



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FERRO, CÁLCIO E ZINCO
EM AMOSTRAS DE CABELOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON

ALTAIR BRITO DOS SANTOS

Jequié – BA
2015

ALTAIR BRITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FERRO, CÁLCIO E ZINCO
EM AMOSTRAS DE CABELOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

Jequié – BA
2015

DEDICATÓRIA

PPGGGBC

Aos meus maravilhosos pais, meu grande e parceiro irmão, aos pacientes participantes desse estudo, ao Prof. Marcelo Eça e ao Prof. Marcos Bezerra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus maravilhosos, e incríveis pais **Domingos José e Marinalva Brito**, que mesmo sem cultura acadêmica, me permitiram chegar até aqui.

Ao meu grande irmão e parceiro **Jordair Brito** que mesmo sendo o irmão mais novo sempre foi o meu protetor, conselheiro, amigo. E minha cunhada e grande amiga **Chirley Valério**.

As meus vários sobrinhos que amo, **Alicia, Elise, Lucas, Joao, Beatriz e Mateus** e seus pais **Ademilton e Gessivalda**

A **Prof. Dra. Débora Diniz e Prof. Dra. Ana Angélica** por terem me dado a oportunidade de ingressar no mestrado.

Aos colegas e parceiros **Joquebede Rodrigues, Fernando Silva, Millena Figueredo, Tássia Liz**.

Agradeço a toda **equipe do laboratório de Química Analítica**, é uma família que tenho orgulho de ter conhecido, em especial ao **Jeferson** pela paciência e parceria.

Agradeço a todos os meus mentores que me guiaram desde a graduação por esse caminho: **Prof. Dr. Sidarta Ribeiro, Prof. Dr. George Barreto, Prof. Dra. Kristi Anne Kolmehier, Prof. Dr. Marcos Bezzera, Prof. Dr. Marcos Túlio**.

Aos grandes amigos irmãos de longas datas **Ana Carla Araújo, Luciano Souza, Valdéria Novaes, Valquiria Novaes, Caleb Lima, Italo Freitas, Klebson Souza, Diego Moreno**, sempre estivemos juntos mesmo distantes fisicamente.

Agradeço a Prof. Dra. Anaildes que me acompanhou nos passos iniciais da Química Analítica. E um agradecimento muito especial a dois professores que sem eles eu não teria alcançado esse título: Marcos Bezerra e Marcelo Eça.

Agradeço também ao programa de pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação e aos coordenadores Prof. Dr. Paulo Afonso, e Prof. Dra. Caroline Garcia, pelo apoio.

E por fim a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por propiciar essa conquista.

BIOGRAFIA

O início da minha carreira acadêmica foi marcado por extremas dificuldades antes e durante a graduação, advindas de diversas áreas da vida: limitações financeiras (pai mecânico e mãe dona de casa), limitação de recursos, aluno de escola pública (sem foco para o vestibular), família sem tradição na academia (fui segundo graduado numa família de mais de 100 pessoas entre tios e primos).

O ingresso no curso de **Fisioterapia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia** foi um grande triunfo para a família que abraçou essa conquista como coletiva. O apoio de meu irmão (Jordair), meus pais (Domingos e Marinalva) foi sacrificante inicialmente, mas tudo correu bem e me graduei em 2010, atuei como funcionário público em meu município por quase 4 anos até o ingresso no Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação em 2014.

Focando na carreira acadêmica, devo considerar que a conquista de um grau de Mestre e uma bolsa de doutorado em um centro internacional de excelência em pesquisa (Universidade de Copenhague – Dinamarca) foi mais uma espantosa conquista após passar no vestibular.

Mas antes dessa conquista muitos caminhos foram percorridos e muitos renomados cientistas me instruíram desde cedo a pensar cientificamente, ter autonomia, humildade, e demais atributos necessários para ser um **cientista**.

Inicialmente me apaixonei pela neurociência em 2008, ainda no quarto período da graduação, quando conheci o então renomado neurocientista Prof. Dr. **Sidarta Ribeiro** (diretor do Instituto Internacional do Cérebro - ICe vinculado a Universidade Federal de Natal – UFRN em Natal - RN), esse grande nome da ciência no país me orientou a distância por 4 anos, com paciência e humildade, enquanto me preparava para ingresso direto da graduação para o doutorado sob sua orientação. No final da graduação 2009 outro grande cientista me foi apresentado Prof. Dr. **George Barreto** (atualmente coordenador do programa de pós-graduação em Bioquímica em Bogotá na Colômbia) e numa boa parceria produzimos resumos e artigos publicados em conceituadas revistas de neurociência.

Porém não dei continuidade aos planos acadêmicos, pausei a carreira por dois anos enquanto atuava profissionalmente como fisioterapeuta. E então em 2012 cursei como aluno especial o mestrado em Neurociência, sob coordenação do meu ex orientador Prof. Sidarta Ribeiro. E mesmo com tudo dando certo, optei pelo mestrado em Genética na UESB.

