PD severity groups (Table 1). In terms of quality of life, only the scores for WHOQOL-OLD facets 1 and 2 correlated significantly with sleep measures. In fact, the scores for facet 1 showed associations with PSQI and PDSS scores ($r_p = -0.46$ and $r_p = 0.41$, respectively, $p < 0.001$ for both), whereas those for facet 2 (autonomy) showed an inverse association with PSQI ($r_p = -0.37$; $p < 0.01$).

Depressive symptoms, as evaluated by the GDS30, were negatively correlated with total WHOQOL-OLD score ($r_p = -0.70$; $p < 0.001$), denoting a strong association between depressive symptoms and quality of life. The correlations between WHOQOL-OLD facet scores and the GDS30 score are presented in Table 2. Five facet scores showed an inverse association with the GDS30 score. Significant associations were also observed between the GDS30 score and UPDRS part scores (UPDRS-I: $r_s = 0.51$, $p < 0.001$; UPDRS-II: $r_p = 0.43$, $p = 0.001$; UPDRS-III motor symptoms: $r_p = 0.29$, $p = 0.03$ and UPDRS-IV treatment complications: $r_s = 0.53$, $p < 0.001$). Twenty-eight subjects showed depressive symptoms ($GDS30 \geq 10$). Comparisons of variable scores by GDS30

cut-off point are presented in Table 3. Patients with depressive symptoms showed statistically significant worse quality of life than did those without ($p = 0.001$). The GDS30 ≥ 10 group showed statistically significant worse scores for WHOQOL-OLD facets 1, 2, 3 and 6, facets 4 and 5 showing a trend towards significance. The GDS30 ≥ 10 group showed worse results than did the GDS30 < 10 group in terms of the PSQI score ($p = 0.002$) and PDSS score ($p = 0.01$). The GDS30 scores did not show any significant relationship with age, gender or MMSE score.

Discussion

The results of the present study show that PD has an impact on quality of life, as evaluated by the WHOQOL-OLD, and this is consistent the findings of with previous studies using questionnaires that are less age-specific.^{12,14,15,37-39} In our study, patients in the advanced stages of PD (Hoehn and Yahr score 3-5) showed worse quality of life than did those with mild PD. Although various factors can be involved, it should be borne in mind that patients with advanced PD present a number of motor limitations. Some studies have indicated that postural instability, gait difficulties⁴⁰ and motor complications (dyskinesia and fluctuation)¹³ are predictors of health-related quality of life. In the present study, total WHOQOL-OLD scores showed an inverse association with all UPDRS part scores.

A previous study conducted by our group evaluated quality of life in PD patients using the brief (26-item) version of the WHOQOL (WHOQOL-BREF), a multidimensional scale comprising physical, psychological, social relationships and

environment domains. In the PD patients, there was a moderate inverse correlation between the WHOQOL-BREF psychological domain score and disease duration, as well as between the WHOQOL-BREF social domain score and disease severity (assessed by the Hoehn and Yahr scale).¹⁰ In another study, PD patients were evaluated by the 100-item version of the WHOQOL (WHOQOL-100); scores for the level of independence and physical capacity domains of the WHOQOL-100 were found to be inversely associated with quality of life.³⁹

In the present study, the association between worse quality of life and PD symptoms was significant for features related to the perception of sensory impairment interfering with routine and social interaction, for general satisfaction with achievements (past, present and future) and with social participation. In addition, differences were observed among ART, TDT and MT groups in terms of the WHOQOL-OLD domain 4 scores. Although previous studies have demonstrated that these PD subtypes have different courses,^{41,42} ours is the first to show that the level of social participation differs among them.

We found that aspects such as freedom to make decisions, feeling in control of one's own future, people around oneself being respectful of one's freedom and ability to do things one would like to do showed an inverse association with sensory abilities, although not with activities of daily living or motor symptoms. In a previous study, disability (UPDRS-II score) was weakly correlated with the total score on the 39-item Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39).¹³ The absence of such an association in the present study might be attributed to the autonomy concept applied. It could be argued that the UPDRS-II evaluates activities of daily living considering motor

autonomy, whereas the WHOQOL-OLD autonomy facet seems to explore mainly subjective perceptions of autonomy and freedom.

Although PD is primarily considered in terms of motor disability, non-motor symptoms, such as sleep disturbances and depression, can be major quality of life determinants.^{4,8,17,42} Therefore, various manifestations can have a negative effect on quality of life.^{13,37,38} This underscores the notion that non-motor symptoms should be evaluated. In the present study, a quality of life score related to sensory abilities (WHOQOL-OLD facet 1) was found to be associated with sleep measures. Olfactory and sleep disturbances can both be observed in PD patients.⁴ However, the above-mentioned results might not be attributed specifically to olfactory disturbance, since Facet 1 questions do not distinguish among senses. This remains an interesting point to be evaluated in future research.

Another of the non-motor manifestations evaluated in the present study was the occurrence of depressive symptoms which, as would be expected, was strongly correlated with worse quality of life. Patients with depressive symptoms showed worse scores in four facets: sensory abilities; past, present and future activities; autonomy; and intimacy. Other authors have assessed quality of life in PD with different instruments, such as the Medical Outcomes Study 36-item Short-form Health Survey¹⁵ and the PDQ-39.^{12-14,17,37} Those studies showed that depression has an influence on quality of life, lending further credence to the idea that mood disorders must be actively investigated and treated in PD patients.

One study,¹³ also conducted in Brazil, demonstrated that the principal determinants of health-related quality of life in elderly PD patients are mood disorders (as shown in the present study), disability, PD complications and years of education. It is of note that, in the present study, scores for the UPDRS parts related to death & dying and to intimacy did not correlate significantly with PD severity. Although no conclusions can be drawn from this isolated finding, it highlights the fact that quality of life is a broad concept, susceptible to interference from several factors.

This study has some limitations, primarily the fact that it was uncontrolled. It might have been useful to evaluate a control group composed of healthy subjects or of patients with chronic disease. Another limitation was the small sample size. In particular, the small size of the TDT subgroup limited the statistical analyses. Due to these limitations, our findings cannot be generalized to the PD patient population at large, and further studies are warranted. However, despite these shortcomings, this is, to our knowledge, the first study to employ the WHOQOL-OLD in the investigation of quality of life in PD.

Conclusion

Here, we have shown that quality of life in older PD patients can be successfully assessed with an age-specific questionnaire, as well as that disease severity and depression can be determinants of poor quality of life in elderly PD patients.

Table 1 - Sleep characteristics, depressive symptoms and quality of life according to PD severity

Score	HY Stage				p
	All subjects (n = 57)	Mild (n = 12)	Moderate (n = 26)	Advanced (n = 19)	
		HY1 (n = 9) and HY1.5 (n = 3)	HY2 (n = 19) and HY2.5 (n = 7)	HY3 (n=10), HY4 (n=6) and HY5 (n=3)	
UPDRS part III (motor signs)	28.5 ± 16.2	11.7 ± 6.4*	25.8 ± 10.9)**	42.8 ± 14.7)***	0.02
PSQI	9.3 ± 4.6	8.6 ± 4.7)*	9.3 ± 4.6)*	9.7 ± 4.7*	0.8
ESS	7.8 ± 4.4	5.5 ± 3.4)*	8.8 ± 4.5)*	7.8 ± 4.5)*	0.09
PDSS	91.5 ± 29.7	95.5 ± 25.1)*	88.1 ± 29.3)*	93.6 ± 7.7)*	0.7
GDS30	11.0 ± 6.7	6.7 ± 3.1)*	10.6 ± 6.8)* **	14.2 ± 6.8)**	0.007
WHOQOL- OLD					
Sensory abilities	60.8 ± 23.7	77.6 ± 16.5)**	58.2 ± 24.4)*	53.9 ± 22.4)*	0.02
Autonomy	61.3 ± 16.4	66.1 ± 13.4)*	60.6 ± 15.5)*	59.2 ± 19.2)*	0.5
Past, present and future activities	66.0 ± 18.4	70.8 ± 13.7)*	68.0 ± 20.6)*	60.2 ± 17.2)*	0.3
Social participation	58.3 ± 20.8	70.3 ± 14.1)**	60.1 ± 21.0)* **	48.3 ± 20.1)*	0.01
Death & dying	67.5 ± 25.2	71.9 ± 21.7)*	71.9 ± 22.7)*	58.9 ± 29.3)*	0.2
Intimacy	70.2 ± 20.2	79.2 ± 10.4)*	68.3 ± 23.4)*	67.1 ± 19.3)*	0.2
Total	63.9 ± 14.0	72.6 ± 9.7)**	64.5 ± 15.0)* **	57.6 ± 12.2)*	0.01

HY = Hoehn and Yahr (scale); UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale; PSQI = Pittsburg Sleep Quality Index; ESS = Epworth Sleepiness Scale; PDSS = Parkinson's Disease Sleep Scale; GDS30 = 30-item Geriatric Depression Scale; WHOQOL-OLD = World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults.

, ** and * indicate statistically significant differences between groups.*

Table 2 - Correlations between World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults scores, Parkinson's disease scores and depressive symptoms scale score

WHOQOL-OLD score	Score						
	Total WHOQOL-OLD	UPDRS I	UPDRS II	UPDRS III	UPDRS IV	HY	GDS30
	r_p	r_s	r_p	r_p	r_s	r_s	r_p
Domain 1							
Sensory abilities	0.64	-0.37	-0.50	-0.41	-0.30	-0.31	-0.52
Domain 2							
Autonomy	0.66	-0.53	NS	NS	-0.47	NS	-0.61
Domain 3							
Past, present and future activities	0.84	-0.28	-0.29	-0.31	-0.39	-0.31	-0.52
Domain 4							
Social participation	0.79	-0.28	-0.39	-0.42	-0.39	-0.43	-0.44
Domain 5							
Death & dying	0.45	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Domain 6							
Intimacy	0.70	-0.26	NS	NS	NS	NS	-0.56
Total	1.00	-0.35	-0.39	-0.37	-0.38	-0.43	-0.70

WHOQOL-OLD = World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults; UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale; HY = Hoehn and Yahr (scale); GDS30 = 30-item Geriatric Depression Scale; r_p = Pearson's Correlation Coefficient; r_s = Spearman's Correlation Coefficient; NS = non significance.

Table 3 - Comparison of variables scores according to Geriatric Depression Scale

Score	GDS30 score		p-value*
	< 10 (n = 29)	≥ 10 (n = 28)	
WHOQOL-OLD			
Sensory abilities	69.2 ± 21.4	52.2 ± 23.1	0.006
Autonomy	67.9 ± 14.1	54.5 ± 16.0	0.001
Past, present, future activities	71.1 ± 13.0	60.7 ± 21.7	0.03
Social participation	63.4 ± 19.3	53.1 ± 21.3	0.06
Death & dying	73.9 ± 19.2	60.9 ± 29.2	0.06
Intimacy	75.9 ± 13.5	64.3 ± 24.2	0.03
Total	70.2 ± 11.0	57.4 ± 13.9	0.001
PSQI	7.5 ± 4.3	11.2 ± 4.2	0.002
ESS	6.7 ± 4.8	8.9 ± 3.7	0.06
PDSS total	100.9 ± 29.1	81.8 ± 27.6	0.01
UPDRS part III (motor signs)	26.1 ± 17.4	31.1 ± 14.8	0.2

*Student's t-test

GDS30 = 30-item Geriatric Depression Scale; WHOQOL-OLD = World Health Organization Quality of Life Assessment for Older Adults; PSQI = Pittsburg Sleep Quality Index; ESS = Epworth Sleepiness Scale; PDSS = Parkinson's Disease Sleep Scale; UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

REFERENCES

- [1] De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*.2000; 54 (11) Suppl 5: S21-3.
- [2] Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, Cardoso F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). *Mov Disord*. 2006;21(6):800-8.
- [3] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992; 55(3):181-4.
- [4] Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 15 (Suppl 1): 14-20.
- [5] Lees AJ, Blackburn NA, Campbell V. The nighttime problems of Parkinson's Disease. *Clin Neuropharmacol*. 1988;11(6):512-9.
- [6] Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13(6):895-9.

- [7] McDonald WM, Richard IH, DeLong MR. Prevalence, etiology and treatment of depression in Parkinson's Disease. *Biol Psychiatry*. 2003;54:363-75.
- [8] Adler CH. Nonmotor complications in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2005;20(suppl 11):S23-9.
- [9] Chrischilles EA, Rubenstein LM, Voelker MD, Wallace RB, Rodnitzky RL. The health burdens of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13(3):406-13.
- [10] Schestatsky P, Zanatto VC, Margis R, Chachamovich E, Reche M, Batista RG, Ficke D, Rieder CRM. Quality of life in a Brazilian sample of patients with Parkinson's disease and their caregivers. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(3):209-11.
- [11] Hirayama MS, Gobbi S, Gobbi LTB, Stella F. Quality of life (QoL) in relation to disease severity in Brazilian Parkinson's patients as measured using WHOQOL-BREF. *Arch Gerontol Geriatr*. 2008;46(2):147-60.
- [12] Rahman S, Griffin HJ, Quinn NP, Jahanshahi M. Quality of life in Parkinson's Disease: the relative importance of the symptoms. *Mov Disord*. 2008;23(10):1428-34.
- [13] Carod-Artal FJ, Vargas AP, Martinez-Martin P. Determinants of quality of life in Brazilians patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007;22(10):1408-15.

- [14] Schrag A, Jahanshahi M, Quinn N. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;69(3):308-12
- [15] Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Toivone M, Rinne UK. The Quality of Life in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2000;15(2):216-33.
- [16] The Global Parkinson's Disease Survey (GPDS) Steering Committee. Factors Impacting on Quality of life in Parkinson's Disease: results from an International Survey. *Mov Disord*. 2002;17(1):60-7.
- [17] Scalzo P, Kummer A, Cardoso F, Teixeira AL. Depressive symptoms and perception of quality of life in Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009; 67(2A):203-8.
- [18] The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization. *Soc Sci Med*. 1995; 41:1403-10.
- [19] Power M, Quinn K, Schmidt S. WHOQOL-OLD Group. Development of WHOQOL-OLD module. *Qual Life Res*. 2005; 14(10):2197-214.
- [20] Folstein M, Folstein S, McHugh P. "Mini Mental State": a practical method for grading the cognitive states of patients for the clinician. *J Psy Res*. 1975; 12:189-98.
- [21] Bertolucci PFH, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O miniexame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr*. 1994; 52:1-7.
- [22] Almeida OP. Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência.

Arq Neuropsiquiatr. 1998;56:605-12.

[23] Hoehn MH, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology.* 1967;17(5):427-47.

[24] Fahn S, Elton RL and Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M, editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease.* Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information; 1987. p.153-63.

[25] Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep.* 1991;14(6):540-5.

[26] Bertolazi AN, Fagondes SC, Perin C, Schönwald SV, John AB, Miozzo I, et al. Validation of the Epworth Sleepiness Scale in the Brazilian Portuguese language. *Sleep.* 2008;31(Suppl):A347.

[27] Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice research. *Psychiatry Res.* 1989;28(2):193-213.

[28] Bertolazi AN, Fagondes SC, Perin C, Schönwald SV, John AB, DeBarba M, et al. Validation of the Pittsburgh sleep quality index in the Brazilian Portuguese language. *Sleep* 2008;31(Suppl):A347.

[29] Chaudhuri KR, Pal S, DiMarco A, Whately-Smith C, Bridgman K, Mathew R, Pezzela FR, Forbes A, Hogl B, Trenkwalder C. The Parkinson's disease sleep scale: a new instrument for assessing sleep and nocturnal disability in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;73(6):629-35.

[30] Margis R, Donis K, Schönwald SV, Fagundes SC, Monte T, Martín-Martínez P, Chaudhuri KR, Kapczinski F, Rieder CRM. Psychometric properties of the Parkinson's Disease Sleep Scale – Brazilian Version. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009; 15(7):495-9.

[31] Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M, Leirer VO. Development and validation of Geriatric Depression Screening scale: a preliminary report. *J Psy Res*. 1982;17(1):37-49.

[32] Stoppe Junior A, Facob Filho W, Louzã Neto MR. Avaliação da depressão em idosos através da “Escala de Depressão em Geriatria”: resultados preliminares. *Rev ABP-APAL*. 1994;16(4):149-53.

[33] McDonald WM, Holtzheimer PE, Haber M, Vitek JL, McWhorter K, DeLong M. Validity of the 30-item geriatric depression scale in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21(10):1618-22.

[34] Fleck MP, Chachamovich E, Trentini C. Development and validation of the Portuguese version of the WHOQOL-OLD module. *Rev Saude Publica*. 2006;40(5):785-91.

- [35] Spiegel J, Hellwig D, Samnick S, Jost W, Möllers M-O, Fassbender K, Kirsch C-M, Dillmann U. Striatal FP-CIT uptake differs in the subtypes of early Parkinson's Disease. *J Neural Neural Transm.* 2007;114(3):331-5.
- [36] Schrag A, Barone P, Brown RG, Leetjens AFG, McDonald WM, Starkstein S, Weintraub D, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Goetz CG. Depression rating scales in Parkinson's Disease: critique and recommendations. *Mov Disord.* 2007;22(8):1077-92.
- [37] Souza RG, Borges V, Silva SMCA, Ferraz, HB. Quality of life scale in Parkinson's disease PDQ-39 - (Brazilian Portuguese version) to assess patients with and without levodopa motor fluctuation. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007;65(3B):787-91.
- [38] Lana RC, Álvares LMRS, Nasciutti-Prudente C, Goulart FRP, Teixeira-Salmela LF, Cardoso FE. Perception of quality of life in individuals with - Parkinson's disease using the PDQ-39. *Rev Bras Fisioter.* 2007;11(5):397-402.
- [39] Valeikiene V, Ceremnych J, Alekna V, Juozulynas A. Differences in WHOQOL-100 domain scores in Parkinson's disease and osteoarthritis. *Med Sci Monit.* 2008;14(4):221-7.
- [40] Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain.* 2000;123(Pt 11):2297-305.
- [41] Rajput AH, Sitte HH, Rajput A, Fenton ME, Pifl C, Hornykiewicz O. Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes. *Neurology.* 2008;70(16 Pt 2):1403-10.

[42] Rajput AH, Voll A, Rajput MI, Robinson CA, Rajput A. Course in Parkinson disease subtypes: a 39-year clinicopathologic study. *Neurology*. 2009;73(3):206-12.

[43] 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(2A):152-6.

Capítulo 3.

Sleep Spindles in *de novo* Parkinson's Disease

Regina Margis¹, Günther J L Gerhardt², Suzana Veiga Schönwald³ Carlos R. M. Rieder^{1,3}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2400, zip code: 90035-00, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, zip code: 95001-970, Caxias do Sul, RS, Brazil

³Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, zip code: 90035-00, Porto Alegre, RS, Brazil.

Keywords: sleep spindle, Parkinson's disease, polysomnogram

***Corresponding author:**

Carlos R. M. Rieder.

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, zip code: 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-21018182; Fax: +55-51-32221954.

Abstract

We investigated sleep spindles in non-rapid eye movement sleep stage 2 (N2) in patients with Parkinson's disease (PD) who had never received dopaminergic treatment. Nontreated PD patients (*ntPD*) were compared to healthy control subjects and to PD patients after levodopa treatment. There was no significant difference in conventional sleep parameters between *ntPD* and control subjects. When we analyzed the slow (≤ 13 Hz) spindles, *ntPD* patients showed a higher sleep spindle density in the frontal, central and left parietal areas compared to the controls. Similarly, *ntPD* had a higher density of fast (>13 Hz) spindles in almost all electroencephalographic regions examined (except left frontal). Conventionally scored sleep variables and sleep spindle density did not show significant differences between PD groups (before and after dopaminergic treatment). In conclusion, we demonstrated an increase in sleep spindle density in stage N2 sleep in *de novo* PD patients compared to controls.

Introduction

Sleep disturbances are a frequent problem in Parkinson's disease (PD) [1, 2] and several patients develop sleep problems even before motor symptoms appear [3-5]. Pathologically, PD is characterized by the loss of dopaminergic nigral neurons, accompanied by gliosis and Lewy bodies in the remaining substantia nigra pars

compacta neurons. PD is also associated with extensive nondopaminergic pathology, involving cholinergic neurons of the nucleus basalis of Meynert, norepinephrine neurons of the locus ceruleus and serotonin neurons in the midline raphe as well as neurons in the cerebral cortex, brainstem, spinal cord and peripheral autonomic nervous system [6]. Sleep disturbances in PD may reflect degeneration of the raphe nuclei, locus ceruleus and subceruleus nuclei [7].

Sleep spindles are the electrophysiological marker of non-rapid eye movement (NREM) sleep stage 2 (N2) in humans. Sleep spindles are defined as a train of distinct waves with frequency 11Hz to 16Hz with a duration ≥ 0.5 seconds [8]. Slow (<13 Hz) spindles prevail over frontal scalp areas and fast (>13 Hz) spindles predominate over centro-parietal areas. These sequences of waxing and waning electroencephalographic (EEG) waves are generated in the nucleus reticularis thalami neurons [9] and synchronized on cortico-thalamo-cortical loops. Aging has been shown to decrease spindle density [10]. Disease and pharmacological intervention can also influence sleep spindle activity [11-13].

Previous studies have shown spindle occurrence [14-17] to be reduced in PD patients. However, some of this research lacked an adequate comparison group and included subjects with mixed treatment regimens and large age spans. The methodology was not always described in detail. Additionally, conflicting results have been published [18, 19].

The aim of this study was to examine the occurrence of sleep spindles during stage N2 sleep of PD patients. Nontreated PD patients (*ntPD*) were compared to healthy control subjects and to PD patients after levodopa treatment. By examining

PD pathophysiology and sleep spindle generation, this study explored the differences in spindle occurrence between PD patients and healthy aging people.

Methods

This study was approved by the local ethics committee and all subjects provided informed consent before entering the study. Fourteen consecutive *de novo* PD patients (ntPD) attending an outpatient movement disorders unit of a university hospital were enrolled in the study. Selected patients fulfilled the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria for PD [20]. Exclusion criteria included the presence of another neurological disease, the presence of psychiatric disorder according to DSM-IV-TR [21] and a Mini-Mental State Examination [22] score below 24 [23]. Information on demographic variables and disease history was obtained by semi-structured interview. PD symptoms were assessed by Hoehn-Yahr (HY) staging [24] and Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [25]. Depressive symptoms, sleep and somnolence were assessed by the Beck Depression Inventory (BDI) [26, 27], Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) [28, 29] and Epworth Sleepiness Scale (ESS) [30, 31], respectively.

Data from six of the fourteen ntPD subjects were excluded for the following reasons: an inconsistent response to levodopa (1), treatment following interruption (1), the presence of artifacts in the polysomnogram (PSG) (1), failure to attend the second PSG (2) and a PSG-apnea index >15 (1). No subjects were taking hypnotics or benzodiazepine drugs. The control group was comprised of 10 non-PD volunteers

selected from the outpatient clinic. Control group exclusion criteria were the same as described above. After the second PSG, ntPD subjects were started on levodopa associated with a decarboxylase inhibitor and followed for one year. All seven ntPD patients showed improvement in motor symptoms with levodopa therapy ($p < 0.01$) and were invited to repeat PSG. Five patients received a PSG 71 ± 11 days after beginning levodopa.

Subjects slept for two nights in the sleep laboratory. The first night allowed the patients to adapt to the surroundings and the data used for analysis were taken on the second night. Patients were asked to avoid napping and to refrain from drinking caffeinated and alcoholic beverages during the day prior to the PSG.

PSG was carried out during the usual sleep time on a 64-channel Racia-Alvar digital system (Deltamed software, 256Hz and 16bit resolution). Initial impedances were below 10K ohms. The recording protocol followed standard guidelines; studies were visually scored according to AASM [8] criteria by a trained rater blinded to the diagnosis and treatment condition. The sample contained all N2 stage EEG epochs from left and right frontal, central and parietal electrodes referenced to $(A1+A2)/2$, presented in μV . Segments inspected for noise were removed. Analysis was performed on the unfiltered signal. The free Matching Pursuit algorithm version provided at <http://eeg.pl/mp> was used in this study (because it was originally designed for EEG signal analysis [32], it has been benchmarked and shown to be suitable for human sleep spindle detection [33]). Atoms with intra-spindle frequency from 11-16 Hz and duration from 0.5-2.0 seconds were collected and defined as sleep spindles. They were divided into slow (≤ 13 Hz) and fast (> 13 Hz) spindles.

Data were analyzed using Statistical Package for Social Sciences version 17. Mann-Whitney U-test was conducted to compare PSG macrostructure and sleep spindle density (sleep spindles per minute). Student's *t test* was applied to other variables that showed non-significance in Kolmogorov-Smirnov test.

Results

Table 1 shows clinical characteristics and sleep macrostructure data for controls and ntPD patients. There were no significant differences between groups for conventionally scored sleep variables. Compared to the controls, ntPD patients showed higher sleep spindle density in the EEG regions tested (Table 2). This difference was statistically significant in the bilateral parietal, left central and right frontal areas. For both slow and fast spindles, ntPD patients showed a higher spindle density than the healthy control group (Table 2).

PSQI and ESS scores were similar between the ntPD and control groups. Both groups had mean BDI scores that were below the cutoff proposed for depression screening [34, 35].

The post-treatment sleep macrostructure results were as follows (mean \pm standard deviation): total sleep time (min) = 363 ± 58.1 , sleep efficiency (%) = 80.1 ± 9.8 , N1(%) = 18.8 ± 4.2 , N2(%) = 37.8 ± 13.9 , N3(%) = 28.9 ± 10.4 and REM(%) = 14.8 ± 5.6 . Conventionally scored sleep variables, sleep spindle density, ESS and PSQI score did not show significant differences between PD groups (that is, before and after treatment).

Discussion

The present study showed that there were differences in sleep spindle density during stage N2 sleep in *de novo* PD patients compared to controls. However, macrostructure sleep variables did not show significant differences between groups, reinforcing the necessity of investigating the microstructure patterns occurring during sleep. We observed that ntPD patients showed an elevated sleep spindle density when compared to control patients in parietal, central and frontal areas. Furthermore, when we analyzed the slow (≤ 13 Hz) spindles, ntPD patients showed a greater density of sleep spindles in frontal, central and left parietal areas than controls. Similarly, PD subjects had a higher fast (>13 Hz) sleep spindle density in almost all brain areas examined (except in the left frontal area).

Data interpretation should take into account the influence of dopaminergic pathways. The authors suggest that the high spindle density seen in PD patients might result from a mechanism that either stimulates an increase and/or inhibits a decrease in spindle production. Previous studies have shown that spindle waves result from an interaction between thalamocortical and thalamic reticular GABAergic neurons [9]. The brainstem cholinergic pathway also influences thalamocortical spindle generation [13]. Considering the neurodegeneration involved in PD (particularly pedunculopontine nucleus degeneration) and that spindles are blocked by cholinergic projections, the authors suggest that modulatory changes in cholinergic pathways might interfere with the hyperpolarization of reticular neurons and consequently reduce sleep spindle inhibition.

PD patients showed a higher density of both slow and fast spindles; these data reduce the likelihood of an interpretation error because spindles bound to the sigma band include frequency bins traditionally identified as belonging to the alpha band. However, questions remain. It is unknown whether the increased spindle density in ntPD is due to an adaptation to correct sleep maintenance problems in the early stages of PD. It is also unknown how the later progression of PD affects spindles.

Despite the fact that levodopa treatment improved motor symptoms, there were no differences in PSQI or PSG parameters between PD groups. This result might be due to the small sample size or to the short treatment duration. Repeating the experiment with a longer follow-up would be an interesting future study. In spite of these shortcomings, we have evaluated naïve PD, which allowed us to examine PD pathophysiology without interference from drugs. Though many aspects of sleep regulation remain unknown and despite the complexity of PD, studies of sleep spindle occurrence in PD can offer insight into both PD and the mechanisms of sleep.

Table 1: Descriptive characteristics

	Control mean (sd)	ntPD mean (sd)
Men (%)	50	50
Age (years)	67.5 (4.6)	64.9 (6.3)
Age (range)	60 – 73	58 – 74
Disease duration (years)	-	3.0 (2.7)
Hoehn & Yahr (range)	-	1 – 2
UPDRS section I	-	1.8 (1.5)
UPDRS section II	-	12.3 (5.0)
UPDRS section III	-	15.5 (5.8)
PSQI	5.2 (3.0)	9.0 (3.9)
ESS	7.7 (4.7)	9.3 (3.9)
Sleep macrostructure		
TST (min)	375.8 (58.9)	384.4 (63.4)
Sleep efficiency (%)	83.0 (27.2)	81.8 (9.2)
N1 %	16.2 (7.2)	16.5 (4.4)
N2%	30.3 (12.7)	38.2 (8.8)
N3%	39.5 (9.9)	31.6 (8.0)
R%	15.2 (8.5)	13.6 (5.1)

ntPD: untreated Parkinson's disease; mean (sd): mean (standard deviation).
UPDRS: unified Parkinson's disease rating scale; PSQI: Pittsburg sleep quality index; ESS: Epworth sleepiness scale; TST: total sleep time; N1%: NREM 1 percentage of TST; N2%: NREM 2 percentage of TST; N3%: NREM 3 percentage of TST; R%: REM percentage of TST.

Table 2: Sleep spindle density

EEG Channel	Frequency (Hz)	Control mean (sd) median	ntPD mean (sd) median	<i>P</i> Mann-Whitney
F3	11-16	0.61 (0.55) 0.50	1.18 (1.64) 1.54	0.062
	≤13	0.51 (0.48) 0.37	1.48 (1.27) 1.21	0.045
	>13	0.10 (0.09) 0.07	0.35 (0.40) 0.18	0.110
F4	11-16	0.57 (0.40) 0.64	2.06 (1.65) 1.73	0.026
	≤13	0.49 (0.36) 0.51	1.56 (1.27) 1.22	0.033
	>13	0.08 (0.07) 0.08	0.50 (0.40) 0.46	0.004
C3	11-16	0.42 (0.41) 0.30	2.00 (1.77) 1.83	0.021
	≤13	0.26 (0.33) 0.19	1.18 (0.97) 1.24	0.033
	>13	0.15 (0.13) 0.13	0.82 (0.82) 0.59	0.021
C4	11-16	0.51 (0.57) 0.31	1.89 (1.53) 1.49	0.056
	≤13	0.29 (0.34) 0.19	0.98 (0.79) 0.79	0.045
	>13	0.22 (0.24) 0.13	0.91 (0.75) 0.79	0.026
P3	11-16	0.54 (0.54) 0.43	2.16 (1.77) 1.74	0.033
	≤13	0.20 (0.24) 0.14	0.85 (0.75) 0.84	0.050
	>13	0.34 (0.31) 0.26	1.31 (1.14) 0.93	0.010
P4	11-16	0.48 (0.43) 0.41	2.11 (1.83) 1.67	0.026
	≤13	0.20 (0.23) 0.16	0.81 (0.66) 0.70	0.068
	>13	0.27 (0.24) 0.24	1.31 (1.24) 1.05	0.021

EEG: electroencephalogram; ntPD: untreated Parkinson's disease; sd: standard deviation.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from CNPq and FIPE.

REFERENCES

[1] Lees AJ, Blackburn NA, Campbell V. The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1988;11(6):512-519.

[2] Tandberg E, Larsen J, Karlsen K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;13(6):895-899.

[3] Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006;5:235-245.

[4] Schenck CH, Mahowald MW. REM sleep behavior disorder: clinical, development and neuroscience. Perspectives 16 years after its formal identification in sleep. *Sleep* 2002; 25(2):120-138.

[5] Chaudhuri KR, Naidu Y. Early Parkinson's disease and non-motor issues. *J Neurol* 2008; 255 (suppl5):33-38.

[6] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, Vos RAI de, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24:197-211.

[7] Stenberg D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1187-1204.

[8] Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF, for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, Terminology and technical specifications, 1^aed.: Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2007.

[9] Fuentealba P, Steriade M. The reticular nucleus revisited: intrinsic and network properties of a thalamic pacemaker. *Prog Neurobiol* 2005;75:125-141.

[10] Nicolas A, Petit D, Rompré S, Montplaisir J. Sleep spindle characteristics in healthy subjects of different age groups. *Clin Neurophysiol* 2001;112:521-527.

[11] Ferrarelli F, Huber R, Peterson MJ, Massimini M, Murphy M, Riedner BA, Watson A, Bria P, Tononi G. Reduced sleep spindle activity in schizophrenia patients. *Am J Psychiatry* 2007;164:483-492.

[12] Paterson LM, Nutt DJ, Ivarsson M, Hutson PH, Wilson SJ. Effects on sleep stages and microarchitecture of caffeine and its combination with zolpidem or trazodone in healthy volunteers *J Psychopharmacol* 2009;23(5):487-494.

[13] Keifer JC, Baghdoyan HA, Becker L, Lydic R. Halothane decreases pontine acetylcholine release and increases EEG spindles. *Neuroreport* 1994;51(5):577-580.

[14] Comella CL, Tanner CM, Ristanovic RK. Polysomnographic sleep measures in Parkinson's disease patients with treatment-induced hallucinations. *Ann Neurol* 1993;34 (5):710-714.

[15]Emser W, Brenner M, Stober T. Changes in nocturnal sleep in Huntington and Parkinson's disease. *J Neurol* 1988;235: 177-179.

[16]Myslobodsky M, Mintz M, ben-Mayor V, Radwan H. Unilateral dopamine deficit and lateral EEG asymmetry. *Clin Neurophysiol* 1982;54:227-231.

[17]Puca FM, Bricolo A, Turella G. Effect of L-dopa or amantadine therapy on sleep spindles in parkinsonism. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol* 1973; 35: 3427-3430.

[18]Happe S, Anderer P, Pirker W, Klose G, Gruber G, Saletu B, Zeitlhofer J. Sleep microstructure and neurodegeneration as measured by [¹²³I] β-CIT SPECT in treated patients with Parkinson's disease. *J Neurol* 2004;251:1465-1471.

[19]Brunner H, Weter TC, Hoegl B, Yassouridis A, Trenkwalder C, Friess E. Microstructure of non-rapid eye movement sleep electroencephalogram in patients with newly diagnosed Parkinson's disease: effects of dopaminergic treatment. *Mov Disord* 2002;17(5):928-933.

[20]Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.

[21]American Psychiatric Association. Diagnostic criteria from DSM-IV-TR™ Whashington 2000.

[22]Folstein M, Folstein S, McHugh P. "Mini Mental State": a practical method for grading the cognitive states of patients for the clinician. *J Psy Res* 1975;12:189-198.

- [23] Almeida OP. Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:605-612.
- [24] Hoehn MH, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 1967;17(5):427-447.
- [25] Fahn S, Elton RL and Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M, editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information; 1987. p.153-163.
- [26] Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961; 4:561-571.
- [27] Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck depression inventory and the State-Trait anxiety inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:453-457.
- [28] Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice research. *Psychiatry Res* 1989;28(2):193-213.
- [29] Bertolazi AN, Fagundes SC, Perin C, Schönwald SV, John AB, DeBarba M, et al. Validation of the Pittsburgh sleep quality index in the Brazilian Portuguese language. *Sleep* 2008; 31(Suppl):A347.
- [30] Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991;14(6):540-545.

[31] Bertolazi AN, Fagondes SC, Perin C, Schönwald SV, John AB, Miozzo I, et al. Validation of the Epworth Sleepiness Scale in the Brazilian Portuguese language. *Sleep*. 2008; 31(Suppl):A347.

[32] Durka PJ, Ircha D, Blinowska KJ. Stochastic time-frequency dictionaries for Matching Pursuit. *IEEE Trans Signal Process* 2001; 49(3):507-510.

[33] Schönwald SV, Santa-Helena EL, Rossatto R, Chaves MLF, Gerhardt GJL. Benchmarking matching pursuit to find sleep spindles. *J Neurosci Methods* 2006; 156: 314-321.

[34] Visser M, Leetjens AFG, Marinus J, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Reliability and Validity of Beck Depression Inventory in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21(5):668-672.

[35] Schrag A, Barone P, Brown RG, Leetjens AFG, McDonald WM, Starkstein S, Weintraub D, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Goetz CG. Depression Rating Scales in Parkinson's Disease: Critique and Recommendations. *Mov Disord* 2007; 22(8):1077-1092.

Capitulo 4.

Polysomnographic Study of Sleep in Untreated Parkinson's Disease

Regina Margis¹, Raffaele Ferri², Suzana V.Schönwald³, Diego Carvalho¹,
Günther J. L. Gerhardt⁴, Oliviero Bruni⁵, Carlos R.M. Rieder^{1,3}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Sleep Research Centre, Department of Neurology I.C., OASI Institute (IRCCS), Troina, Italy

³Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁴Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil

⁵Center for Pediatric Sleep Disorders, Department of Developmental Neurology and Psychiatry, University "La Sapienza", Rome, Italy

Abstract

Objective: The aim of the present study was to analyze polysomnographic features of untreated PD patients in early years of the disease.

Methods: Ten non-PD volunteers and eight untreated PD patients were enrolled in the polysomnographic study; in a subgroup of 5 patients we also analyzed the effect of levodopa treatment. Sleep recordings were scored for sleep stages and cyclic alternating pattern (CAP) analysis; additionally, periodic leg movements during sleep (PLMS) were counted and chin EMG amplitude was analyzed by means of a quantitative computer approach.

Results: Control and PD patients groups did not show important differences in sleep architecture. CAP was different between the two groups for an increase in the percentage of A3 subtypes (arousals) and a decrease in all subtypes duration in PD patients. Levodopa therapy did not modify any sleep architecture or CAP parameter. Two PD patients showed a high PLMS index which was abolished by levodopa in one of them. No alterations of the chin tone were found.

Conclusions: In conclusion, our study shows that untreated PD patients present a mild involvement of sleep microstructure with altered sleep maintenance mechanisms. PLMS can be found with a frequency similar to that of controls but with much higher values, while REM sleep without atonia is probably a late stage phenomenon in PD.