Diante de duros acontecimentos durante o mestrado em 2014, enfim encontrei mais dois grandes gênios da ciência o Prof. Dr. **Marcos Bezerra** e o Prof. **Marcelo Eça** que deram um novo rumo a minha vida acadêmica, juntamente com a Prof. Dra. **Kristi Anne Kolmeheir** (Universidade de Copenhague). Eis aqui os mais importantes nomes da minha carreira acadêmica atual, a quem devo muitas coisas boas que aconteceram cientificamente. Uma delas é que voltei me para uma problemática científica a qual darei continuidade por longos anos (A Doença de Parkinson). Trabalhei com essa temática na graduação, no mestrado e também trabalharei no doutorado, e pretendo continuar até que consigamos contribuir para a cura dessa desastrosa Doença.

PPGGGBC

RESUMO

A Doença de Parkinson é um distúrbio degenerativo e progressivo do sistema nervoso central, e sua etiologia não foi totalmente esclarecida. Recentemente os metais ganharam importância etiológica para essa doença e o cabelo tem atraído considerável atenção como um biomarcador de níveis básicos desses elementos no corpo humano. O objetivo desse estudo foi avaliar as concentrações de Ca, Fe e Zn em cabelos de pacientes com Doença de Parkinson e investigar as variações dessas concentrações de acordo com características como sexo, idade, tempo e gravidade da doença. Vinte e seis indivíduos preencheram os critérios de inclusão para este estudo, e foram realizadas entrevistas para investigar o histórico de doença de cada um e comorbidades associadas. E aplicou-se a Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn e Yahr (*Degree of Disability Scale - HY*). Cerca de 0,1 g de cada cabelo coletado foi submetido à decomposição em bloco digestor por 30min à temperatura de 90° e após foram realizadas as quantificações dos metais por FAAS (Espectrometria por Absorção Atômica com Chamas). Os resultados demonstraram uma significativa redução dos níveis das concentrações de Ca e aumento da concentração de Zn nas amostras de cabelo dos pacientes comparados com as amostras coletadas no grupo controle. Uma redução de Fe foi observada, porém não se mostrou estatisticamente significativa. Na comparação dos subgrupos dos pacientes por sexo uma diferença significativa foi encontrada apenas para o elemento Fe, o sexo masculino apresentou concentração menor do que no sexo feminino. As concentrações dos elementos de acordo com os estágios da doença foram observadas que o Ca diminuiu drasticamente e o Zn aumentou, quando comparados o estágio inicial com o estágio mais avançado. Na divisão por subgrupos de tempo de doença, foi notável apenas aumento das concentrações de Zn. Nas comparações por idade, não foram encontradas diferenças significativas nos subgrupos. Há relação entre a Doença de Parkinson, o aumento de Zn, deficiência de Ca e também de Fe (apesar de não ter sido significativa nesse estudo) em cabelo de pacientes com Doença de Parkinson. O avanço do tempo de doença e da gravidade da doença são acompanhados pela variação de Zn e Ca.

Palavras-Chave: Doença de Parkinson, zinco, ferro, cálcio, cabelo, biomarcador

ABSTRACT

Parkinson's disease is a progressive and degenerative disorder of the central nervous system, and its etiology is not fully understood, recently the metals have gained importance in the etiology for this disease and the hair has attracted considerable attention as a biomarker of basic levels of these elements in the human body. The aim of this study was to evaluate the concentrations of Ca, Fe and Zn in hair from patients with Parkinson's disease and investigate the variations of the concentrations according to characteristics such as gender, age, disease duration and others. Twenty-six individuals met the inclusion criteria for this study, and interviews were conducted to investigate the disease history of each one and associated comorbidities; and it was applied the Degree of Disability Scale of Hoehn and Yahr. After, about 0.1 g of each collected hair was submitted to the digestion in digester block for 30 min at a temperature of 90 °C and after it was performed the metals quantification by FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry). The results showed a significant reduction in the levels of Ca concentration and increased Zn concentration in the hair samples, of the patients compared with the control group and a reduction of Fe was observed however it was not statistically significant. Comparing the subgroups of patients by sex, a significant difference was found only for Fe element, males had lower concentration than in females. The concentrations of the elements according to the stages of the disease was observed that Ca decreases drastically and Zn increased when comparing the initial stage to the later stage. In the division by subgroup of time of disease, there was remarkable, only increasing in the Zn concentrations. Comparisons by age, there were no significant differences in the subgroups. There is a relationship between Parkinson's disease, the increase of Zn, Ca deficiency as well as Fe (though not have been significant in this study) in the hair of patients with Parkinson's disease. The progress of the disease duration and severity of disease are accompanied by the variation of Zn and Ca.

Keywords: Parkinson's disease, zinc, iron, calcium, hair, biomarker

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentrações normais de elementos traço e macrominerais em cabelo humano (Fonte: Pozebon *et al.* 1999) 27
- Tabela 2:** Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para determinação de Ca, Fe e Zn nos digeridos das amostras de cabelo. 34
- Tabela 3:** Características gerais dos pacientes com DP investigados, Jequié-BA, Brasil, 2015. 35
- Tabela 4:** Ca, Fe e Zn quantificados ($\mu\text{g/g}$) em cabelo de indivíduos do grupo controle e dos pacientes com Doença de Parkinson. 36

PPGGGBC

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Neuroanatomia dos núcleos da base: região do sistema nervoso associada a Doença de Parkinson. 15
- Figura 2:** Neurônios da substância negra, (A) paciente com Doença de Parkinson, (B) indivíduo controle, sem a Doença de Parkinson. 17
- Figura 03:** Sintomas motores da Doença de Parkinson (tremor, bradicinesia, alterações posturais, dificuldades de marcha). 18
- Figura 04:** Folículo piloso e sistemas associados ao filamento de cabelo 22
- Figura 05:** Fases de desenvolvimento do cabelo (anágena, catágena, telógena) 22
- Figura 06:** Estrutura secundária da queratina do cabelo e ligações químicas entre os aminoácidos. 24
- Figura 07:** Fórmulas estruturais dos aminoácidos 25
- Figura 08:** Corte de cabelo em região occipital e recipiente plástico utilizado para armazenamento das amostras de cabelo coletadas. 31
- Figura 09:** Tubos de vidro e bloco digestor utilizados para digestão das amostras de cabelo. 32
- Figura 10:** Espectrômetro de Absorção Atômica com Chamas - FAAS 33
- Figura 11:** Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por Sexo (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. *($p < 0,05$), ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo. 37
- Figura 12:** Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por grupos de idade em anos (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo. 39
- Figura 13:** Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por estágios da doença (Hohen & Yahr 1967) (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. #E01 vs E05*($p < 0,05$), 41

**($p < 0,01$), ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo.

Figura 14: Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por grupos por tempo de doença em anos (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. *($p < 0,05$), ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo. 43

PPGGGBC

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca – Cálcio

DP – Doença de Parkinson

FAAS - *Flame Atomic Absorption Spectrometry* – Espectrometria de Absorção Atômica na Chama

Fe – Ferro

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HNO₃ – Ácido Nítrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Zn – Zinco

Cr – Cromo

Co – Cobalto

Cu – Cobre

Mn – Manganês

Mo – Molibdênio

Ni – Níquel

Se – Selênio

Sn – Estanho

V – Vanádio

Zn - Zinco

Tl – Tálcio

As – Arsênio

Sb – Antimônio

Bi - Bismuto

Hg – Mercúrio

SN – Substância Negra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A DOENÇA DE PARKINSON.....	15
2.1.1 Considerações gerais da Doença de Parkinson.....	15
2.1.2 Etiologia.....	16
2.1.4 Fisiopatologia, Sinais e Sintomas.....	16
2.1.3 Os metais na etiologia da Doença de Parkinson.....	19
2.2 O CABELO HUMANO.....	20
2.2.1 Considerações Gerais Sobre o Cabelo Humano.....	20
2.2.2 Morfologia e Fases de Desenvolvimento do Cabelo	21
2.2.3 Composição química do Cabelo.....	23
2.2.4 Absorção de Elementos Químicos Pelo Cabelo	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 JUSTIFICATIVA.....	29
5 MÉTODOS.....	30
5.1 Sujeitos da Pesquisa	30
5.2 Coleta e Tratamento das Amostras das Amostras de Cabelos.....	31
5.3 Determinação de Metais nas Amostras de Cabelos.....	32
5.4 Análises estatísticas	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Características gerais dos pacientes	35
6.2 Concentrações dos Elementos nas Amostras de Cabelo.....	36
4 DISCUSSÃO.....	44
5 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio do neurodegenerativo, progressivo, caracterizado pela deterioração do sistema dopaminérgico dos neurônios da substância negra (revisado por Lees *et al.*, 2009). O diagnóstico é realizado pela identificação dos seus sinais e sintomas motores, tais como tremor de repouso, rigidez, dificuldade da marcha, alterações posturais (Friedman & Millman, 2008).

A etiologia dessa doença não é totalmente clara, principalmente devido a diversos fatores genéticos e ambientais que interagem resultando no desenvolvimento dessa doença. A exposição ambiental e ocupacional aos componentes com ações neurotóxicos (metais, pesticidas, herbicidas), alterações dietéticas (alimentos industrializados, açúcar, vitaminas, gorduras animal e etc.) e o envelhecimento atuam conjuntamente aumentando os riscos e a predisposição à doença (Squitti *et al.*, 2002).

Após importantes investigações realizadas a algumas décadas atrás a Doença de Parkinson passou a ser considerada uma “doença ambiental”. A primeira evidencia foi apresentada por Zayed *et al.* (1990) que realizaram um estudo epidemiológico no Canadá em que encontraram uma correlação positiva entre o aumento do risco para Doença de Parkinson e a exposição a três metais: manganês, ferro e alumínio. E Rybick *et al.* (1993) demonstraram que municípios com indústrias de papel, química, ferro, cobre ou categorias relacionadas tiveram significativamente taxas mais elevadas de mortalidade por Doença de Parkinson do que municípios sem essas indústrias. E vários outros estudos tem apresentado outros fatores ambientais como pesticidas, herbicidas, e metais na origem da doença (Hertzman *et al.*, 1994; Alschuler, 1999; Gorell *et al.*, 1999; Le Couteur *et al.*, 1999).