Keywords: sleep, Parkinson's disease, cyclic alternating pattern, CAP, periodic leg movements during sleep, atonia index

Introduction

Sleep disorders are among the most frequent non-motor symptoms of Parkinson's disease (PD). Patients with PD very frequently complain of insomnia, with inability to fall asleep and frequent nighttime awakenings.¹ The etiology of insomnia in PD is believed to be multifactorial, with a role for mood disturbances, persistent tremor, nighttime occurrence of PD symptoms, nocturia, and altered sleep/wake pattern. Restless legs syndrome (RLS) has also been reported to occur in up to 20% of patients with PD.² The relationship between PD (and the synucleinopathies in general) and REM sleep behavior disorder (RBD) is strict but complex; RBD can precede parkinsonism for several years while in PD, RBD represents a risk factor for the development of dementia and hallucinations.³

Finally, excessive daytime somnolence (EDS) and fatigue in PD may be due to the disease itself, to medications, or the presence of other sleep disorders; in particular, EDS is common with dopamine agonists than with levodopa.⁴

Beside clinical evaluations, there are not many studies on polysomnographically recorded sleep in PD. In one study, PD patients were found to have a lower sleep efficiency and shorter duration of REM sleep, in comparison with age-matched controls.⁵ In other studies, a progressive sleep structure alteration has

been reported in PD patients, with different sleep parameters, and slow-wave sleep (SWS) in particular, being inversely correlated with disease duration.^{6,7}

The cyclic alternating pattern (CAP) is a periodic electroencephalographic (EEG) activity of non-rapid eye movement (NREM) sleep characterized by sequences of transient episodes that differ from the activity of basal EEG and recur at up to 60 seconds.⁸

CAP is believed to indicate a condition of sleep instability oscillating between greater (phase A) and lesser (phase B) arousal level. Phasic events of the slow wave activity (subtypes A1 of CAP) have been interpreted as the attempt of the brain to preserve sleep; while, subtypes A2 and A3 of CAP have been identified as constituting a central nervous system arousal.⁸

According to previous studies which had reported that many Parkinson's disease patients show sleep fragmentation⁹, the authors considered that CAP parameters could be altered in Parkinson's disease. The aim of the present study was thus to analyze the characteristics of CAP events in untreated Parkinson disease (PD) and the eventual influence of treatment on it. Additional aim of this study was to analyze periodic leg movements during sleep (PLMS) and chin EMG amplitude during REM sleep in the same patients, at baseline and after treatment.

Subjects and Methods

This study was approved by the local ethics committee and all subjects provided informed consent before entering the study.

Patients and control subjects

Twelve consecutive, previously untreated PD patients attending an outpatient Movement Disorders Clinic of a university hospital in Brazil were enrolled in the study. Selected patients fulfilled the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria for PD.¹⁰ Exclusion criteria were: presence of other neurological disease, Mini-Mental State Examination^{11,12} score below 24¹³, presence of a psychiatric disease according to Diagnostic Statistical Mental (DSM-IV)¹⁴, and polysomnographic (PSG) study showing apnea/hypopnea index above 15 per hour.

Sleep and somnolence were evaluated by means of the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)¹⁵ and Epworth Sleepiness Scale (ESS)¹⁶, respectively. Depressive symptoms were assessed by Beck Depression Inventory (BDI).^{17,18}

Data from 4 of the twelve PD subjects originally included in the study were not further analyzed. These subjects were excluded for the following reasons: no consistent response to levodopa (1), artifacts in PSG (2) and PSG showing AHI>15 (1). All analyses of the untreated PD group therefore pertain to 8 subjects, 4 males, with a mean age of 65.0 (6.50 S.D). Three patients had unilateral involvement only (Hoehn and Yahr¹⁹ stage 1) and five patients had bilateral disease without balance impairment (Hoehn and Yahr stage 2). Mean disease duration was 2.9 years (2.59 S.D.). A detailed description of demographic and clinical features of these patients is provided in table 1.

The control group was comprised of 10 non-PD volunteers, 5 males, with a mean age of 65.8 years (6.43 S.D.), selected from the outpatients clinic. Control group exclusion criteria were the same as described to PD patients. Additionally, the presence of subjective sleep complaints (insomnia, daytime sleepiness, restless legs syndrome, REM sleep behavior disorder symptoms, snoring, or witnessed apnea) was also ruled out. No patients or controls were taking hypnotics or benzodiazepines.

Sleep recordings

Subjects slept two nights in the sleep laboratory. The first night was used for adaptation and the second night for analysis. Patients were asked to avoid napping and to refrain from drinking caffeinated and alcohol beverages during the day prior to the sleep investigation. Sleep recording was carried out during the usual sleep time on a 64-channel Racia-Alvar digital system (Deltamed software, 256 Hz and 16-bit resolution).

The recording protocol followed standard AASM guidelines²⁰: including information on scalp EEG (at least three channels, F3 or F4, C3 or C4 and O1 or O2, referenced to the contralateral mastoid; electrodes placed following the 10-20 International System), 2 eye movement channels, chin and leg electromyogram, electrocardiogram, snoring, oronasal thermistor, thoracic and abdominal respiratory effort, body position and pulse oximetry. Electrode placement followed standard guidelines. Initial impedances had to be below 10 kOhms. Recordings of the second

night were transformed into European data format, with indications of lights out and lights on and coded for anonymity.

After the second PSG recording, PD patients were started on levodopa associated with decarboxylase inhibitor treatment and were followed up for one year. All PD patients had motor symptoms improvement evaluated by Unified Parkinson's Disease Rating (UPDRS)²¹ with levodopa therapy and were invited to repeat PSG. Five patients underwent a new PSG recording two months after beginning levodopa treatment. Two patients had received levodopa+carbidopa (375+75 mg/day), one was treated with levodopa+carbidopa (500+100 mg/day), another with levodopa+benserazide (300+75 mg/day), and the last patient took levodopa+benserazide (400+100 mg/day).

Conventional sleep parameters

Sleep recordings were visually scored according to Rechtschaffen and Kales rules^{22,23} criteria by a trained rater blinded to diagnosis or treatment condition. Each recording was first analyzed by 30-seconds epochs according to standardized criteria.

CAP analysis

CAP was scored according the criteria published by Terzano et al.⁸ CAP is a periodic EEG activity of NREM sleep characterized by sequences of cycles composed by a phase A (transient electrocortical event) and a phase B (recurring EEG background activity). Phase A activities can be classified into three subtypes.

This classification is based on the reciprocal proportion of high-voltage slow-waves (EEG synchrony) and low-amplitude fast rhythms (EEG desynchrony).⁸ Subtype A1 shows a predominance of synchronized EEG activity; if present, EEG desynchrony occupies less than 20% of the entire A phase duration. Subtype A1 specimens include delta bursts, K-complex sequences, vertex waves, polyphasic bursts with less than 20% of EEG desynchrony. Subtype A2 is scored in the presence of 20% to 50% of desynchronized EEG activity, with predominance of polyphasic bursts. Subtype A3 EEG activity is predominantly rapid low-voltage rhythms with more than 50% of phase A occupied by EEG desynchrony. Subtype A3 include EEG arousals, K-alpha and polyphasic bursts (with at least 50% of EEG desynchrony). CAP cycles are based on the presence of two successive phases A and B. CAP sequences are defined as three or more A phases separated from each other by no more than 60s. CAP rate is defined as the percentage of total NREM time occupied by CAP sequences. The remaining NREM sleep is called non-CAP (NCAP).

The following CAP parameters were measured: CAP time (temporal sum of all sequences) in NREM; CAP rate (percentage of total NREM time occupied by CAP sequences); number and duration of CAP cycles; number and duration of CAP sequences; number, duration and percentages of A phases (including the phase A subtypes); A1% (percentage of A1 number from total A phases number); A2% (percentage of A2 number from total A phases number); A3% (percentage of A3 number from total A phases number) and B phases duration. All of these variables were visually detected and their parameters measured by means of the sleep analysis software Hypnolab 1.0.

Analysis of leg movements during sleep

Leg movements during sleep were first detected by the software Hypnolab 1.2 (SWS Soft, Italy) which allows their computer-assisted detection. With this software, the detection is performed on the rectified EMG signal from the tibialis anterior muscles, using a human-supervised automatic approach controlled by the scorer (blind to the treatment assignment) that used the WASM-IRLSSG criteria.²⁴ The performance of this system has been evaluated and validated,²⁵ but in this study one scorer, blind to group and treatment assignment, visually edited the detections proposed by the automatic analysis, before computing the final results. In particular, the PLMS index was calculated as the number of LM included in a series of 4 or more, separated by more than 5 and less than 90 s, per hour of sleep.

Quantification of Submental muscle EMG Amplitude

For the computer quantitative analysis, the submental muscle EMG signal was digitally band-pass filtered at 10–100 Hz, with a notch filter at 60 Hz and rectified. Subsequently, each REM sleep epoch included in the analysis was divided into 30 1-second mini-epochs. The average amplitude of the rectified submental muscle EMG signal was then obtained for each miniePOCH. The values of the submental muscle EMG signal amplitude in each miniePOCH were used to compute the percentage of values in the following 20 amplitude (amp) classes (expressed in μV): $\text{amp} \leq 1$, $1 < \text{amp} \leq 2$,, $18 < \text{amp} \leq 19$, $\text{amp} > 19$. Muscle atonia is expected to be

reflected by high values of the first class ($amp \leq 1$) while phasic and tonic activations are expected to increase the value of the other classes.^{26,27} As proposed in the previous studies, an index summarizing in a single value the degree of preponderance of the first class was used in REM sleep:

$$\text{Sleep Atonia Index} = \frac{amp \leq 1}{100 - 1 < amp \leq 2}.$$

Mathematically, this index can vary from 0 (absence of mini-epochs with $amp \leq 1$), i.e. complete absence of EMG atonia, to 1 (all mini-epochs with $amp \leq 1$) or stable EMG atonia in the epoch.

Statistical analysis

For the statistical analysis, all comparisons between patients and controls were performed by means of the non parametric Mann-Whitney test for unpaired datasets; for the comparison between baseline values and those obtained after treatment in PD patients, the non parametric Wilcoxon test for paired datasets was used. Finally, for the correlation between CAP and sleep quality, the Spearman rank correlation coefficient was computed. The commercially available Statistica software package (StatSoft, Inc., 2001. STATISTICA data analysis software system, version 6. www.statsoft.com) was used. Differences were considered significant when they reached the $p < 0.05$ level.

Results

Sleep architecture and CAP

Table 2 contains the baseline sleep architecture parameters in untreated PD subjects and in normal controls; in this comparison, only sleep latency was found to be slightly but significantly longer in PD patients while all the other parameters of sleep architecture were very similar between the two groups of subjects.

Table 3 reports the baseline CAP parameters in untreated PD subjects and in normal controls; in this table, a statistically significant difference was found for the percentage of A3 CAP subtypes which was higher in PD patients than in controls and for the duration of all CAP subtypes which was found to be shorter in PD patients. The correlation between the percentage of A3 CAP subtypes and the PSQI was computed for PD patients which was found to be positive (Spearman correlation coefficient = 0.587, $0.1 > p > 0.05$) but failed to reach statistical significance, probably because of the low number of patients included in the analysis.

Table 4 shows the comparisons of the sleep architecture parameters obtained at baseline and after treatment in the subgroup of PD subjects for whom a control PSG was obtained. No significant differences were found for this comparison and also for the same comparison regarding CAP parameters (table 5).

Leg movements during sleep

Figure 1 depicts the distribution of the PLMS index found in PD patients at baseline and in control subjects. The presence of two subjects in each group with values much higher than the remaining subjects does not allow a correct statistical comparison of these findings; however, it is possible to notice that the 2 values of PLMS index above 15 found in the PD group are much higher (48.4 and 74.8) than those found in the control group (15.0 and 25.5). Moreover, the PD subject with PLMS index of 48.4 at baseline had a complete abolition of PLMS after treatment (PLMS index = 0). The other subject with high PLMS index was not studied after treatment. None of the four PD subjects with low PLMS index at baseline showed an increase after treatment with all PLMS index values below 5.

Chin tone amplitude during REM sleep

REM atonia index was found to be within the normal range (>0.9) in all subjects included in this study (PD and controls), with no significant difference for its mean values: 0.968 (0.030 S.D.) in PD vs. 0.987 (0.012 S.D.) in controls. Treatment did not modify REM atonia index which was on average 0.968 (0.015 S.D.) before and 0.963 (0.013 S.D.) after treatment, with all patients still showing values above 0.9.

Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating CAP in untreated Parkinson's disease. Previous studies proposed an increase in total CAP rate and an increase in CAP subtypes reflecting arousal (A2 and A3) with aging.²⁸ We have found that, compared to normal control, untreated PD patients in the early years of their disease show CAP characteristics not very different from normal controls but with a significant increase in the relative percentage of A3 subtypes. These subtypes correspond to EEG arousals and reflect a true sleep transient interruption (sleep discontinuity), as opposed to NREM sleep instability (without interruptions) reflected by the repeated occurrence of A1 subtypes, with a sleep stabilizing effect and a probable involvement in the sleep restorative processes and cognitive processing during sleep.²⁹ Thus, even if our untreated PD patients showed classical sleep architecture parameters substantially identical to those of controls, their sleep microstructure, as reflected by CAP, showed some differences indicating a subtle but significant involvement of the sleep maintenance mechanisms and reflected by the increase in arousal-related CAP components (A3).

Interestingly, when we attempted to correlate the percentage of A3 subtypes with the subjective report of sleep quality in PD patients (PSQI) we found a positive correlation which almost reached statistical significance, despite the low number of subjects in the group. This is in agreement with previous reports of a good concordance between CAP and subjective sleep quality.³⁰ This is further reinforced by the observation of frequent high scores at the ESS in these subjects which would

seem to be uncorrelated to nocturnal sleep if only classical sleep scoring is considered; CAP alterations might be the nocturnal correlate of the subjective increase in somnolence during the day.

We also observed that controls and untreated PD subjects showed significant differences in CAP A phase duration, with PD patients showing shorter CAP A subtypes than control subjects. Also the shorter duration of A1 subtypes might be interpreted as a decreased brain capacity to preserve sleep. However, also A2 and A3 subtypes were shorter and this indicates that a more complex mechanism is needed to understand these results which are probably related to the sleep disruption in PD patients determining an increase in number of A3 phases and a homeostatically-determined decrease in duration.

Regarding the lack of effects of the levodopa treatment on both sleep stages and CAP, our results are in agreement with the lack of effects of dopaminergic therapy in a larger group of PD patients reported earlier⁷ but are different from the results of another short uncontrolled report on the effect of one-night administration of apomorphine.³¹ This study reported a 16% increment of total sleep time, a 12% increment of sleep efficiency, a 16% increment of NREM sleep stages 3 and 4, a 15% reduction of PLMS index, a 22% reduction of arousal index, and a 23% reduction of total CAP rate. However, the shortness of this report does not allow us to evaluate better its results and only the entity of the reductions are indicated, without mention of the values of the various parameters. The comparison between our results and those of the study by Priano et al. (2003)³¹ is practically impossible also because of the significant difference between the PD patients included; in fact

the PD patients of these authors were under levodopa treatment at a higher dosage (mean 584 mg/day) than our patients, had a longer disease duration (mean 6.3 years) and at a more advanced Hoehn and Yahr stage (mean 3.2). Also the comparison with the results reported by Monaca et al (2006)³² is virtually impossible because their 36 patients were all under dopaminergic treatment, they did not have a control group, and 55.5% of them had more than 10 apnea episodes per hour of sleep.

Our exploratory study, however, indicates that future studies are needed on larger groups in order to understand better the mechanisms of CAP changes in PD; these studies should include longer treatment periods and also alternative dopaminergic treatment schemes.

Our results regarding PLMS in untreated PD are interesting. As expected for their age, we found that some controls, even in the absence of any sleep complaint, showed an increased PLMS index.³³ Also two PD patients showed increased PLMS index but to a much larger extent than controls, with values very similar to those expected for patients with Restless Legs Syndrome³⁴ or periodic leg movements during sleep disorder.³⁵ The dopaminergic hypothesis³⁶ reflects the most popular mechanism invoked for the genesis of PLMS in these disorders and there is no doubt of a dopamine involvement in PD; also, treatment with levodopa abolished PLMS in the subject who was evaluated polysomnographically also after treatment in this study. However, the dopamine hypothesis is not sufficient because it would not explain why not all PD patients had increased PLMS. An interaction between dopamine mechanisms and genetic factors³⁷ might be important and would also be an interesting topic for future research.

As pointed out in the Introduction, the relationship between PD and RBD is strict but complex; in PD, RBD seems to represent a risk factor for the development of dementia and hallucinations.³ However, while in RBD typical features of PD evolve months or years later, from our study it seems that REM sleep without atonia is not a common finding in untreated PD patients in the first years of their disease (normal REM sleep Atonia index). This is important because there is no doubt that RBD has a tendency to occur frequently in the synucleinopathies at later stages and that selective vulnerability occurring in key brain-stem neuronal networks in the synucleinopathies should be invoked for the genesis of RBD.³⁸ Our study seems to indicate that selective late involvement of brainstem in the synucleinopathies might be responsible for RBD rather than early lesions.

In conclusion, this polysomnographic study of untreated PD patients, most of whom in the first years of the disease and with a low Hoehn and Yahr scale value, shows that these patients present a mild but significant involvement at the level of sleep microstructure, pointing at altered sleep maintenance mechanisms. PLMS can be found in these patients with a frequency not dissimilar from that of controls but with much higher values while REM sleep without atonia is not present and is probably a late stage phenomenon in PD.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the patients included in this study.

Subject	Age	Gender	H&Y stage	UPDRS*	Disease duration, years	PSQI	ESS	BDI	MMSE	Nocturnal events
1	58	Male	2	16	3	9	7	10	29	
2	66	Male	2	25	9	11	15	10	28	
3	68	Female	1	11	1	5	8	11	30	
4	57	Male	1	10	2	2	14	4	30	
5	66	Female	2	22	3	12	9	13	26	
6	59	Male	2	18	2	8	10	13	29	muscle pain
7	75	Female	2	35	2	6	12	11	25	muscle pain
8	71	Female	1	13	1	14	8	13	29	

*UPDRS-motor symptoms; H&Y = Hoehn and Yahr, PSQI = Pittsburgh Sleep Quality Index; ESS = Epworth Sleepiness Scale; BDI = Beck Depression Inventory (BDI); MMSE = Mini-Mental State Evaluation.

Table 2. Baseline sleep architecture parameters in de novo PD subjects and in normal controls.

	untreated PD (n=8)		controls (n=10)		Mann-Whitney test
	mean	S.D.	mean	S.D.	p<
Time in bed, min	477.3	37.77	463.6	35.45	NS
Sleep period time, min	442.6	43.23	435.4	35.59	NS
Total sleep time, min	386.5	60.76	381.7	45.82	NS
Sleep latency, min	22.9	7.58	18.4	20.32	0.03
Stage REM latency, min	143.6	47.35	120.6	64.69	NS
Stage shift/hour	9.5	1.57	11.5	2.60	NS
Awakenings/hour	4.7	1.40	6.5	2.14	NS
Sleep efficiency, %	80.8	9.59	82.2	6.07	NS
Wakefulness, %	12.9	8.25	12.5	5.64	NS
NREM stage 1, %	9.0	3.89	7.1	3.85	NS
NREM stage 2, %	50.7	4.57	51.9	14.19	NS
NREM SWS, %	14.1	6.38	11.0	8.07	NS
REM stage, %	13.4	5.34	17.6	5.71	NS

The percentages of all stages are referred to sleep period time. NS: not significant.