Os metais ligam-se com a alfa-sinucleína (principal proteína relacionada à Doença de Parkinson), provocando alterações que transformam sua estrutura, acelera a agregação e fibrilação que, posteriormente, resultarão em agregados proteicos conhecidos como corpos de Lewys (Uversky *et al.*, 2001) que se acumulam na substancia negra provocando degeneração desse núcleo cerebral. Os avanços das técnicas espectroquímicas vêm contribuindo para compreensão de uma importante hipótese que se refere as variações das concentrações de metais em diversas amostras biológicas de pacientes com Doença de Parkinson. No entanto a maior parte das investigações sobre metais, como fator etiológico dessa doença foram baseadas

em análises de tecidos *post-mortem* de algumas regiões cerebrais desses pacientes (Forte *et al.* 2005).

As análises nos níveis de elementos em outros tecidos e também em fluidos corporais de pessoas vivas tornaram-se alvo de importantes investigações, e assim análises neuroquímicas recentes, de determinação e quantificação desses elementos, apresentaram-se alteradas em amostras biológicas de diversos tecidos e fluídos desses pacientes como líquido cérebro espinhal, sanguíneo, cerebral, e cabelo (Forte *et al.*, 2005; Miyake *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Xiaojun *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2013).

Importante ressaltar que o cabelo recebeu uma considerável atenção como biomarcador de níveis básicos de metais no corpo humano para análises de exposição ocupacional, ambiental em testes farmacológicos com elementos potencialmente nocivos a muitos anos atrás (D'Ilio *et al.*, 2000; Klevay *et al.*, 2004), principalmente pelas vantagens e particularidades que o destaca de outras amostras comumente utilizadas, tais como como sangue, soro, urina. Dentre elas a capacidade de refletir o acúmulo referente a absorção de substâncias pelo corpo humano, esse fenômeno de acumulação visto apenas no cabelo, conduz a uma maior concentração de metais nesse tecido comparados com os fluídos (Senofonte *et al.*, 2000; Forte *et al.*, 2005). A maior parte dos estudos foram focados na caracterização da distribuição de metais no cabelo de indivíduos saudáveis e são escassos os dados relacionados a presença de elementos no cabelo de indivíduos afetados pela Doença de Parkinson (Forte *et al.*, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1 Considerações gerais da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio crônico, degenerativo e progressivo do sistema nervoso central, e tem como característica fisiopatológica a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, levando a redução da quantidade de neurônios produtores de dopamina na via nigroestriatal e dos neurônios contendo neuromelanina no tronco cerebral, sendo mais frequente na camada ventral da parte compacta da substância negra (Gibb, 1992; Kastner *et al.*, 1992)

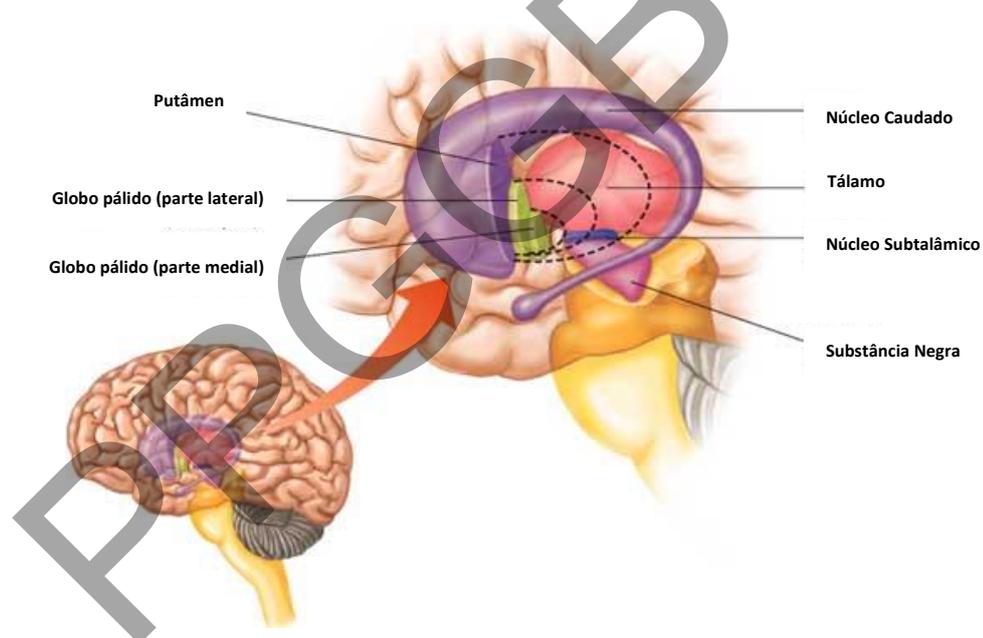


Figura 1: Neuroanatomia dos núcleos da base: região do sistema nervoso associada a Doença de Parkinson. Fonte: <http://cienciasecognicao.org/>

As estimativas da incidência e das taxas de prevalência da DP são difíceis de analisar devido à marcante variação entre os diferentes estudos e populações. Ainda assim pode-se considerar que nos países desenvolvidos, a DP afeta cerca de 0,3% de toda a população, mais que 1% daqueles com mais de 60 anos ou superior a 4% desses com mais de 80 anos (De Lau & Breteler, 2006).

Dados úteis podem ser obtidos em portais epidemiológicos do Governo brasileiro, os quais registram que no país, já que não existem estimativas oficiais para essa doença, mas que a expectativa de vida aumentou pelo crescimento de 21 % da população acima de 65 anos, propiciando estimar-se uma população acima de 200 mil indivíduos com DP (Souza *et al.*, 2011).

2.1.2 Etiologia

A DP é considerada quanto a sua etiologia como idiopática, mas também alguns pesquisadores vêm colocando alguns fatores, como predisposição genética, exposição a toxinas ambientais, exposição ocupacional crônica a metais específicos, estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais, e também alterações advindas do envelhecimento cerebral como desencadeadores da doença (Lewis *et al.*, 2007; Pinheiro, 2006).

Tratando-se de fatores ambientais, pode-se apontar o uso de água de poços contaminadas por substâncias tóxicas, exposição a pesticidas e herbicidas, verificados em maior frequência em zonas rurais, como fatores de risco para desenvolvimento da doença. Outros fatores ambientais são as exposições ocupacionais de longo prazo a produtos químicos industriais, como manganês, mercúrio e solventes (Lewis *et al.*, 2007). O estresse oxidativo advém dos desequilíbrios em mecanismos que geram anormalidades nas mitocôndrias com a formação de radicais livres. Fatores genéticos envolvidos de forma direta na DP, não são evidentes, mas suspeita-se que alguns genes de forma indireta favorecem o desenvolvimento dessa patologia. E as disfunções mitocondriais que por meio de uma cascata de eventos que levam a morte celular programada, por ações decorrentes da combinação de fatores tóxicos e genéticos (Yang *et al.*, 2010; Pereira & Garrett, 2010; Teive, 2005).

A combinação dessas alterações reforça a atual hipótese de uma causa multifatorial para doença, onde a predisposição genética e a exposição a fatores tóxicos ambientais, agem em conjunto com as contribuições do envelhecimento cerebral tais como a perda neuronal progressiva, comum com o avanço da idade (Pereira & Garrett, 2010; Teive, 2005).

2.1.4 Fisiopatologia, Sinais e Sintomas

A investigação fisiopatológica da Doença de Parkinson, de acordo com Teive (2005), Yao e Wood (2009) e Levy *et al.*, (2009) demonstram que essa patologia é neurodegenerativa, progressiva, e observa-se a presença de alterações múltiplas nos sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos).

A despigmentação é a principal alteração identificada em análises morfológicas dos neurônios dopaminérgico e de melanina (figura 2). Ficando evidente nesses estudos que o grau de perda de dopamina está relacionado com branqueamento da substância negra. A despigmentação também está associada a perda da dopamina que é um neurotransmissor produzido pelos neurônios dopaminérgicos da substância negra. Os neurônios dessa região enviam projeções para o estriado, que são núcleos que estão envolvidos no processamento da informação, em outros núcleos que são os gânglios da base. Assim essas alterações que começam na substancia negra, reduzem as projeções para o estriado, provocando déficits no processamento pelos gânglios da base, prejudicando as atividades do córtex motor, que resulta em grandes prejuízos no controle dos movimentos voluntários, caracterizando da Doença de Parkinson (Friedman & Millman, 2008; Teive, 2005).

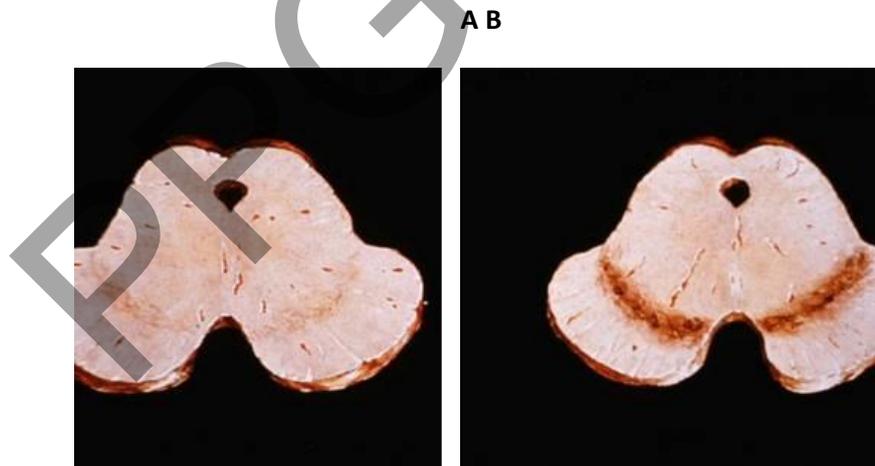


Figura 2: Neurônios da substância negra, (A) paciente com Doença de Parkinson, (B) indivíduo controle, sem a Doença de Parkinson. Fonte: <http://cienciasecognicao.org/>