NREM: non-REM; REM: rapid eye movement; SWS: slow wave sleep = NREM stage 3 and 4.

Table 3. Baseline CAP parameters in untreated PD subjects and in normal controls.

	untreated PD		Controls		Mann-Whitney
	(n=8)		(n=10)		Test
	mean	S.D.	mean	S.D.	p<
Total CAP Rate, %	36.8	12.33	38.0	13.03	NS
in NREM, stage 1	13.9	13.45	12.4	16.45	NS
in NREM, stage 2	37.8	13.81	38.0	15.30	NS
in NREM, SWS	50.9	17.27	50.9	17.57	NS
A1 subtypes, %	51.5	21.69	45.5	16.20	NS
A2 subtypes, %	28.4	16.76	43.0	13.99	NS
A3 subtypes, %	20.1	7.57	11.5	5.93	0.026
A1 mean duration, s	7.9	1.27	9.6	0.96	0.006
A2 mean duration, s	8.5	0.96	9.6	1.05	0.05
A3 mean duration, s	10.7	2.01	13.9	2.24	0.009
A1 index, number/hour	25.8	12.93	23.7	8.84	NS
A2 index, number/hour	15.7	13.63	20.5	11.43	NS
A3 index, number/hour	8.5	4.65	4.7	4.32	NS
B phase mean duration, s	23.5	2.97	23.0	1.87	NS
Cycle (A+B) mean duration, s	31.9	2.90	32.9	1.66	NS
CAP sequence mean duration, s	204.6	54.88	209.5	38.39	NS
Number of CAP sequences	34.9	4.26	32.7	7.39	NS

NS = not significant. NREM: non- rapid eye movement; SWS: slow wave sleep = NREM stage 3 and 4.

Table 4. Sleep architecture parameters at baseline and after treatment in PD subjects (n=5).

	Baseline		treatment		Wilcoxon
	mean	S.D.	mean	S.D.	p<
Time in bed, min	486.4	45.33	460.8	29.66	NS
Sleep period time, min	463.5	41.60	434.4	33.46	NS
Total sleep time, min	422.2	38.77	364.2	61.54	NS
Sleep latency, min	20.9	8.17	22.3	13.90	NS
Stage R latency, min	144.1	43.38	177.8	114.46	NS
Stage shift/hour	9.5	1.84	10.4	1.34	NS
Awakenings/hour	4.5	1.57	4.5	0.95	NS
Sleep efficiency,%	86.9	4.34	78.8	10.32	NS
Wakefulness, %	8.9	3.36	16.5	8.54	NS
NREM stage 1, %	9.8	2.73	9.3	2.15	NS
NREM stage 2, %	51.1	5.73	51.7	12.80	NS
NREM SWS, %	15.5	3.95	8.6	7.65	NS
REM stage, %	14.7	4.75	13.9	5.36	NS

The percentages of wakefulness after sleep onset and sleep stages are referred to sleep period time. NS = not significant. NREM: non-REM; REM: rapid eye movement; SWS: slow wave sleep = NREM stage 3 and 4.

Table 5. CAP parameters at baseline and after treatment in PD subjects (n=5).

	Baseline		Treatment		Wilcoxon
	mean	S.D.	mean	S.D.	p<
Total CAP Rate, %	33.0	11.82	34.2	11.78	NS
in NREM, stage 1	4.1	5.43	5.5	5.01	NS
in NREM, stage 2	33.0	14.45	36.7	14.01	NS
in NREM, SWS	53.2	17.49	62.1	13.27	NS
A1 subtypes, %	66.1	10.36	70.7	3.77	NS
A2 subtypes, %	16.8	5.66	13.6	4.89	NS
A3 subtypes, %	17.1	7.25	15.6	4.80	NS
A1 mean duration, s	7.1	0.49	6.2	1.18	NS
A2 mean duration, s	8.2	0.90	7.6	0.99	NS
A3 mean duration, s	9.3	0.82	8.2	0.61	NS
A1 index, number/hour	31.1	12.83	36.5	9.75	NS
A2 index, number/hour	7.6	4.27	6.8	3.57	NS
A3 index, number/hour	5.3	1.98	5.5	1.35	NS
B phase mean duration, s	24.7	2.53	22.0	5.15	NS
Cycle (A+B) mean duration, s	32.3	2.68	28.8	4.01	NS
CAP sequence mean duration, s	200.3	63.94	197.5	63.10	NS
Number of CAP sequences	34.8	5.50	31.8	9.36	NS

NS = not significant. NREM: non- rapid eye movement; SWS: slow wave sleep = NREM stage 3 and 4.

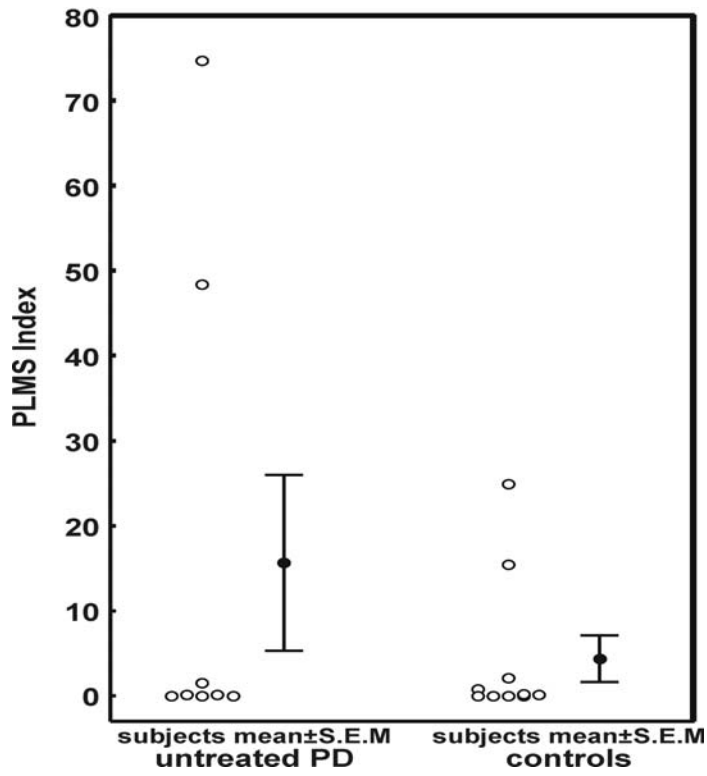


Figure. 1. PLMS index in all subjects included in this study and group mean (\pm S.E.M.).

REFERENCES

- [1] Dauvilliers Y. Insomnia in patients with neurodegenerative conditions. *Sleep Med* 2007;8(Suppl 4):S27-34.
- [2] Ondo WG, Vuong KD, Jankovic J. Exploring the relationship between Parkinson disease and restless legs syndrome. *Arch Neurol* 2002;59:421-424.
- [3] Arnulf I, Leu S, Oudiette D. Abnormal sleep and sleepiness in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2008;21:472-477.
- [4] Etminan M, Samii A, Takkouche B, Rochon PA. Increased risk of somnolence with the new dopamine agonists in patients with Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Saf* 2001;24:863-868.
- [5] Shpirer I, Miniovitz A, Klein C. Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease: a polysomnography study. *Mov Disord* 2006;21:1432-1438.
- [6] Diederich NJ, Vaillant M, Mancuso G, Lyen P, Tiete J. Progressive sleep 'destructuring' in Parkinson's disease. A polysomnographic study in 46 patients. *Sleep Med* 2005;6:313-318.
- [7] Diederich NJ, Paolini V, Vaillant M. Slow wave sleep and dopaminergic treatment in Parkinson's disease: a polysomnographic study. *Acta Neurol Scand* 2009;120:308-313.
- [8] Terzano MG, Parrino L, Smerieri A, et al. Atlas, rules and recording techniques for the scoring of cyclic alternating pattern (CAP) in human sleep. *Sleep Medicine* 2002; 3: 187-199.
- [9] Comella C. Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Current Neurology and Neuroscience reports* 2003,3: 173-80.

- [10] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.1992;55:181-4.
- [11] Folstein M, Folstein S, McHugh P. "Mini Mental State": A practical method for grading the cognitive states of patients for the clinician. *J Psy Res*.1975;12:189-98.
- [12] Bertolucci PFH, Brucki SMD, Campacci SR, Juliano Y. O miniexame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr*. 1994;52: 1-7.
- [13] Almeida OP. Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência. *Arq Neuropsiquiatr*.1998;56:605-12.
- [14] American Psychiatric Association. Diagnostic criteria from DSM-IV-TR™ Washington 2000
- [15] Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice research. *Psychiatry Res*. 1989;28:193-213.
- [16] Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep*. 1991;14(6):540-5.
- [17] Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961; 4:561-571.
- [18] Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck depression inventory and the State-Trait anxiety inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:453-457.
- [19] Hoehn MH, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-47.
- [20] Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF, for the American Academy of Sleep Medicine. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, Terminology and technical specifications, 1ªed.: Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2007.

- [21] Fahn S, Elton RL and Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information. 1987. p.153-63.
- [22] Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques, and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington: Washington Public Health Service, US Government Printing Office;1968.
- [23] Parrino L, Ferri R, Zucconi M, Fanfulla F. Commentary from Italian Association of Sleep Medicine on the AASM manual for the scoring of sleep and associated events: for debate and discussion. *Sleep Medicine* 2009, 10: 799-808.
- [24] Zucconi M, Ferri R, Allen R, Baier PC, Bruni O, Chokroverty S, Ferini-Strambi L, Fulda S, Garcia-Borreguero D, Hening WA, Hirshkowitz M, Högl B, Hornyak M, King P, Montagna P, Parrino L, Plazzi G, Terzano MG. The official World Association of Sleep Medicine (WASM) standards for recording and scoring periodic leg movements in sleep (PLMS) and wakefulness (PLMW) developed in collaboration with a task force from the International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG). *Sleep Med* 2006;7:175-183.
- [25] Ferri R, Zucconi M, Manconi M, Bruni O, Miano S, Plazzi G, Ferini-Strambi L. Computer-assisted detection of nocturnal leg motor activity in patients with Restless Legs Syndrome and periodic leg movements during sleep. *Sleep* 2005;28:998-1004.
- [26] Ferri R, Manconi M, Plazzi G, Bruni O, Vandi S, Montagna P, Ferini-Strambi L, Zucconi M. A quantitative statistical analysis of the submental muscle EMG amplitude during sleep in normal controls and patients with REM sleep behavior disorder. *J Sleep Res* 2008;17:89-100.

- [27] Ferri R, Franceschini C, Zucconi M, Vandi S, Poli F, Bruni O, Cipolli C, Montagna P, Plazzi G. Searching for a marker of REM sleep behavior disorder: Submentalis muscle EMG amplitude analysis during sleep in patients with narcolepsy/cataplexy. *Sleep* 2008;31:1409-1417.
- [28] Parrino L, Boselli M, Spaggiari MC, Smerieri A, Terzano MG. Cyclic alternating pattern (CAP) in normal sleep: polysomnographic parameters in different age groups. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998;107:439-50.
- [29] Ferri R, Huber R, Aricò D, Drago V, Rundo F, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G. The slow-wave components of the Cyclic Alternating Pattern (CAP) have a role in sleep-related learning processes. *Neurosci Lett* 2008;432:228-231.
- [30] Parrino L, Milioli G, De Paolis F, Grassi A, Terzano MG. Paradoxical insomnia: the role of CAP and arousals in sleep misperception. *Sleep Med* 2009;10:1139-45.
- [31] Priano L, Albani G, Brioschi A, Guastamacchia G, Calderoni S, Lopiano L, Rizzone M, Cavalli R, Gasco MR, Fraschini F, Bergamasco B, Mauro A. Nocturnal anomalous movement reduction and sleep microstructure analysis in parkinsonian patients during 1-night transdermal apomorphine treatment. *Neurol Sci* 2003;24:207-8.
- [32] Monaca C, Duhamel A, Jacquesson JM, Ozsancak C, Destée A, Guieu JD, Defebvre L, Derambure P. Vigilance troubles in Parkinson's disease: a subjective and objective polysomnographic study. *Sleep Med* 2006;7:448-53.
- [33] Pennestri MH, Whittom S, Adam B, Petit D, Carrier J, Montplaisir J. PLMS and PLMW in healthy subjects as a function of age: prevalence and interval distribution. *Sleep* 2006;29:1183-7.
- [34] Ferri R, Zucconi M, Manconi M, Plazzi G, Bruni O, Ferini-Strambi L. New approaches to the study of periodic leg movements during sleep in Restless Legs Syndrome. *Sleep* 2006;29:759-769.

- [35] Ferri R, Gschliesser V, Frauscher B, Poewe W, Högl B. Periodic leg movements and periodic leg movement disorder in patients presenting with unexplained insomnia. *Clin Neurophysiol* 2009;120:257-263.
- [36] Clemens S, Rye D, Hochman S. Restless legs syndrome: revisiting the dopamine hypothesis from the spinal cord perspective. *Neurology* 2006;67:125-30.
- [37] Stefansson H, Rye DB, Hicks A, Petursson H, Ingason A, Thorgeirsson TE, Palsson S, Sigmundsson T, Sigurdsson AP, Eiriksdottir I, Soebeck E, Bliwise D, Beck JM, Rosen A, Waddy S, Trotti LM, Iranzo A, Thambisetty M, Hardarson GA, Kristjansson K, Gudmundsson LJ, Thorsteinsdottir U, Kong A, Gulcher JR, Gudbjartsson D, Stefansson K. A genetic risk factor for periodic limb movements in sleep. *N Engl J Med* 2007;357:639-47.
- [38] Boeve BF. REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1184:15-54.

Capítulo 5.

MicroRNA expression analysis in blood: a potential Parkinson's Disease biomarker

Regina Margis^{1,3}, Rogério Margis^{2,3} and Carlos R. M. Rieder¹

¹ Neurology Section, Movement Disorders Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, zip code: 90035-00, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Centre of Biotechnology, Building 43431, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, P.O. Box 15005, zip code 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

³ VITATEC Cons. Des. Biotecnologia Ltda, Avenida Assis Brasil 1809/301, zip code 91010-005, Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords: Parkinson's disease, microRNA, neurodegenerative disease, RT-qPCR, molecular marker.

***Corresponding author:**

Regina Margis

R. Marques do Pombal, 1824/102. Zip code 90540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

e-mail address: regina.margis@terra.com.br

Abstract

The present study demonstrates that blood samples can be used as a source of miRNA identification and as Parkinson's disease (PD) biomarkers. A set of six microRNAs with differential expression were chosen. They were clustered in two groups according to their expression profile in control, non-treated, early-onset and treated Parkinson's disease subjects. While miR-1, miR-22* and miR-29 expression levels allowed us to distinguish non-treated PD from healthy subjects, miR-16-2*, miR-26a2* and miR30a differentiated treated from untreated patients.

1.Introduction

The molecular mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease (PD) is mostly unknown. Pathologically, PD is characterized by the loss of dopaminergic nigral neurons, accompanied by gliosis and the presence of eosinophilic intracytoplasmic inclusions known as Lewy bodies in the remaining substantia nigra pars compacta neurons. Alpha-synuclein is the principal component of filamentous of Lewy bodies, the defining pathological hallmark of PD [1]. It is also now appreciated that PD is associated with extensive nondopaminergic pathology, which involves cholinergic neurons of the nucleus basalis of Meynert, norepinephrine neurons of the locus coeruleus, serotonin neurons in the midline raphe, as well as neurons in the cerebral cortex, brainstem, spinal cord and peripheral autonomic

nervous system [2]. The etiology of PD is a complex interaction among genes, environment and brain aging. Although in a minority of cases it is due to well-defined genetic causes, a combination of genetic and environmental factors are believed to account for the vast majority of cases. This includes interactions between several genes, modifying effects by susceptibility alleles, the influence of environmental agents on gene expression and their direct impact on the developing and aging brain [3].

The use of biomarkers remains investigational in PD. A biomarker is a characteristic that is objectively measured as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes or pharmacological responses to a treatment. Biomarkers can help determine disease pathophysiology and a drug's mechanism of action [4]. The identification of potential biomarkers in PD would be of remarkable value. Currently, there is no reliable biomarker for PD, except in a small minority of patients with a monogenetic form of the disorder, in whom at least the underlying disease trait can be unequivocally determined by mutational analysis. However, even in these patients, the relationship between the biomarker (a mutation detection method) and disease development is complex because of the often reduced and age-dependent penetrance and variable expressivity [5].

The genetic dissection of common diseases such as PD is the current challenge of medical genomics. Several diseases have genetic components that are not easily detected, in part because loci involved in these conditions may have a small size effects, and these loci may interact among them. This may not be the case for microRNAs, which can regulate a large set of genes from different pathways at

the transcriptional and translational levels. Indeed, microRNAs have been used as molecular markers in a series of diseases, including cancer, neurodegenerative disorders and others [6-8]. Recently, it has been proposed that microRNAs (miRNAs) can play a role in PD [9-11].

MicroRNAs are evolutionarily conserved, small, approximately 22 nucleotides, non-coding RNAs. Most miRNAs are thought to post-transcriptionally inhibit protein coding genes by affecting their translation and/or mRNA stability [12,13]. The miRNAs bind multiple target RNA species and are associated with many biological functions [14] like neuronal gene expression [15] and pathological processes like the development of cancer [16], neurodegenerative disorders [17] and schizophrenia [18].

The present study was designed to evaluate the expression of miRNAs in *de novo* PD (untreated patients) and the effect of levodopa treatment on miRNA expression. As among patients with early manifestation of the disease, there is a high incidence of affected first-degree relatives, indicating that genetic factors play a role in pathogenesis. We also evaluated if there were differences in miRNA between early-onset and late-onset PD.

2.Methods

2.1.Subjects and procedures

This study was approved by the local ethics committee and all subjects provided informed consent before entering into the study.

Fifteen PD patients were included in the study. Eight were untreated PD patients (*de novo* PD) and seven were early-onset PD attending an outpatient Movement Disorders Clinic of a university hospital in Southern Brazil from May 2007 to June 2008. All patients fulfilled the clinical criteria for PD (the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria) [19]. Exclusion criteria were as follows: (1) presence of other neurological disease; (2) presence of psychiatric disorder according to a structured clinical interview for DSM disorders; (3) Mini-Mental State Examination (MMSE) [20] lower than 24[21]. The semi-structured interview was used to collect information on demographic variables, disease history and drug record. PD symptoms were evaluated using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) [22] and the Hoehn and Yahr modified version (HY) [23]. Depressive symptoms were assessed by the Beck depression inventory (BDI) [24]. Previous untreated *de novo* patients (NT group) were treated with levodopa plus carbidopa and followed for one year. Levodopa treatment resulted in motor symptom improvement as evaluated by UPDRS subset III in the NT group.

The control group was constituted by eight no-PD volunteers. These subjects were selected among outpatient clinics and among PD spouses. Control group exclusion criteria were the same as described above.

Blood samples were taken from all subjects interviewed: *de novo* PD (NT group), early-onset PD (EOPD group), control subjects (CNT group) and from four randomly selected previously untreated PD patients after 97 (\pm 39) days of the levodopa/carbidopa treatment (T group).

2.2. Quantitative Real Time PCR

Peripheral blood samples were obtained between 5-8 PM and immediately mixed with a five-fold volume of Trizol (Invitrogen) for total RNA extraction. Mature microRNA expression was evaluated by quantitative real time PCR (qRT-PCR) of microRNAs by stem-loop RT-PCR, as described by Chen et al [25].

Mature miRNA cDNA was synthesized according to the following: 100 ng of total RNA(1:20); 4 µl of stem loop primer mix (supplementary Table 1) (0.4 µM each); 0.4 µl of M-MLV reverse transcriptase (Promega) 200 U/µl; 4 µl M-MLV reverse transcriptase 5X reaction buffer (Promega) and 2 µl of 5 mM dNTP in a final volume of 20 µl. The synthesis of the cDNA was completed after a series of three incubations: 16 °C for 30 min, 42 °C for 30 min and 85 °C for 5 min.

The qRT-PCR mix: 10 µl of cDNA (1:30); 0.4 µl of specific microRNAs forward primer (supplementary Table 1) (20 µM) and universal reverse primer (supplementary Table 1) (10 µM) primers; 0.4 µl of 5 mM dNTPs; 2 µl of 10X PCR buffer; 1.2 µl of 50 mM MgCl₂; 2 µl of 1X SYBR Green[®] (Molecular probes); 0.05 µl of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) to a final volume of 20 µl. SYBR-Green[®] was used to detect amplification, estimate C_T values and to determine specificity after melting curve analysis. The PCR cycling conditions were standardized to: 94 °C for 5 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 15 s. After the main amplification, sample fluorescence were measured at temperatures from 55 to 99 °C with an increasing ramp of 0.1° C in order

to obtain the denaturing curve of the amplified products and assure their homogeneity after peak detection and T_m estimation using data obtained from an Applied Biosystems StepOne system.

As an initial step of this study, a PCR array was performed with microRNAs previously reported as potentially associated with sleep deprivation [26] and neurodegenerative disorders [9-11, 27]. The complete list of the 85 microRNAs used in the PCR array are indicated in supplementary data (Table 2). A set of six microRNAs with more informative expression patterns among each experimental group was chosen. The group was composed of miR-1, miR-22*, miR-29a, miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a, which were selected out of 85 microRNAs present in the initial screening due their differential expression patterns.

2.3.Data Analysis

The six selected microRNAs presented an efficiency of amplification in the 0.94 to 0.98 range among the different cDNA-derived blood samples, as calculated by internal sample exponential amplification analysis [28]. The relative expression was obtained using the $2^{-\Delta Ct}$ method, where the Crossing threshold (Ct) values of the target samples are subtracted from the average Ct values of the standard or control samples. The use of $2^{-\Delta Ct}$ is adequate, as the amount of RNA among the different blood samples to produce the cDNAs did not differ significantly and produced similar Ct values among samples for 20 different microRNAs used in the initial screening (data not shown).

Statistical analysis of the relative expression values obtained for each microRNA between pairs of experimental groups were performed by the Student's t-test implemented in SPSS Statistics 17 software. In order to compare the expression levels among the four experimental groups, the Waller-Duncan and Tukey HSD tests were performed with SPSS 17, with identical group discrimination and similar probability values.

The target microRNAs that have the potential binding sites for individual microRNAs were identified by searching them on public databases endowed with prediction algorithms present in miRBase [29]

3.Results

We evaluated eight *de novo* PD patients (NT group) with a mean age of 66 years (sd 6.7), seven EOPD subjects with a mean age of 45 years (sd 8.7) and eight no-PD volunteers (CNT group) with a mean age of 67 years (sd 8.0). Disease duration was 3.0 (sd 2.6) and 7.2 years (sd 6.6) in the NT and EOPD groups, respectively. Each group was constituted by 50% males. Motor symptoms evaluated by UPDRS-section III were 19.9 (sd 8.9) and 21.6 (sd 13.8) in the NT and EOPD groups, respectively. Most of the NT subjects (62.5%) showed unilateral motor impairment only, corresponding to the HY 1 stage, while 37.5% of the NT patients presented bilateral or midline involvement without impairment of balance (HY 2 stage). Distribution of the Hoehn-Yahr staging among EOPD subjects was as follows: HY 1(42.8 %), HY 2 (28.6 %) and HY 3, corresponding to bilateral disease

with mild to moderate disability and postural reflex impairment (28.6%). Levodopa treatment resulted in motor symptom improvement as evaluated by UPDRS subset III. All subjects presented mean BDI scores below the cutoff score for depression screening [30,31]. No significant differences in MMSE score were found between groups.

A set of three miRNAs, miR-1, miR-22* and miR-29a, showed reduced profiles of relative expression in the *de novo* PD (NT) and treated groups (T) when compared to control subjects (CNT) and the early-onset PD group (EOPD) (Figure 1). NT group had significantly lower miR-1 expression than the CNT and EOPD groups ($p=0.031$ and $p=0.015$, respectively). In addition, miR-1 expression was not statistically different between the T group, which was constituted by NT patients after levodopa treatment and CNT subjects. According to this result, it is suggested that levodopa treatment can play a role in restoring normal miR-1 relative expression levels.

De novo PD patients also showed low relative miR-22* expression. In comparison with the CNT group, NT subjects showed a trend toward low miR-22* expression ($p=0.067$).

Considering miR-29a, the NT group showed lower miR-29a expression than the CNT group, and levodopa treatment did not significantly change this expression. Interestingly, low miR-29a expression was maintained after treatment; the T group showed a trend to lower expression than the CNT group.

A second set of three miRNAs, miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a, presented no statistical differences in their relative expressions between the CNT and NT groups (Figure 2A). These same miRNAs showed a 50% increase in their relative expression in the groups constituted by PD patients taking dopaminergic drugs, EOPD compared to CNT group (Figure 2B), while only miR-16-2* and miR-26a2* were increased in treated individuals (T) compared to the NT group (Figure 2C).

In summary, miR-1, miR-22* and miR-29a showed low expressions in PD blood samples. Altogether, this miRNAs expression analysis showed a significant distinction between the NT and control group (Figure 3A). The group of miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a analyzed together showed a higher expression in the EOPD group than in the CNT and NT groups (Figure 3B).

4. Discussion

The present study demonstrated that six microRNAs, miR-1, miR-16-2*, miR-22*, miR-26a2*, miR-29a and miR-30a, have their relative expression levels altered in the blood of PD patients. Examples of differential miRNA expression have been shown in patients and animal models of neurodegenerative disorders [32]. In a mouse model of PD, miR-133b was found to be downregulated [9], and analyses on post-mortem tissue showed a decreased expression of miR-133b in the midbrain of patients with PD. The miRNAs can act at many stages to trigger the production or

degradation of toxic proteins, and changes in these steps may have a role in the neurodegenerative process [11].

Alpha-synuclein accumulation can interfere with α -tubulin solubility and distribution, leading to neuronal dysfunction. Alpha-synuclein overexpression impairs microtubule-dependent traffic, [33] and in its aggregated forms, plays a critical role in the pathogenesis of PD. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) interacts with the tubulin/microtubule system *in vitro* and *in vivo*, and is enriched in human pathological brain inclusions. The primary intracellular target of TPPP/p25 is tubulin/microtubules, [34] and abnormal TPPP/p25 accumulation has been associated with alpha-synuclein aggregates. It has been proposed that upregulated TPPP/p25 could be a specific marker for pathological conditions associated with abundant aggregation of alpha-synuclein, such as PD [35, 36]. Reinforcing this idea, it should be noted that TPPP/p25 is a target of miR-1, which, in the present study, showed lower expression levels in *de novo* PD when compared with healthy subjects.

In addition to TPPP/p25, clathrin heavy chain is also a target of miR-1. In humans, there are two isoforms of clathrin heavy chain (CHC17 and CHC22), which are encoded by the genes CLTC and CLTD. Studies have indicated that clathrin may be involved in mediating microglial endocytosis of aggregated alpha-synuclein and associated with microglial activation [37]. Knockdown of CHC by small interfering RNAs inhibited both constitutive and protein kinase C-mediated internalization of the dopamine transporter (DAT)[38]. Internalization of D2 dopamine receptors is clathrin-dependent and select to nonsynaptic membranes in the primate prefrontal

cortex [39]. Peripheral blood lymphocytes also express many neurotransmitters and neuropeptide receptors. Previous studies have shown that blood samples from PD subjects present increased expression of CLTB [40] and dopamine receptors on lymphocytes [41].

Considering the current study data, it should be noted that dopamine transport regulation in PD patients is related to miR-1 and mir-30a. The former is associated with CHC properties, as described above, and miR-30a has SLC6A3 (solute carrier family 6 – neurotransmitter transporter – dopamine) as a potential target. The plasma membrane dopamine transporter (DAT) present at the cell surface is regulated by the rate of DAT internalization to endosomes and DAT recycling back to the plasma membrane. DAT is expressed in presynaptic terminals of substantia nigra dopaminergic neurons, where it mediates the re-uptake of synaptic-released dopamine. Alpha-synuclein acts in the modulation of DAT functions by regulating synaptic tone of dopamine [42].

Moreover, miR-30a may also target fibroblast growth factor (FGF20), which is targeted by miR-16-2*. In this study, both miR-30a and miR-16-2* showed the highest expression in PD subjects after levodopa treatment. *In vitro* studies showed that FGF20 promotes survival and stimulates dopamine release in a calbindin-negative subset of cells that are preferentially lost in PD, [43] and it has been suggested that FGF20 regulates alpha-synuclein expression [44]. A previous study identified a point mutation in PD patients in the 3'UTR of FGF20 that disrupts the miR-433 binding site [27]. Recent study found no evidence of association between FGF20 variability and PD risk [45].

Like miR-16-2*, our data demonstrated that PD subjects after levodopa treatment have higher miR-26a2* expression than the *de novo* PD group. miR-26a2* has a tyrosinase precursor gene as one of its potential targets. It is known that in the presence of tyrosinase, dopamine modifies and inactivates tyrosine hydroxylase [46]. Tyrosinase overexpression may be either neuroprotective due to the formation of neuromelanin, or toxic due to increased dopamine [47]. A previous study [48] demonstrated that tyrosinase is expressed at low levels in the human brain, and the tyrosinase activity was found to be higher in substantia nigra. Another potential target of miR-26a2* is the glutamate receptor 1 precursor (GRIA1), as with miR-30a. Glutamate receptor-1 mRNA is widely expressed in the human brain [49]. Studies have demonstrated that glutamatergic regulation can take place in PD symptoms and treatment, [50] but discussion about glutamate's role in PD is beyond the scope of this section.

The assembly of miR-16-2*, miR-26a2* and miR30a presented higher expression in treated PD (Figure 3B). The treatment effects were evaluated in two groups: T and EOPD. These miRNAs showed the highest expression in the EOPD group. It should be noted that the EOPD group consisted of patients that were submitted to more than one antiparkinsonian drug, and they had a longer disease duration than the T group. When miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a were analyzed together, we identified that they were expressed significantly higher in both treated groups (EOPD and T groups) than in the CNT and NT groups. A statistical difference was not observed when this analysis was performed between the EOPD

and T groups, reinforcing the potential role of the antiparkinsonian drug in these miRNAs expressions.

The miR-1, miR-22* and miR-29a expression levels evaluated together showed that the EOPD group had higher expression levels than the NT and T groups. It should be noted that distinct mechanisms can underlie these results. There are some additional features implicated in these data, including that the EOPD and T groups received distinct antiparkinsonian drugs, whose mechanism of action, as well the treatment duration, could exert interference in miRNA expression. Considering the EOPD and NT groups, it should be noted that some group characteristics like disease duration and EOPD pathophysiology may contribute to these results.

Relative expression of miR-1, miR-22* and miR-29a analyzed together did not show a significant distinction between the NT and T groups. Each of these miRNAs (miR-1, miR-22* and miR-29a) showed lower expressions in the NT group compared to the CNT group, indicating a possible regulatory mechanism among their targets. Some miR-1 targets have been mentioned previously in this text. Concerning miR-22*, it is appropriate to remark on two of its potential targets: tumor suppressor p53-binding protein 2 (TP53BP2) and GRIA. As cited above, GRIA is also targeted by miR-26a2* and miR-30a.

According to the present data, miR-29a was the only miRNA evaluated where the decreased expression observed in the NT group was maintained after levodopa treatment (Figure 1). These results allow us to suggest that (i) mir-29a is associated with PD, as demonstrated by the relative expression difference between the NT and control groups, and that (ii) the lower miR-29a expression in PD should not be

directly related to the occurrence of motor symptom changes because the decreased miR-29a expression was maintained despite motor symptom improvement. This maintained low expression pattern evokes special interest in terms of miR-29a having a role in PD.

Cell division cycle 42 (CDC42), which is related with septin, is targeted by miR-29a. Septin4 is a member of the septin family of polymerizing GTP-binding proteins that serve as scaffolds for molecules beneath the plasma membrane[51]. Recently, postmortem substantia nigra of a PD study described the presence of increased levels of septin4 and the parallel increase of septin4 and alpha-synuclein in PD [52]. Septin4 was found to co-aggregate with alpha-synuclein in substantia nigra Lewy bodies. It may be required as a component of a presynaptic scaffold that supports the molecular machinery for dopamine turnover [53]. In mammals, CDC42 seems to have dual roles in promoting the organization of the actin cytoskeleton and septin complexes [54]. In summary, mir-29a targets CDC42. CDC42 is related to septin, which is associated with alpha-synuclein in substantia nigra Lewy bodies.

Curiously, the expression of miR-29a also has a decreased expression level in Alzheimer's disease [55, 56]. These studies correlated miR-29 decrease with increased BACE1/beta-secretase expression and neuron navigator 3. Other positive correlations of miR-29a in PD neurodegenerative processes are the identification of microtubule and tubulin regulation, including microtubule-associated protein 6 (MAP6), microtubule-associated protein member 2 (MAPRE2) and tubulin beta 2B(TUBB2B) as other potential targets. Moreover, as described above, CDC42 exerts a role in PD. Schnack et al. [57] has proposed that components of small

GTPase signal transduction pathways might be targeted by alpha-synuclein oligomers, which potentially leads to signaling deficits and neurodegeneration.

Considering the neurodegenerative process and cell damage occurrence in PD, some miRNAs evaluated in the present study also have trophic factors as their targets. This can be understood, in one way, as a kind of compensatory mechanism target by some miRNAs. Conversely, the reduction of these trophic factors by distinct features, such as aging, may exacerbate the neurodegenerative process. It must be considered that BDNF's ability to protect neuronal activity can be affected by aging [58]. Animal models have shown that increased BDNF expression following striatal damage can be beneficial to dopaminergic neurons; however, these changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression may be lost with age [59, 60].

BDNF has been identified as a potential target of miR-1. It is present in neurons, glia and peripheral immune cells. BDNF promotes the survival of dopaminergic neurons and protects them from toxin-induced damage *in vitro* [61]. BDNF increases dopamine content and tyrosine hydroxylase activity [62]. BDNF action is transduced through the high affinity tyrosine kinase receptor (trkB), and a large number of dopaminergic mesencephalic neurons seem to express both BDNF and TrkB [61]. BDNF protein expression is reduced in substantia nigra, [63] and BDNF levels are increased in PD cerebral spinal fluid when compared with normal subjects [64]. This BDNF elevation in CSF may be caused by an increased generation of glial cells resulting from brain damage [65]. Production of BDNF by glial cells in PD patients may represent an active response to neurodegeneration [64].

Insulin-like-growth factor-1(IGF-1) is also linked to the preservation and homeostasis of the nervous system. MiR-1, miR-29a and miR-30 all target IGF-1. The considerable density of the IGF-1 receptors is evident in the substantia nigra, [66] and a protective effect of IGF-1 against dopamine-induced neurotoxicity has been shown in human and rodent neuronal cultures [67]. Activation of the IGF-1 pathway can rescue α -synuclein toxicity and suppress α -synuclein aggregation through the activation of PI3K/Akt pathways [68]. Serum and brain IGF-1 levels change in several human neurodegenerative diseases [69]. Recently, a study found that blood IGF-1 levels, although statistically non-significant, were mildly elevated in treated PD patients in comparison with controls [70].

We have shown miRNA expression levels from peripheral blood sources and discussed some potential miRNA targets that could be related to PD pathophysiology. Some limitations should be kept in mind considering the results of this study, like the small sample size and properties of miRNA. A single miRNA can target many transcripts and a single transcript can be targeted by many miRNAs, transcripts can present differences in tissue distribution. We are concerned that the present results were obtained from blood, and that these miRNAs may show different expression patterns in brain tissue. Moreover, these differences in miRNA expression may even occur among distinct brain areas [9,26]. The extent of miRNA expression pattern correlation between peripheral blood and different brain structures should be evaluated in future research.

5. Conclusion

MiR-1, miR-22* and miR-29a showed low expressions in PD blood samples. Altogether, this miRNAs expression analysis showed a significant distinction between the NT and control group. MiR-16-2*, miR-26a2* and miR30a expression levels allowed us to distinguish treated from untreated patients. Despite the cellular functions of many human miRNAs remaining unknown and the complexity of Parkinson's disease, we assume that further miRNA studies will contribute to PD biomarker development. In addition, peripheral blood as a source of this information could facilitate miRNA studies in humans, as well their future clinical applicability.

FIGURES:

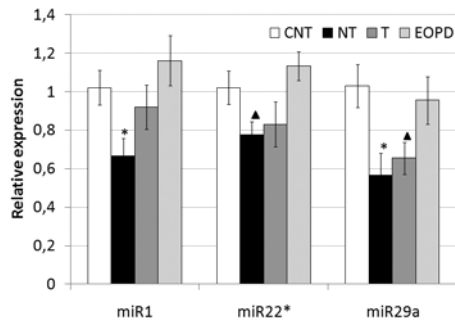


Figure 1. Relative expressions of miR-1, miR-22* and miR-29a among the patient groups. Mean (\pm standard deviation) miRNA relative expression in blood of the control (CNT), *de novo* PD (NT), treated PD (T) and early-onset PD (EOPD). Mir1: lower expression in NT than CNT and EOPD; miR-22*: a trend to lower expression in NT than CNT; miR-29a: lower expression in NT (statistically significant) and T (trend) than the CNT group. Waller-Duncan and Tukey HSD tests; asterisks indicate $p < 0.05$, triangle indicates $p = 0.07$.