Outra alteração vista em estudos morfológicos dos núcleos envolvidos na doença, é a presença de corpúsculos formados de agregados de α -sinucleínas, denominados corpos de Lewys, estes corpúsculos são inclusões citoplasmática dos eosinófilos, presentes na substância negra, e que de forma patológica por mecanismos desconhecidos acabam se aglomerando em

grande quantidade. Esses corpúsculos, começam a se desenvolver à medida que a doença progride e os neurônios se degeneram (Teive, 2005; Barnham & Bush, 2008).

São observadas também a degeneração de neurônios de outros núcleos além da substância negra, tais como nos núcleos do pedúnculo-pontino. E a combinação dessa perda neuronal com um aumento da inibição do próprio núcleo do pedúnculo-pontino, desinibe as vias retículo-espinhal e vestibulo-espinhal, produzindo uma contração excessiva dos músculos posturais, caracterizando uma outra alteração motora característica da Doença de Parkinson, as instabilidades posturais (Souza *et al.*, 2011).

Diante do conhecimento quanto a fisiopatologia da DP, e da melhor compreensão quanto as áreas cerebrais acometidas na DP, foi proposto a divisão dos estágios da doença em 6. O núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vago são as regiões onde ocorre inicialmente o comprometimento, e também na área reticular intermediária e do núcleo olfatório anterior, nesse momento apenas o processo neurodegenerativo está concentrado nas projeções dopaminérgicas para o putâmendorso-lateral (Souza *et al.*, 2011).

No segundo estágio existe o comprometimento adicional de outros núcleos como os da rafe, reticular gigantocelular, e do *locus cerúleos*. No terceiro estágio, então observa-se o acometimento da parte compacta da substância negra do mesencéfalo. E já no quarto e quinto estágio observa-se prejuízos em áreas prosencefálicas, mesocórtex temporal, associativas do neocórtex e neocórtex pré-frontal. Por fim, ocorre o comprometimento de áreas córtex pré-motor e área motora primária (Azevedo *et al.*, 2009).

As alterações nos diversos núcleos apresentados acima, trazem como consequência o surgimento dos sinais e sintomas motores da doença, também chamados de sinais cardinais, que são: rigidez, tremor de repouso, bradicinesia e instabilidade postural (Figura 3).

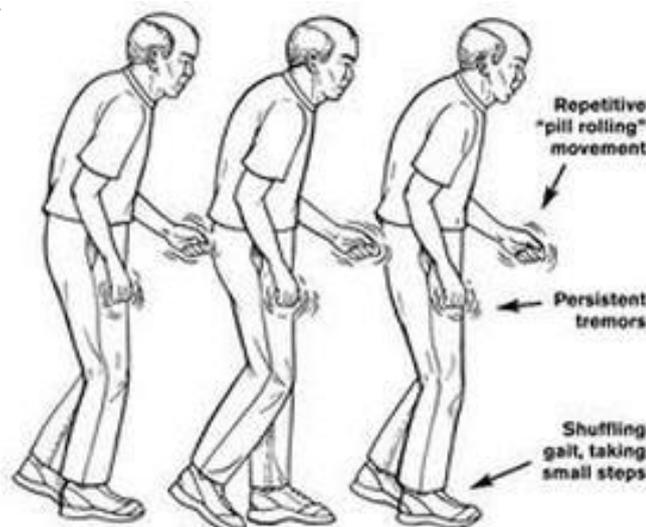


Figura 03: Sintomas motores da Doença de Parkinson (tremor, bradicinesia, alterações posturais, dificuldades de marcha). Fonte: www.neuroclincanatal.com.br

A DP é em sua fisiopatologia caracterizada, por déficits e perdas neuronais não apenas no sistema dopaminérgico, também por perdas e comprometimentos em outros neurônios e projeções monoaminérgicas, como os serotoninérgicos e o noradrenérgicos, envolvendo diversos núcleos neuronais e neurotransmissores, podendo ser considerada uma complexa síndrome clínica, patológica e bioquímica de causa multifatorial por meio da interação de fatores genéticos e ambientais. Assim pode-se considerar a presença frequente dos sintomas não-motores, como déficit cognitivo, alterações psiquiátricas como depressão, e ansiedade, e também os distúrbios do sono (Brito dos Santos *et al.*, 2013). Esses fatores somados as alterações motoras se intensificam com o avanço da doença aumentando assim o grau de incapacidade da doença e diminuindo a qualidade de vida desses pacientes (Yang *et al.*, 2010; Yao & Wood, 2009).

2.1.3 Os metais na etiologia da Doença de Parkinson

A acumulação de metais como Fe, Cu e Mn na substância negra (SN) tem um importante papel na etiologia da Doença de Parkinson, e assim pode-se observar que uma atenção especial é dada a esses estudos desde décadas passadas (Graham, 1984) aos dias atuais. De acordo com Dusek *et al.* (2014) diversos tipos de investigações vem confirmando essa hipótese, tais como: (1) estudos epidemiológicos fornecem informações quanto a relação entre a exposição ambientais e ocupacionais por longo prazo a metais e o risco de desenvolver a Doença de Parkinson (Dick *et al.*, 2007; Zayed *et al.*, 1990); (2) Estudos clínicos observacionais que trouxeram o conhecimento do acumulo de metais em pacientes com diversas alterações cerebrais que geralmente foram observadas alterações na concentração de Fe no cérebro (Dexter *et al.*, 1991; Logroscino *et al.*, 1997) (3) Estudos dos processos bioquímicos e moleculares das concentrações de metais e sua relação com a expressão de enzimas reguladoras de metais por meios de amostras *post-mortem* do Sistema Nervoso Central (4); Estudos com modelos animais que examinaram a relação entre a exposição a altos níveis de metais e investigações que analisaram os efeitos da quelatação como forma de tratamento; (5) Estudos analíticos das concentrações desses componentes e de proteínas reguladoras de metais no Líquido Encéfalo Raquidiano (Zhao *et al.*, 2013).

Os metais Ferro, Zinco, Cálcio e outros são considerados metais essenciais para a homeostase do corpo humano, por participar de muitos processos fisiológicos e também metabólico principalmente no sistema nervoso central (Rivera-Mancía *et al.*, 2010). A redução da concentração desses componentes essenciais no corpo humano é considerada atualmente causa de diversos tipos de doenças incluindo as doenças neurodegenerativas, e também por outro lado, o excesso devido alterações no metabolismo e exposição ambiental e ocupacional a esses elementos, podem também levar a interações anormais com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos resultando por fim em resultar em doenças neurológicas (Barnham & Bush, 2008).

De acordo com Barnham e Bush (2008) as concentrações desses componentes podem variar de acordo com o tipo de amostra biológica utilizada como biomarcador, nos estudos que examinaram em tecido cerebral verificaram que a elevação dos níveis de ferro na substância negra (região associada a doença de Parkinson) é a principal causa do estresse oxidativo nessa região cerebral desencadeando uma cascata de eventos enzimáticos que resultam na morte neuronal desse importante grupo de células produtoras de dopamina, e essa mesma alteração das concentrações desse componente também provocam a formação de corpos de Lewy, principal característica histológica da Doença de Parkinson. O cobre, e também o Zn podem acarretar essas alterações que resultam no estresse oxidativo e morte neuronal (Rivera-Mancía *et al.*, 2010). Essa hipótese é reforçada diante do pressuposto de que a proteína α -sinucleína (principal proteína que compões os corpos de Levy), interagem com os metais que levam a reticulação e acelera a agregação dessa proteína (Barnham & Bush, 2008).

2.2 O CABELO HUMANO

2.2.1 Considerações Gerais Sobre o Cabelo Humano

O interesse pelo uso do cabelo como matriz para análise de elementos químicos e outras substâncias surgiu em 1857 para esclarecer uma ocorrência de envenenamento decorrente, principalmente pela ingestão de arsênio (Gaillard & Pépin, 1997). Atualmente ele é considerado um “dosímetro biológico”, “filamento de registro” ou “espelho do ambiente” tornando-se um dos melhores biomarcadores de contaminação ambiental (Pozebon *et al.*, 1999).

Diversos estudos mostraram que quando há uma considerável exposição a determinados elementos químicos, tanto por contato com ambientes contaminados ou por meio de ingestão,

após determinado tempo essas substâncias se acumulam principalmente no cabelo (Arnold & Sachs, 1994, Bermejo-Barrera & Rossi, 1995, Wilhelm e Müller, 1996), tornando esse tecido ideal para avaliar tanto a exposição atual quanto o histórico de exposições desse indivíduo, por meio da determinação de elementos traço ou macrominerais relevantes a saúde (Arnold & Sachs, 1994).

Esse tecido tem sido preferencialmente escolhido nas investigações das ciências ambientais e da saúde, e por muito mais anos pelas ciências forenses ou criminalísticas. São realizadas não somente a determinação de elementos traço, mas também de compostos orgânicos para as investigações de uso abusivo de drogas (Frazão, 2008). A concentração de elementos traço no cabelo é utilizada nas ciências da saúde para auxiliar no diagnóstico de distúrbios de aprendizagem, emocionais e nutricionais; assim como para avaliar doenças e distúrbios metabólicos (Pozebon *et al.*, 1999).