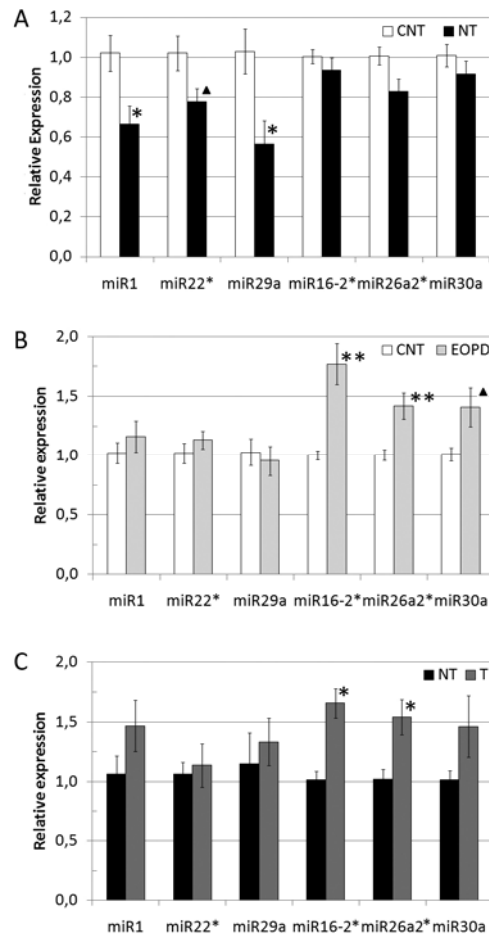


Figure 2. Pairwise analysis of the set of six miRNAs: miR-1, miR-22*, miR-29a, miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a. Data represent mean (\pm standard deviation) of miRNA relative expression. **(2A)** *De novo* PD group (NT) showed lower miR1, miR-22* and miR-29a relative expression than the control group (CNT); NT and CNT presented no statistical difference in miR16-2, miR-26a2* and miR30a; Student's t test, asterisks indicate $p < 0.05$, triangle indicates $p = 0.07$. **(2B)** Higher miR16-2* and miR26a2* relative expression occurred in early-onset Parkinson's disease (EOPD) than the CNT group; Student's t test, double asterisks indicate $p < 0.01$, triangle indicates $p = 0.07$. **(2C)** Treated group (T) showed higher miR-16-2* and miR-26a2* than the NT group; Student's t test, asterisks indicate $p < 0.05$.

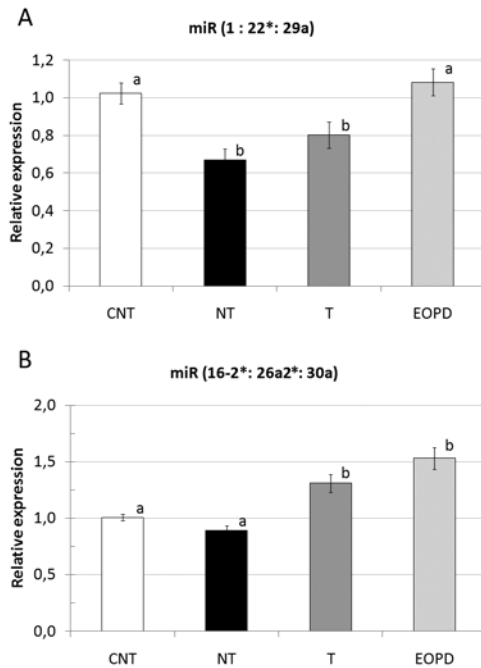


Figure 3. Grouped miRNA relative expression analysis. (3A) Altogether, miR-1, miR-22* and miR-29a expression showed lower expression in *de novo* PD (NT) than the control (CNT) and early-onset Parkinson's disease (EOPD) groups. **(3B)** Assemblage of miR-16-2*, miR-26a2* and miR-30a relative expression analysis showed a significant difference between treated (T and EOPD) and untreated groups. Waller-Duncan and Tukey HSD tests; different letters indicate statistically significant differences between groups, $p < 0.05$.

Acknowledgements

This work was supported by Universal grant from CNPq (485347/2007-5). Regina Margis, Carlos Roberto de Mello Rieder and Rogerio Margis were partially supported by Ph.D. and research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (307213/2008-0 and 303967/2008-0).

REFERENCES

- [1] M. G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert, "Alpha-synuclein in Lewy bodies," *Nature*, vol 388, pp.839-840, 1997.
- [2] H. Braak, K. Del Tredic, U. Rub, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, and E. Braak, "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease," *Neurobiology Aging*, vol. 24, pp.197–211, 2003.
- [3] C. Klein, and M.G. Schlossmacher, "Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder," *Neurology*, vol. 69, no.22, pp.2093-2104, 2007.
- [4] O. Rascol, "Disease-modification trials in Parkinson disease: target populations, endpoints and study design," *Neurology*, vol.72, suppl.7, pp.S51-58, 2009.
- [5] T. Gasser, "Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease," *Neurology*, vol.72, suppl.7, pp.S27-31, 2009.

- [6] C.L. Bartels, and G.J. Tsongalis, "MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer," *Clinical Chemistry*, vol. 55, pp.623-631, 2009.
- [7] P.T. Nelson, W.X. Wang, and B.W. Rajeev, "MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases," *Brain Pathology*, vol.18, pp.130-138, 2008.
- [8] K.M. Pauley, S. Cha, and E.K.L. Chan, "MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases," *Journal of Autoimmunity*, vol.32, pp.189-194, 2009.
- [9] J. Kim, K. Inoue, J. Ishii, W.B. Vanti, S.V. Voronov, E. Murchison, G. Hannon, A. Abeliovich, "A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons," *Science*, vol. 317, pp.1220-1224, 2007.
- [10] C. Barbato, F. Ruberti, and C. Cogoni, "Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, article ID 871313, 2009.
- [11] S.M. Eacker, T.M. Dawson, and V.L. Dawson, "Understanding microRNAs in neurodegeneration," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 10, pp. 837-841, 2009.
- [12] W. Filipowicz, S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?," *Nature Reviews Genetic*, vol.9, pp.102-114, 2008.
- [13] D.P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell*, vol. 116, pp.281-297, 2004.
- [14] V. Ambros, "The functions of animal microRNAs," *Nature*, vol. 431, pp. 350-355, 2004.
- [15] J. Wu, and X. Xie, "Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression," *Genome Biology*, vol. 7, pp.R85, 2006.
- [16] P.S. Meltzer, "Cancer genomics: small RNAs with big impacts," *Nature*, vol.435, pp.745-746, 2005.

- [17] M.S. Weinberg, and M.J.A. Wood, "Short non-coding RNA biology and neurodegenerative disorders: novel disease targets and therapeutics," *Human Molecular Genetics*, vol.18, pp.R27-39, 2009.
- [18] D.O. Perkins, C.D. Jeffries, L.F. Jarskog, J.M. Thomson, K. Woods, M.A. Newman, J.S. Parker, J. Jin, and S.M. Hammond, "microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder," *Genome Biology* vol.8, R27, 2007.
- [19] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, and A.J. Lees, "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases," *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol.55, pp.181-184, 1992.
- [20] M. Folstein, S. Folstein, and P. McHugh, "Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive states of patients for the clinician," *Psychiatry Research*, vol.12, pp.189-198, 1975.
- [21] O.P. Almeida, "Miniexame do estado mental e o diagnóstico de demência," *Arquivos de Neuropsiquiatria*, vol.56, pp. 605-612, 1998.
- [22] S. Fahn, R.L. Elton, and Members of the UPDRS Development Committee, "Unified Parkinson's disease rating scale," In: S. Fahn, C.D. Marsden, D. Calne, M. Goldstein, editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Florham Park, N.J.: Macmillan Healthcare Information, pp.153-163, 1987.
- [23] M.H. Hoehn, and M.D. Yahr, "Parkinsonism: onset, progression, and mortality," *Neurology*, vol. 17, pp. 427-447, 1967.
- [24] A.T. Beck, C.H. Ward, M. Mendelson, J. Mock, and J. Erbaugh, "An inventory for measuring depression," *Archives of General Psychiatry*, vol.4, pp.561-571, 1961.
- [25] C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahavakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, and K.J. Guegler, "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR," *Nucleic Acids Research* vol.33, no.20, pp.e179, 2005.

- [26] C.J. Davis, S.J. Bohnet, J.M. Meyerson, J.M. Krueger, "Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation," *Neuroscience Letters*, v.422, pp.68-73, 2007.
- [27] G. Wang, J.M. van der Walt, G. Mayhew, Y-J. Li, S. Züchner, W.K. Scott, E.R. Martin, and J.M. Vance, "Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson's disease by overexpression of α -synuclein," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 82, pp.283-289, 2008.
- [28] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H. Deprez, A.F. Moorman, "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data," *Neuroscience Letters*, vol.339, no.1, pp.62-66, 2003.
- [29] N.D. Mendes, A.T. Freitas, and M.F. Sagot, "Current tools for the identification of miRNA genes and their targets," *Nucleic Acids Research*, vol 37, pp.2419-2433, 2009.
- [30] M. Visser, AFG. Leetjens, J. Marinus, A.M. Stiggelbout, J.J. van Hilten, "Reliability and validity of Beck depression inventory in patients with Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol.21, no.5, pp.668-672, 2006.
- [31] A. Schrag, P. Barone, R.G. Brown, A.F.G. Leetjens, W.M. McDonald, S. Starkstein, D. Weintraub, W. Poewe, O. Rascol, C. Sampaio, G.T. Stebbins, and C.G. Goetz, "Depression rating scales in Parkinson's disease: critique and recommendations," *Movement Disorders*, vol. 22, no.8, pp.1077-1092, 2007.
- [32] R. Roshan, T. Ghosh, V. Scaria, and B. Pillai, "MicroRNAs: novel therapeutic targets in neurodegenerative diseases," *Drug Discovery Today*, vol. 14 (23/24), pp. 1123-1129, 2009.
- [33] H-J. Lee, F. Khoshaghideh, S. Lee, S-J. Lee, "Impairment of microtubule – dependent trafficking by overexpression of α -synuclein," *European Journal of Neuroscience*, vol. 24, pp.3153-3162, 2006.

- [34] E. Hlavanda, J. Kóvacs, J. Oláh, F. Orosz, K.F. Medzihradsky, and J. Ovádi, "Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations," *Biochemistry*, vol.41, pp. 8657-8664, 2002.
- [35] G.G. Kovács, L. László, J. Kovács, P.H. Jensen, E. Linderson, G. Botond, T. Molnár, A. Perczel, F. Hudecz, et al, "Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies," *Neurobiology of Disease*, vol. 17, pp.155-162, 2004.
- [36] G.G. Kovacs, E. Gelpi, et al, "The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of neurodegenerative diseases," *Acta Neuropathol*, vol.113, pp.153-161, 2007.
- [37] J. Liu, Y. Zhou, Y. Wang, H. Fong, T.M. Murray, J. Zhang, "Identification of proteins involved in microglial endocytosis of alpha-synuclein," *J Proteome Res*, vol. 6, no.9, pp.3614-3627, 2007.
- [38] T. Sorkina, B.R. Hoover, R. Zahniser, A. Sorkin, "Constitutive and protein kinase c-induced internalization of the dopamine transport is mediated by a clathrin-dependent mechanism," *Traffic*, vol.6, pp.157-170, 2005.
- [39] C.D. Paspalas, P. Rakic, P.S. Goldman-Rakic, "Internalization of D2 dopamine receptors is clathrin-dependent and select to dendro-axonic appositions in primate prefrontal cortex," *European Journal Neuroscience*, vol.24, pp.1395-1403, 2006.
- [40] C.R. Scherzer, A.C. Eklund, L.J. Morse, Z. Liao, J.L. Locascio, et al, "Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood," *Proceeding of the National Academy of Sciences*, vol.104, no.3, pp. 955-960, 2007.
- [41] P. Barbanti, G. Fabbrini, A. Ricci, R. Cerbo, E. Bronzetti, B. Caronti, C. Calderaro, L. Felici, F. Stocchi, G. Meco, F. Amenta, and G.L. Lenzi, "Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease," *Movement Disorder*, vol.14, no.5, pp.764-771, 1999.

- [42] A. Sidhu, C. Wersinger, P. Vernier, "α-synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease," *FEBS Letters*, vol. 565, pp.1-5, 2004.
- [43] S. Murase, and R.D. McKay, "A specific survival response in dopamine neurons at most risk in Parkinson's disease," *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, no.38, pp. 9750-9760, 2006.
- [44] H.J. Rideout, P. Dietrich, M. Savalle, W.T. Dauer, L.Stefanis, "Regulation of α-synuclein by bFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons," *Journal of Neurochemistry*, vol.84, pp. 803-813, 2003.
- [45] C. Wider, J.C. Dachsel, A.I. Soto, M.G. Heckman, N.N. Diehl, M. Yue, S. Licoln, J.O. Aasly, K. Haugarvoll, J.Q. Trojanowski, et al, "FGF20 and Parkinson's disease: an association or pathogenicity via α-synuclein expression," *Movement Disorders*, vol. 24, no.3, pp. 455-459, 2009.
- [46] Y. Xu, A.H. Stokes, R. Roskoski Jr, and K.E. Vrana. "Dopamine in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosinase hydroxylase," *Journal of Neuroscience Research* vol. 54, pp.691-697, 1998.
- [47] T. Hasegawa, M. Matsuzaki, A. Takeda, A. Kikuchi, K. Furukawa, S. Shibahara, and Y. Itoyama, "Increased dopamine and its metabolites in SH-SY5Y neuroblastoma cells that express tyrosinase," *Journal of Neurochemistry*, vol. 87, pp. 470-475, 2003.
- [48] E. Greggio, E. Bergantino, D. Carter, R. Ahmad, G-E. Costin, V.J. Hearing, J. Clarimon, A. Singleton, J. Eerola, O. Hellström, P.J. Tienari, D.W. Miller, A. Beilina, L. Bubacco and M.R. Cookson, "Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol.93, pp.246-256, 2005.
- [49] C. Puckett, C.M. Gomez, J.R. Korenberg, H. Tung, T.J. Meier, X.N. Chen, and L. Hood, "Molecular cloning and chromosomal localization of one of the human glutamate receptor genes," *Proceeding of the National Academy of Sciences*, vol.8, pp.7557-7561, 1991.

- [50] F. Calón, A.H. Rajput, O. Hornykiewicz, P.J. Bédard, T Di Paolo, Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease, *Neurobiology of Disease*, vol. 14, pp.404-416, 2003.
- [51] C.M. Field, and D. Kellogg, "Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases?," *Trends in Cell Biology*, vol.9, pp.387-394, 1999.
- [52] L. Shehadeh, G. Mitsi, N. Adi, N. Bishopric, and S Papapetropoulos, "Expression of Lewy body protein septin 4 in postmortem brain of Parkinson's disease and control subject," *Movement Disorder*, vol.24, pp. 204-210, 2008.
- [53] M. Ihara, N. Yamasaki, A. Hagiwara, A Tanigaki, A Kitano, R. Hikawa, H. Tomimoto, M. Noda, M Takanashi, H. Mori, N. Hattori, T. Miyakawa, and M Kinoshita, "Sept4, a component of presynaptic scaffold and lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity," *Neuron* vol.53, pp. 519-533, 2007.
- [54] Lihuan Cao et al, "The evolution, complex structures and function of septin proteins," *Cellular and Molecular Life Science*, vol.66, pp.3309–3323, 2009.
- [55] S.S Hébert, K. Horré, L. Nicolai, A.S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A.N. Silaharoglu, S. Kauppinen, A. Delacourte, and B. De Strooper, "Loss of microRNAs cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE 1/ β -secretase expression", *Proceeding of the National Academy of Sciences*, vol.105, pp.6415-6420, 2008.
- [56] M. Shioya, S. Obayashi, H. Tabunoki, K. Arima, Y. Saitoh, T. Ishida, and J. Satoh, "Aberrant microRNAs expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3", *Neuropathology and Applied Neurobiology*, doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01076.x, 2010.
- [57] C. Schnack, K.M. Danzer, B. Hengerer, and F. Gillardon, "Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with CDC42 effector proteins," *Neuroscience*, vol. 154, pp. 1450-1457, 2008.

- [58]F. Sohrabji, and D.K. Lewis, Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases, *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol.27, pp.404-414, 2006.
- [59]T.J. Collier, Z. Dung Ling, P.M. Carvey, A. Fletcher-Turner, D.M. Yurek, J.R. Sladek Jr, J.H. Kordower, “Striatal trophic factor activity in aging monkeys with unilateral MPTP-induced parkinsonism,” *Experimental Neurology*, vol.191, suppl. 1, pp.60-67, 2005.
- [60]P.E. Batchelor, G.T. Liberatore, J.Y. Wong, M.J. Porritt, F. Frerichs, G.A. Donnan, D.W. Howells, “Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor,” *Journal Neuroscience*, vol.19, no.5, pp.1708-1716, 1999.
- [61]M.G. Murer, Q. Yan, and R. Raisman-Vozari, “Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease,” *Progress in Neurobiology*, vol. 63, pp.71-124, 2001.
- [62]A. Othberg P. Odin, A. Ballagi, A. Ahgren, K. Funa, and O. Lindvall, “Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro,” *Experimental Brain Research*, vol.105, pp.111-22,1995.
- [63]K. Parain, M.G. Murer, Q. Yan, B. Faucheux, Y Agid, E, Hirsch, and R, Raisman-Vozari, “Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra,” *Neuroreport*, vol.10, pp.557-561,1999.
- [64]Z. Salehi, F. Mashayeki, “Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson’s disease,” *Journal Clinical Neuroscience*, vol.16, pp.90-93, 2009.
- [65]C. Knott, G. Stern, A. Kingsbury, A.A. Welcher. G.P. Wilkin, “Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson’s diseased nigra,” *Parkinsonism and Related Disorders*, vol.8, pp. 329-341, 2002.

- [66] J. De Keyser, N. Wilczak, J.P. De Backer, L. Herroelen, and G. Vauquelin, "Insulin-like growth factor-I receptors in human brain and pituitary gland: an autoradiographic study," *Synapse* vol. 17, pp.196-202, 1994.
- [67] D. Offen, B. Shtauf, D. Hadad, A. Weizman, E. Melamed, I. Gil-Ad, "Protective effect of insulin-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease," *Neuroscience Letters*, vol.316, no.3, pp.129-132, 2001.
- [68] H-S. Kao, "Rescue of α -synuclein cytotoxicity by insulin-like-growth factors," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 385, pp.434-438, 2009.
- [69] S. Busiguina, A.M. Fernandez, V. Barrios, R. Clark, D.L. Tolbert, J. Berciano, I. Torres-Aleman, "Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors," *Neurobiology of Disease*, vol.7, pp.657-665, 2000.
- [70] D. Tuncel, F.I. Tolun, and I. Toru, "Serum insulin-like growth factor-1 and nitric oxide levels in Parkinson's disease," *Mediators of Inflammation*, ID:132464, 2009.

Supplementary Table 1: Primers used in RT-qPCR

miR acronym	miRNA sequence	Acro mirF	Forward Primer	miRNA Loop Primer	Universal Reverse Primer
miRHs26a-2*	CCUUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	miRHs26a-2*	5' CCTATTCTTGATTACTTGTTC	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGAAACA	5' GTGCAGGGTCCGAGGT
miRHs30a	UGUAACAUCUUCGACUGGAAG	miRHs30a	5' TGTAACATCCTCGACTGGAAG	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTTCCA	5' GTGCAGGGTCCGAGGT
miRHs29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	miRHs29a	5' TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAAACCG	5' GTGCAGGGTCCGAGGT
miRHs1	UGGAAUGUAAAAGAUGUUAU	miRHs1	5' TGGAAATGTAAGAAGTATGTAT	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATACAT	5' GTGCAGGGTCCGAGGT
miRHs16-2*	CCAAUUAUACUGUGCUGCUUUA	miRHs16-2*	5' CCAATATTACTGTGCTGCTTTA	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAAAGC	5' GTGCAGGGTCCGAGGT
miRHs22*	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	miRHs22*	5' AGTCTTCACTGGCAAGCTTTA	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAAAGC	5' GTGCAGGGTCCGAGGT

**Supplementary
Table 2. List of microRNAs**

miRNA	Forward primer	miRNA	Forward primer
mirF99a	AACCCgUAgAUCCgAUCUUGgUg	mir30e*	CUUUCAGUCGGAGUUUACAGC
mirF132*	ACCgUggCUUUCgAUUgUUACU	mir143*	GGUGCAGUCUGCAUCUCUGGU
mirF100*	CAAgCUUgUAUCUAUAggUAUg	mir26a-1*	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG
mir26a-2*	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	mir126	UCGUACCUGAGUAAUAAUGCG
mir128	UCACAgUgAACCGgUCUCUUU	let7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mir30d	UgUAAACAUCCCCgACUggAAg	mir24-1*	UGCCUACUGAGCUGAUUACAGU
mir30a*	CUUUCAgUCggAUgUUUgCAGC	mir99b*	CAAGCUCGUGUCUGGGUCCG
mir342-3p	UCUCACACAgAAAUCgCACCCgU	mir29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
mir138-2*	gCUAUUUACgACACCgaggUU	mir139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
mir30a	UgUAAACAUCCUCgACUggAAg	mir16-1*	CCAGUAUUAACUGGUCUGCUGA
mir29a*	ACUgAUUUUUUgUgUUCAg	mir125b-2*	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC
mir99b	CACCCgUAgAACCGACCUUgCg	mir23a	AUCACAUGCCAGGGAUUUCC
mir139-3p	ggAgACgCggCCCUgUUggAgU	mir150*	CUGGUACAGGCCUGGGGACAG
mir191*	gCUgCgCUUggAUUUCgUCCCC	mir181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGU
mir1	UggAAUgUAAAgAAgUAUgUAU	mir22*	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
mir422a	ACUGGACUUAAGGUCAGAAAGGC	mir30c-2*	CUGGGAGAAGGUCUUUACUCU
mir138-1*	GCUACUUCACAACACCAGGGCC	mir222*	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU
let7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	mir191	CAACggAAUCCAAAAGCAGCUg
mir23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUAAC	mir222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
mir127-5p	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	mir181a	AACAUUCAACgCUGUCgUgAgU
mir126*	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	mir181a*	ACCAUCgACCgUgAUUgUACC
mir145	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	mir26a	UUCAAgUAAUCCAggAUAggCU
mir16	UAGCAGCAGUAAAUAUUGGCG	mir150	UCUCCCAACCCUgUACCAgUg
mir23a*	GGGGUUCUGGGGAUGGGAUUU	mir30c	UgUAAACAUCCUACACUCUCAgC
mir185*	AGGGGCGGGCUUUCUCUGGUC	mir125a-5p	UCCCUgAgACCCUUUAACCUgUgA
mir16-2*	CCAAUUAUACUGUGCUGCUUUA	mir125a-3p	ACAaggUgAggUUCUUGggAgCC
let7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	mir181a-2*	ACCACUgACCgUgACUgUACC
mir103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	mir132	UAACAgUCUACAgCCAUGgUCg
mir27b*	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	mir24-2*	UgCCUACUgAgCUgAAACACAg
let7d*	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	let7e*	CUAUACggCCUCCUAgCUUCC
mir23b*	UGGGUUCUGGCAUGCUGAUUU	mir342-5p	AggggUgCUAUCUgUgAUUgA
mir125b	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	mir487b	AAUCgUACAgggUCAUCCACUU
mir24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	let7c*	UAgAgUUACACCUCgggAgUUA
mir100	AACCCGUAGAUCGAAACUUGUG	mir125-b1*	ACgggUUAggCUCUUgggAgCU
mir22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	let7b*	CUAUACAACCUACUgCCUUC
mir99a*	CAAGCUCGCUUCUAUGGGUCUG	mir145*	ggAUUCUgAgAAUACUgUUCU
mir99a	AACCCGUAGAUCGAAACUUGUG	mir185	UggAgAgAAAggCAGUUCUgA
let7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	mir30-c1*	CUgggAgAgggUgUUUACUCC
mir30d*	CUUUCAGUCAGAUUUUUGCUGC	mir27b	UUCACAgUggCUAAGUUCUgC
mir143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	mir107	AgCAGCAUUGUACAgggCUAUA
mir138	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	mir30e	UgUAAACAUCCUgACUggAAg
mir127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	mir433	AUCAUgAUgggCUCCUCgUgU
mir133b	UUUggUCCCCUUAACCAgCUA		

Capítulo 6.

Relatório descritivo de patente de invenção: método para diagnóstico e monitoramento de alfa-sinucleinopatias pela determinação de níveis de miRNAs em amostras biológicas.

(Encaminhado ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual)

Inventores: Regina Margis^{1,2}, Rogério Margis^{1,2} e Carlos R. M. Rieder¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²VITATEC Cons. Des. Biotecnologia Ltda, Porto Alegre, RS, Brazil

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLEINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE miRNAs EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos *in vitro* de diagnóstico e/ou prognóstico. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um método para o diagnóstico e/ou prognóstico de alfa-sinucleinopatias, como a Doença de Parkinson. O método da invenção compreende a quantificação comparativa de miRNAs de amostras de indivíduos suspeitos ou acometidos de alfa-sinucleinopatias, proporcionando informação diagnóstica/prognóstica útil na definição de condutas clínicas.

Antecedentes da Invenção

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica que acomete homens e mulheres de diferentes raças e classes sociais. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a DP ocorre em 1.8¹-3.3²% dos indivíduos com idade superior a 65 anos. Frente ao aumento da expectativa de vida da população mundial torna-se evidente a tendência ao aumento do número de pessoas potencialmente acometidas pela DP e a importância do adequado diagnóstico nestes pacientes. Também tem sido demonstrado piora na qualidade de vida dos indivíduos com DP³⁻⁵ e de seus cuidadores⁴.

A Doença de Parkinson é uma alfa-sinucleinopatia caracterizada pela ocorrência de sintomas motores como rigidez muscular, tremor de repouso, bradicinesia e instabilidade postural⁶. Os sintomas não-motores da DP incluem disfunções autonômicas, sensoriais e neuropsiquiátricas⁷.

As características clínicas da DP e a sua progressão são muito variáveis para cada paciente. Existem diferentes propostas para os critérios a serem considerados no

diagnóstico clínico da DP. Os critérios propostos pelo Banco de Cérebros de Londres⁶ têm sido utilizados e consistem em três etapas: (1) Na primeira etapa é avaliada a presença de sintomas compatíveis com a síndrome parkinsoniana, na qual é necessária a presença de bradicinesia associada a pelo menos uma das seguintes manifestações: rigidez muscular, tremor de repouso, instabilidade postural. (2) Na segunda etapa são considerados os critérios de exclusão para a DP, ou seja, o indivíduo não pode apresentar: história de acidentes vasculares encefálicos de repetição com progressão em degraus de sintomas, história de traumas cranianos repetidos, antecedente comprovado de encefalite, crises oculógiras, uso de neuroléptico desde o início dos sintomas da doença, mais que um caso de acometimento familiar, remissão prolongada de sintomas, persistência de acometimento unilateral após três anos, paralisia ocular supranuclear, sinais cerebelares, acometimento autonômico precoce e acentuado, demência em fases iniciais da doença, sinais piramidais, presença de lesões expansivas intra-cranianas (tumores, hidrocefalia à neuroimagem), exposição ao MPTP, má-resposta terapêutica a altas doses de levodopa. (3) Na terceira etapa estão os critérios denominados como de sustentação para o diagnóstico da DP, sendo necessário três ou mais dos seguintes: início unilateral, acometimento assimétrico; doença progressiva; assimetria persistente afetando principalmente o lado de início da doença; resposta excelente à levodopa (melhora de 70 a 100%); resposta à levodopa por cinco anos ou mais; discinesia induzida pela terapia com levodopa; evolução clínica igual ou superior a dez anos.

Atualmente, o diagnóstico definitivo para DP só é possível com a confirmação pela necropsia. Os critérios propostos para confirmação histopatológica da DP consistem em redução substancial de células nervosas na substância negra acompanhada de gliose; pelo menos um corpúsculo de Lewy na substância negra ou no *locus ceruleus* (devem ser examinadas pelo menos quatro diferentes seções em cada uma dessas áreas antes de concluir que os corpúsculos de Lewy estão ausentes); nenhuma evidência patológica para outra doença que produza parkinsonismo, por exemplo: paralisia supranuclear progressiva, degeneração cortico-gânglio-basal, atrofia de múltiplos sistemas⁸. Ressalta-se, desta forma, a importância da diferenciação entre DP e outras

doenças que apresentem parkinsonismo como paralisia supranuclear progressiva, degeneração cortico-gânglio-basal, atrofia de múltiplos sistemas.

Os sinais e sintomas motores da DP devem-se, primariamente, a alterações funcionais dos núcleos da base. De fato, a progressão das dificuldades motoras na DP reflete a gradual degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais. No entanto, ressalta-se que a partir dos achados descritos por Braak e cols (2002)⁹ foi destacado o envolvimento de diferentes estruturas cerebrais, além dos núcleos da base, na fisiopatologia da DP o que auxilia a compreender as diferentes manifestações motoras e não motoras da DP. Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da DP a sua etiologia ainda não está completamente estabelecida. Deve-se destacar que o diagnóstico de DP permanece unicamente baseado em critérios clínicos e na experiência da avaliação realizada pelo médico neurologista. Ressalta-se que diversos quadros clínicos cursam com a ocorrência tremor o que reforça a necessidade do adequado diagnóstico diferencial. Estudos atuais sugerem que é frequente a presença de sintomas não motores antecedendo os sintomas motores e desta forma o diagnóstico de DP¹⁰.

Pesquisas em biologia molecular têm estudado e identificado diferentes microRNAs (miRNAs)¹¹. As miRNAs são seqüências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA (ácido ribonucléico) não-codificante e tem sido proposto que regulem a expressão do gene através do emparelhamento base-específico com RNAmensageiro (RNAm) alvo. Até o momento entende-se que a maioria do miRNAs, em espécies animais, atuam através da inibição da efetiva tradução do RNAm de genes alvo através de um imperfeito pareamento de base com a região 3'UTR (untranslated region) dos RNAm alvo. Esse mecanismo parece estar envolvido com a inibição do início da tradução¹². Em 2007, foi identificado um miRNA, miR-133b, que é expresso em neurônios dopaminérgicos. O miR-133b regula a maturação e função de neurônios dopaminérgicos e foi identificado como deficiente no cérebro de pacientes com DP¹³.

A ocorrência de alterações na expressão de miRNA também foi descrita em células tumorais e tem sido proposto que tais alterações possam contribuir no

desenvolvimento do câncer¹⁴. Também foi identificada modificação na expressão de miRNA em líquido cérebro-espinhal relacionados à Doença de Alzheimer¹⁵.

Considerado o potencial da quantificação de miRNA para o diagnóstico de diversas patologias a necessidade de utilizar tecido para essa dosagem dificulta a utilização desta medida em patologias neurológicas. No entanto, a possibilidade da quantificação de miRNAs em sangue venoso periférico poderia ser considerado como uma ferramenta útil e de baixo risco se comparado a procedimentos como biópsia cerebral e punção de líquido cérebro-espinhal.

A literatura científica que circunscreve os objetos da invenção, sem contudo antecipá-los ou sequer sugerir-los é apresentada a seguir.

1. De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*.2000; 54(11) Suppl 5: S21-3.
2. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, Cardoso F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil: (the Bambuí study). *Mov Disord*. 2006; 21(6):800-8.
3. Chrischilles EA, Rubenstein LM, Voelker MD, Wallace RB, Rodnitzky RL. The health burdens of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13(3):406-13.
4. Schestatsky P, Zanatto VC, Margis R, Chachamovich E, Reche M, Batista RG, Ficke D, Rieder CRM. Quality of life in a Brazilian sample of patients with Parkinson's disease and their caregivers. *Rev Bras Psiquiatr*.2006; 28(3):209-11.
5. Rahman S, Griffin HJ, Quinn NP, Jahanshahi M. Quality of life in Parkinson's Disease: the relative importance of the symptoms. *Mov Disord*. 2008; 23(10),1428-34.

6. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.*1992; 55:181-4.
7. Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2008; 15(Suppl 1):14-20.
8. Gelb D; Oliver E; Gilman SAN. Diagnostic criteria for parkinson disease. *Archives of Neurology.*1999; (56): 33-39.
9. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.*2004; 318:121-34.
10. Chaudhuri RK, Naidu, Y. Early Parkinson' disease and non-motor issues. *J Neurol.* 2008; 225(suppl5): 33-38.
11. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005, 132:4653-4662.
12. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis,mechanism and function. *Cell* 2004, 116: 281-297.
13. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB et al. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 2007; 317: 1220-1224.
14. Meltzer PS. Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; 435:745-6.
15. Cogswell JP, Taylor IA, Waters , Shi Y, Cannon , Keinar K, Kempainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA. Identification of miRNA changes in Alzheimer 's disease brain and CSF yields putative biomarkers ad insights into disease pathways. *J Alzheimer Dis.* 2008;14(1):27-41.

A literatura patentária contempla documentos apenas parcialmente relacionados aos objetos da presente invenção.

O pedido internacional de patente WO 2009/009457 "ALZHEIMER'S DISEASE-SPECIFIC MICRO-RNA MICROARRAY AND RELATED METHODS", depositado pela Fundação de Pesquisa da Universidade de Louisville, revela métodos de diagnóstico e/ou prognóstico de Demência de Alzheimer pela medida da quantidade, em

uma amostra biológica, de um ou mais micro-RNAs relacionados a Demência de Alzheimer.

O pedido internacional de patente WO 2008/153692 “MICRORNA EXPRESSION PROFILING OF CEREBROSPINAL FLUID“, depositado por THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC., revela métodos de diagnóstico nos quais o nível de determinado microRNAs específicos são determinados no fluido cérebro-espinhal de um indivíduo. O método pode ser usado para o diagnóstico ou monitoramento de doenças neurológicas, especialmente tumores cerebrais.

O pedido internacional de patente WO 2007/107789 “TREATMENT OF CNS CONDITIONS“, depositado por Silentis S.A., revela métodos e composições para o tratamento de condições patológicas do sistema nervoso central, por meio da administração intranasal de uma composição que modula, por RNA interferência, a expressão e/ou atividade de genes envolvidos em tais condições.

O pedido internacional de patente WO 2009/025852 “METHODS OF USING miRNA FOR DETECTION OF IN VIVO CELL DEATH“, depositado por Xenomics, INC. revela métodos não-invasivos para a detecção de morte celular, através da medida de miRNAs tecido-específicos. O método pode ser aplicado na detecção de patologias causadas ou acompanhadas de morte celular, efeitos citotóxicos induzidos por fatores químicos ou físicos e a presença de anormalidades fetais específicas.

O pedido internacional de patente WO 2009/026416 “SHORT-CONTROLLING NUCLEIC ACIDS USEFUL IN THE TREATMENT AND DETECTION OF DISEASES“, depositado por VDX LLC, revela métodos para a utilização de sequências curtas controladores (scRNAs) para triagem e identificação de ácidos nucléicos alvo que se liguem a seqüências de scRNAs em *loop*. Também são revelados métodos para detectar scRNAs e métodos para diagnóstico e tratamento úteis de doenças nas quais scRNAs ou níveis aberrantes dos mesmos são expressos.

O pedido internacional de patente WO 05045034, “RNA INTERFERENCE MEDIATED TREATMENT OF PARKINSON DISEASE USING SHORT

INTERFERING NUCLEIC ACID (siRNA)”, depositado por SIRNA Therapeutics, INC., revela métodos e reagentes úteis na modulação de genes da Doença de Parkinson, por exemplo, a expressão gênica de PARK1 (SNCA), PARK2, PARK7, e/ou PARK5 em uma variedade de aplicações, incluindo terapêutica, diagnóstica, validação de alvos e descobertas genômicas. Especificamente, são reveladas moléculas pequenas de ácido nucleico, como siNA, siRNA, dsRNA, miRNA, e shRNA, como moléculas capazes de mediar a RNA interferência contra a expressão gênica e/ou atividade de SNCA. As referidas moléculas são propostas como úteis no diagnóstico e tratamento de Doença de Parkinson e a qualquer outra doença ou condição que responda à modulação da expressão ou atividade de PARK1 (SNCA), PARK2, PARK7, e/ou PARK5.

Não foram encontrados no estado da arte antecedentes que antecipem integralmente, ou sequer sugiram, mesmo que em combinação, a estratégia da presente invenção.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar métodos de diagnóstico e/ou prognóstico de alfa-sinucleinopatias, como a Doença de Parkinson.

Em um aspecto, sendo, portanto, um dos objetos da invenção, é proporcionado um método que compreende a quantificação comparativa de miRNAs de amostras de indivíduos suspeitos ou acometidos de alfa-sinucleinopatias.

É também um outro objeto da presente invenção proporcionar um método diagnóstico/prognóstico que compreende a quantificação comparativa de miRNAs (microRNAs) selecionados de um grupo que compreende: miR 1, miR16-2*, miR22*, miR26a2*, miR29a, miR30a, miR487b, let7c*, miR16, miR100, miR150, miR125-b1*, miR132 e miR191, ou ainda combinações dos mesmos.

Estes e outros da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra o padrão de expressão de microRNAs com níveis alterados na comparação entre indivíduos controle (Cnt) e diagnosticados clinicamente como apresentando a Doença de Parkinson (PD) – Grupo I (Low temperature).

A figura 2 mostra o padrão de expressão de microRNAs com níveis alterados na comparação entre indivíduos controle (Cnt) e diagnosticados clinicamente como apresentando a Doença de Parkinson (PD) - Grupo II (High temperature).

Descrição Detalhada da Invenção

Os detalhes relatados a seguir visam facilitar a reprodução da invenção, devendo, portanto, ser compreendidos como meramente ilustrativos, sem com isso restringir o escopo da invenção.

A presente invenção é baseada no fato de que alguns miRNAs são expressos em diferentes níveis em sangue periférico, quando avaliado pacientes com Doença de Parkinson em relação a indivíduos sem a doença. Esta observação permite considerar a utilização de sangue periférico na avaliação desta patologia. A comparação pode ser feita entre os níveis de miRNA em sangue venoso de um determinado indivíduo em relação a controles. A comparação pode ser feita de forma direta ou pelo cálculo da razão entre os microRNAs e a determinação da presença da patologia (e sua evolução ou remissão) se a relação exceder limites de 25, 50 ou 75% em relação aos níveis observados em indivíduos controle, sem a doença.

A invenção é direcionada para o diagnóstico e monitoramento de uma alfa-sinucleinopatia, a Doença de Parkinson, a partir de amostra de sangue venoso em um determinado indivíduo. O termo diagnóstico se refere à detecção da doença. O termo monitoramento se refere aos testes realizados em pacientes com o diagnóstico prévio da

referida doença tendo como proposta medir a progressão da doença ou efeito do tratamento.

Em uma concretização preferencial, o método da invenção compreende a obtenção de uma amostra de sangue venoso periférico de um dado indivíduo e a análise dessa amostra para determinar a concentração ou quantidade de uma série de até quatorze microRNAs em análise. Os resultados obtidos são comparados com os obtidos de amostras controle. A amostra controle provém de indivíduos livres da doença. No caso em que o método for utilizado para monitorar a doença, a amostra “controle” é o resultado do teste obtido do próprio paciente na medida anterior. Ou seja, o paciente pode ser avaliado para mudanças nos níveis de miRNAs em diferentes momentos e estágios da doença, assim como previamente e posteriormente a determinada intervenção terapêutica (medicação ou cirurgia).

Ressalta-se que não é necessário que a amostra controle seja obtida e analisada no mesmo momento em que esteja sendo realizada a análise da amostra teste. Uma vez que os dados “controle” podem ser pré-estabelecidos, esses níveis poderão fornecer a base para comparação sem a necessidade de repetir uma nova análise do controle para cada teste a ser analisado. A comparação entre as amostras teste e controle fornece a base para a conclusão quanto ao fato de o indivíduo ser acometido por uma alfa-sinucleinopatia (por exemplo, Doença de Parkinson) em análise no caso do método estar sendo utilizado para o diagnóstico ou se a doença está progredindo ou regredindo; no caso do método estar sendo utilizado para monitorar a patologia. De um modo geral, quanto maior diferença entre a amostra teste e a amostra controle, mais intensa a indicação da presença da doença.

Os microRNAs empregados no método da invenção incluem: miR-1; miR16-2*; miR22*; miR26a2*; miR29a; miR30a; miR487b; let7c*; miR16, miR100, miR150, miR125-b1*, miR132 e miR191. As designações fornecidas estão associadas a sequências específicas que podem ser encontradas no registro de microRNA

(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Os microRNAs referem-se a sequências encontradas em humanos, ilustrada/os na tabela 1.

Tabela 1: Sequência nucleotídica dos microRNAs maduros, com os quais foi desenvolvido a metodologia para diagnóstico de alfa-sinucleinopatias.

MicroRNA	Seqüência
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
let-7c*	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA
miR-22*	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
miR-26a2*	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC
miR-29^a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR-30^a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
miR-16-2*	CCAAUAAUACUGUGCUGCUUUA
miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
miR-125-b1*	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU
miR-132*	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU
miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

Por vezes, há membros da família destes miRNAs que são reconhecidos e os quais poderiam ser considerados como equivalentes a seqüência específica. Apesar das seqüências serem apresentadas como seqüências de RNA, deve ser compreendido que se referindo à hibridização ou outros ensaios as seqüências de DNA correspondente

podem ser utilizadas da mesma forma. Por exemplo, seqüência de RNA pode ser transcrita ao reverso e amplificada usando a reação em cadeia da polimerase visando facilitar a detecção. Nesses casos será o DNA diretamente quantificado. Também deve ser esclarecido que o complemento da seqüência de DNA transcrita ao reverso pode ser analisado ao invés da seqüência em si. Nesse contexto, o termo complemento se refere ao oligonucleotídeo que apresenta a exata seqüência complementar.

Para análise dos microRNAs a partir da amostra de sangue é utilizado o método de PCR quantitativo, com o emprego de fluoróforos intercalantes como o SYBR-green (ou equivalente) como descrito nos trabalhos de Chen et al de 2005 (Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33:e179) e de Jiang JM et al de 2005 (Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research* 33: 5394-5403).

Também podem ser utilizadas sondas marcadas com fluoróforos específicos (FAM, HEX, TAMRA ou outros) como descrito em trabalhos correlacionando níveis de miRNAs com o câncer (Chen et al. 2009. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology* 50: 358-369; Childs et al. 2009. Low-Level Expression of MicroRNAs let-7d and miR-205 Are Prognostic Markers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *American Journal of Pathology* 174: 736-745; Sun et al. 2008. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 464-473; Szafranska et al. 2008. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical Chemistry* 54: 1716-1724; Tang et al. 2008. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 32: 355-364).

O nível de expressão dos microRNAs quantificada, tendo-se como base a metodologia de PCR em tempo real, será realizada em duas etapas. Na 1ª etapa, uma série de até 14 oligonucleotídeos (multi-plex) contendo uma seqüência universal fusionada a uma seqüência microRNA específica de seis nucleotídeos será utilizado

para a síntese de cDNA a partir do microRNA. Na 2ª etapa, as reações de PCR em tempo real serão realizadas utilizando um oligonucleotídeo que é microRNA específico e um oligonucleotídeo complementar a seqüência universal presente no oligonucleotídeo utilizado para a síntese dos cDNAs.

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) serão realizadas em equipamento padrão. De forma ilustrativa, considera-se que a PCR apresente etapas das reações que serão compostas de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 10s a 94°C, 15s a 60°C e 10s a 72°C. Após, as amostras serão aquecidas de 60 para 99°C com um aumento de 0,1°C/s para adquirir os dados produzidos pela curva de desnaturação dos produtos amplificados. qRT-PCRs serão feitos em um volume final de 20 µL composto de 10 µL de cada amostra de cDNA diluída de 50 a 100 vezes em 2 µL de Platinum Taq 10x PCR buffer, 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,4 µL dNTPs 5 mM, 0,4 µL do par de oligonucleotídeos a 10 µM, 3,95 µL H₂O, 2,0 µL SYBR green ou sonda marcada, e 0,05 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL).

Os versados na arte valorizarão imediatamente os importantes benefícios decorrentes do uso da presente invenção. Variações na forma de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

Reivindicações

MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLEINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE miRNAs EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1. Método para diagnóstico/prognóstico de alfa-sinucleinopatias em determinado indivíduo, caracterizado por compreender:
 - a) determinar a concentração, em um material compreendendo fluido e/ou tecido biológico, da quantidade ou níveis de um grupo de microRNAs através de metodologias de PCR quantitativa utilizando fluoróforos intercalantes e/ou sondas fluorescentes;
 - b) comparar a concentração ou quantidade de um ou do conjunto dos microRNAs determinada na etapa “a” com a concentração ou quantidade dos mesmos de uma ou mais amostras biológicas de indivíduos controle.
2. Método, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida alfa-sinucleinopatia é a Doença de Parkinson.
3. Método, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido fluido biológico é sangue.
4. Método, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido material biológico compreende células mononucleares.
5. Método, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os microRNAs são selecionados de um grupo que compreende: miR 1, miR16-2*, miR22*, miR26a2*, miR29a, miR30a, miR487b, let7c*, miR16, miR100, miR150, miR125-b1*, miR132 e miR191, ou ainda combinações dos mesmos.
6. Método, conforme reivindicação 1, caracterizado por compreender amostras de indivíduos submetidos a tratamentos ou modificação de

tratamentos farmacoterápicos para alfa-sinucleinopatias e Doença de Parkinson, baseadas na quantificação de um ou mais miRNAs.

7. Método para determinar a eficiência de tratamento e/ou progressão de alfa-sinucleinopatias e/ou Doença de Parkinson em um indivíduo, caracterizado por compreender:
 - a. obter uma série de amostras biológicas de um mesmo indivíduo, ao longo de um período de tempo;
 - b. analisar uma série de amostras biológicas para identificar e determinar a quantidade de um ou mais miRNAs correlacionados a alfa-sinucleinopatias e Doença de Parkinson; onde um ou mais miRNA são selecionados do grupo que compreende: miR 1, miR16-2*, miR22*, miR26a2*, miR29a, miR30a, miR487b e let7c*, miR16, miR100, miR150, miR125-b1*, miR132 e miR191, ou ainda combinações dos mesmos; e
 - c. comparar as mudanças mensuráveis de quantidades de um ou mais dos miRNAs em cada uma das amostras biológicas proporcionando indicadores para a determinação da eficiência do tratamento e/ou progressão da alfa-sinucleinopatias e/ou Doença de Parkinson.

Resumo

MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE ALFA-SINUCLEINOPATIAS PELA DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE miRNAs EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A presente invenção revela um método de diagnóstico/prognóstico de alfa-sinucleinopatias como a Doença de Parkinson. O método da invenção compreende a detecção do nível de microRNAs maduros específicos em amostras de fluidos biológicos como o sangue, sendo útil para o diagnóstico, monitoramento de resposta a tratamento químico ou cirúrgico.

Figura 1

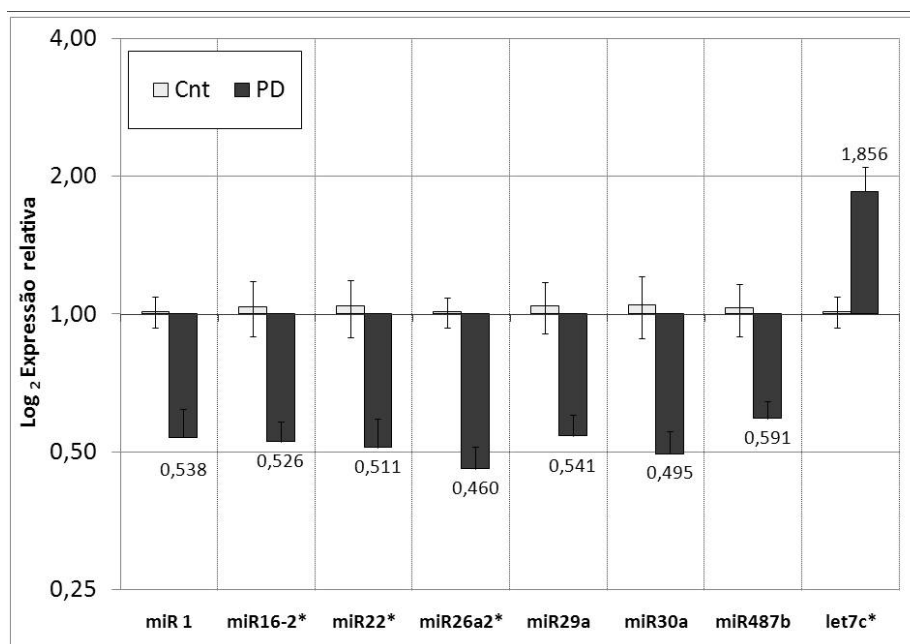
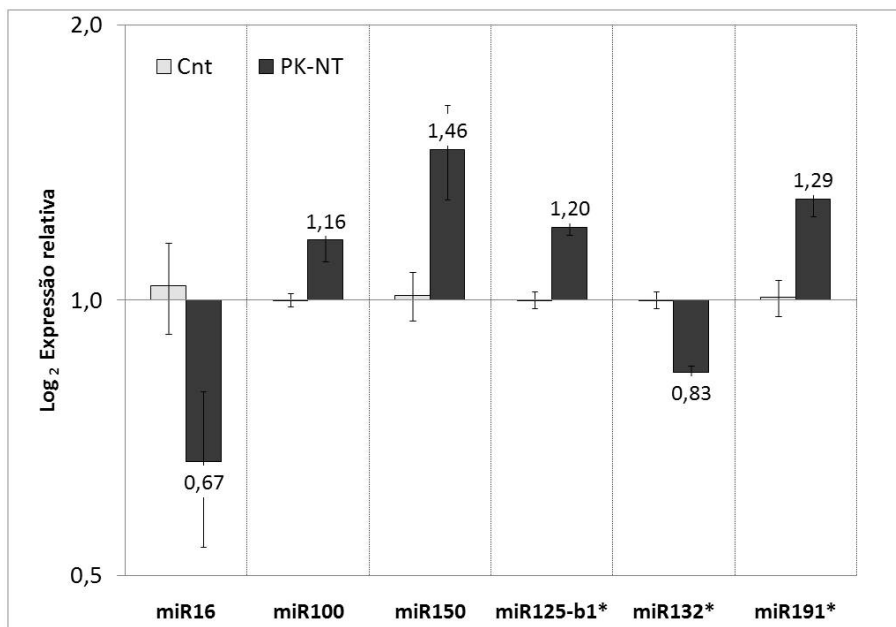


Figura 2



Considerações Finais

O aumento da expectativa de vida da população mundial é evidente, com isso é possível que um maior número de pessoas venha a apresentar manifestações clínicas relacionadas ao envelhecimento. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum cujo fator de risco mais importante é o envelhecimento. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca da compreensão dos processos degenerativos tanto na identificação de biomarcadores como em intervenções terapêuticas.

A DP pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes. Em nossos estudos demonstramos através da escala WHOQOL-OLD de avaliação da qualidade de vida uma correlação de pior qualidade de vida com estágios avançados da doença. A presença de sintomas depressivos foi outro fator relacionado com prejuízo na qualidade de vida (capítulo 2). Demonstramos também que determinadas facetas na qualidade de vida se correlacionam com a qualidade de sono.

O sono na DP foi outro aspecto que estávamos interessados em explorar neste trabalho. A informação de que muitos pacientes com DP apresentam alterações do sono permite considerá-lo como um aspecto a ser periodicamente reavaliado tanto por que alterações do sono podem ocorrer precocemente na doença, como pela possível alteração ao longo da evolução da DP. Assim, a partir da utilização das ferramentas e medidas estudadas nesse trabalho, passa a ser um tópico, para pesquisas futuras, a realização de estudos com delineamento longitudinal que visem

identificar potenciais correlações entre o processo de progressivo comprometimento motor e padrões de alteração do sono. Estudos de seguimento e reavaliação desses pacientes poderão ser realizados tanto com o emprego da versão brasileira da escala de sono para doença de Parkinson – que agora validada no nosso meio (capítulo 1) poderá ser utilizada em pesquisas e na prática clínica – assim como através de medidas obtidas por exames de polissonografia.

Reafirmando o interesse de avaliação do seguimento dos achados que até agora observamos está o efeito identificado na microestrutura do sono. Poderíamos propor que a maior densidade dos fusos do sono nos pacientes com DP (sem tratamento) em comparação a indivíduos sem a doença possa estar relacionado a alteração no mecanismo de regulação da produção de fusos (tanto provocado por um aumento do estímulo ou por uma redução da inibição) (capítulo 3). Isso pode ser decorrente da neurodegeneração de estruturas tais como o núcleo pedunculopontino observada na DP. Assim, alteração nas vias colinérgicas poderia interferir na hiperpolarização dos neurônios reticulares e, conseqüentemente, reduzir a inibição da produção dos fusos do sono. No nosso estudo não foi identificada modificação do efeito após o tratamento com levodopa. No entanto, frente ao pequeno número de pacientes avaliados e ao curto tempo de tratamento, a análise da densidade dos fusos do sono merece ser realizada com um maior número de pacientes, em diferentes estágios da doença e idealmente em estudos com delineamento longitudinal. Destacamos que alguns estudos, desenvolvidos previamente, descreveram a redução do número de fusos do sono ou não identificaram a alteração; nesses estudos a amostra era constituída por indivíduos em diferentes estágios da doença e utilizando variadas medicações antiparkinsonianas. Logo, permanecem questões em relação a

densidade de fusos do sono na DP: se decorrem de uma modificação na regulação dos fusos, se o aumento observado nos estágios iniciais da doença resulta de uma resposta adaptativa a qual se esgota com a evolução da doença, ou se provém do efeito de diferentes esquemas medicamentosos, ou ainda da soma desses fatores. Ainda, no que se refere aos fusos do sono também merece ser avaliado, numa próxima etapa da pesquisa, as características dos fusos como a amplitude, a duração e a frequência interna, pois dessa forma poderá ser ampliada a compreensão desses elementos.

Modificação da microestrutura do sono também pôde ser constatada com a avaliação do PAC (capítulo 4) que evidenciou redução da duração dos subtipos A do PAC no sono NREM. Estudos prévios já haviam descrito a redução do subtipo A1 do PAC com o avanço da idade e que tal achado poderia estar relacionado a uma manifestação de menor capacidade do cérebro de manter o sono. Logo, poderíamos supor que frente ao processo degenerativo observado na DP essa manifestação tenha se mostrado acentuada nos pacientes. Assim, demonstramos que a análise do PAC pode ser uma ferramenta útil na avaliação dos pacientes com DP. Ressaltamos que as considerações expostas acima relacionadas ao seguimento dos pacientes na análise dos fusos do sono também devem ser analisadas em estudos com o PAC, tanto no que se refere ao aumento da amostra a ser estudada quanto na avaliação em diferentes estágios da doença e nos variados esquemas terapêuticos. Dado que os pacientes em estágios iniciais apresentaram alteração em duas medidas de microarquitetura do sono: fusos e PAC.

Além dessas alterações na neurofisiologia do sono observadas na DP também foi explorado por nosso grupo alterações na expressão de microRNAs. No presente

estudo identificamos diferença de expressão de microRNAs em sangue periférico quando comparamos dados de pacientes com DP e indivíduos sem a doença. Os pacientes com DP apresentaram menor expressão de miR-1, miR-22* e miR-29. Também, analisando em conjunto dados de expressão do miR-16-2*, miR-26a2* e miR-30a identificamos que a maior expressão ocorreu nos indivíduos com DP com início precoce em relação aos grupos controle e de pacientes não tratados. O fato de se tratar de uma análise baseada em sangue periférico permite maior facilidade e segurança quanto ao procedimento de coleta para obter a informação quanto a expressão dos miRNA, sobretudo quando comparado a outros estudos que avaliaram microRNA em LCR ou em tecido. Dessa forma, é do interesse dos autores ampliar a amostra de indivíduos estudados, assim como acompanhar os já avaliados quanto a possível modificação da expressão desses microRNAs ao longo da evolução da doença.

Não restam dúvidas quanto a complexidade dos diversos mecanismos associados às diferentes manifestações da DP. A possibilidade de associar as diferentes medidas tanto clínica quanto eletrofisiológica ou molecular de avaliação desses pacientes poderá ampliar a compreensão da doença de Parkinson. Sobretudo devemos poder considerar que as diversas ferramentas de avaliação possam ser complementares visando a identificação de biomarcadores, pois nos cabe reconhecer que as diferentes manifestações identificadas não são expressões isoladas e; sim, fazem parte de uma rede de interações, vias e mecanismos que compõem a DP.

Anexo

Anexo I: Escala de Sono para doença de Parkinson

Escala de Sono para Doença de Parkinson (PDSS)

Como você classificaria o que segue baseado na sua experiência na última semana (coloque um X no local apropriado da linha)

1.A qualidade total de seu sono noturno é:	-----
	PÉSSIMA EXCELENTE
2.Você tem dificuldade em pegar no sono a cada noite?	-----
	SEMPRE NUNCA
3.Você tem dificuldade em permanecer dormido?	-----
	SEMPRE NUNCA
4.Você tem inquietude das pernas ou dos braços à tardinha ou à noite causando interrupção do sono?	-----
	SEMPRE NUNCA
5.Você se remexe cama?	-----
	SEMPRE NUNCA
6.Você sofre de sonhos perturbadores à noite?	-----
	SEMPRE NUNCA
7.Você sofre de alucinação perturbadora à noite (vendo ou ouvindo coisas que lhe dizem não existirem)?	-----
	SEMPRE NUNCA
8.Você levanta à noite para urinar?	-----
	SEMPRE NUNCA
9.Você tem incontinência urinária por que fica incapaz de se mover devido aos sintomas "off" (perda da ação dos remédios)?	-----
	SEMPRE NUNCA
10.Você sente dormência ou formigamento nos braços ou pernas que lhe acordam à noite?	-----
	SEMPRE NUNCA
11.Você tem câibras musculares dolorosas em seus braços ou pernas enquanto dorme à noite?	-----
	SEMPRE NUNCA
12.Você acorda cedo pela manhã numa posição dolorida de pernas e braços?	-----
	SEMPRE NUNCA
13.Você tem tremor quando acorda?	-----
	SEMPRE NUNCA
14.Você se sente cansado e sonolento após acordar de manhã?	-----
	SEMPRE NUNCA
15.Você já adormeceu inesperadamente durante o dia?	-----
	FREQUENTEMENTE NUNCA