O cabelo é considerado um importante biomarcador para análise de elementos traço devido a sua capacidade de refletir a concentração dos mesmos elementos no organismo. A partir dessas informações, estratégias de tratamento podem ser elaboradas como recomendações dietéticas e até mesmo intervenções mais diretas como a eliminação dos metais pesados do organismo por meio da quelatação (Passwater & Cranton, 1987). De acordo com Chatt e Katz (1998), no cabelo são encontrados quase todos os elementos estáveis da tabela periódica, exceto nos casos em que ocorra alguma eliminação pelo metabolismo celular. Todos os elementos comuns neste tipo de amostras já podem ser detectados e quantificados por técnicas analíticas atualmente disponíveis.

Os elementos Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, V e Zn são considerados essenciais ao organismo, desde que suas concentrações permaneçam em equilíbrio, quando presentes em excesso essas alterações desencadeiam várias doenças alterando o funcionamento de diferentes órgãos e sistemas e até mesmo a morte o mesmo acontece também quando há a diminuição ou falta desses elementos. Outros como Tl, As, Sb, Bi e Hg são considerados tóxicos, sendo prejudicial à saúde qualquer concentração (Pozebon *et al.*, 1999).

2.2.2 Morfologia e Fases de Desenvolvimento do Cabelo

O cabelo humano apresenta diversas funções tais como: proteção do couro cabeludo dos raios solares contra queimadura e outros efeitos da radiação, protege da abrasão mecânica, é um adereço sexual e também um isolante térmico (Robbins, 2002). A proteção dos raios solares é garantida pela presença da melanina que também é responsável pela sua coloração.

O cabelo consiste em um filamento, com diâmetro que variam entre 15 a 120 μm , dependendo da etnia. Constituído basicamente de queratina que atravessam a epiderme, se formam a partir dos folículos (Figura 4), que são grandes invaginações localizados na derme que contém componentes glandulares e musculares. Na estrutura axial do filamento são observadas duas partes o talo ou haste, parte externa, livre e visível, a outra parte é a raiz ou bulbo, que está localizado internamente na pele (Robbins, 2002).

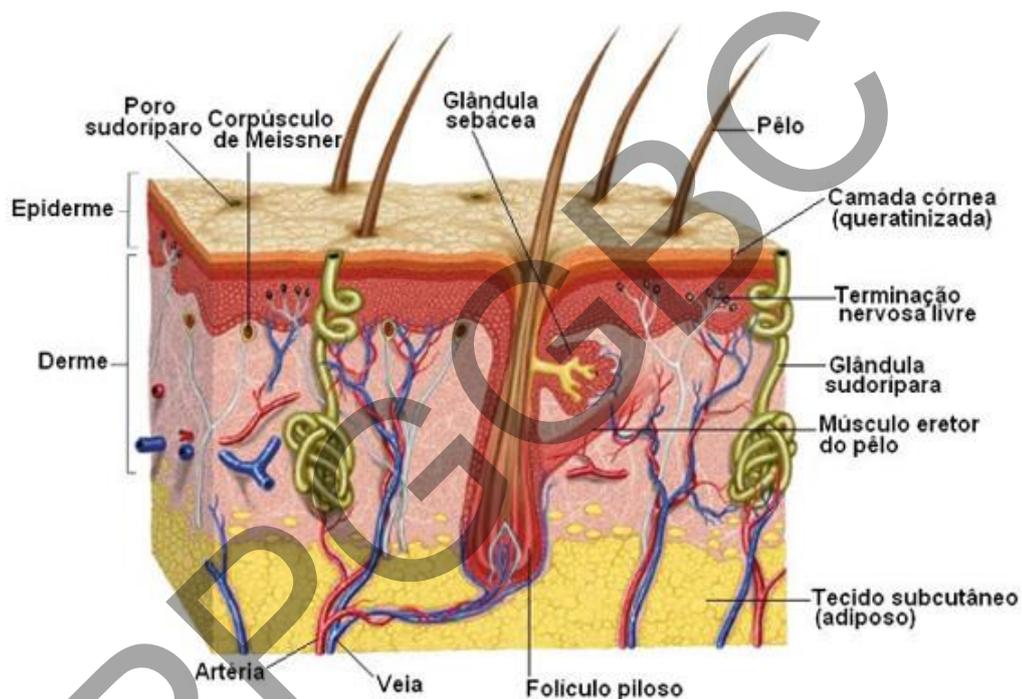


Figura 04: Folículo piloso e sistemas associados ao filamento de cabelo – Fonte: Robbins, 2002.

Morfologicamente o cabelo é dividido em três camadas: (1) a cutícula que está localizada na superfície da fibra, consiste em uma fina cobertura protetora de camadas de células achatadas tipo escamas, sobrepostas; (2) o córtex que é a principal camada, formada por um conjunto de células cilíndricas denominada de matriz, é onde está localizado seu principal constituinte, a queratina e (3) a medula que ocupa a camada interna do folículo e podem não está presente em todos os tipos de cabelo (Chatt & Katz, 1988).

O ciclo de desenvolvimento de cada folículo pode ser dividido em três fases representadas na Figura 5.

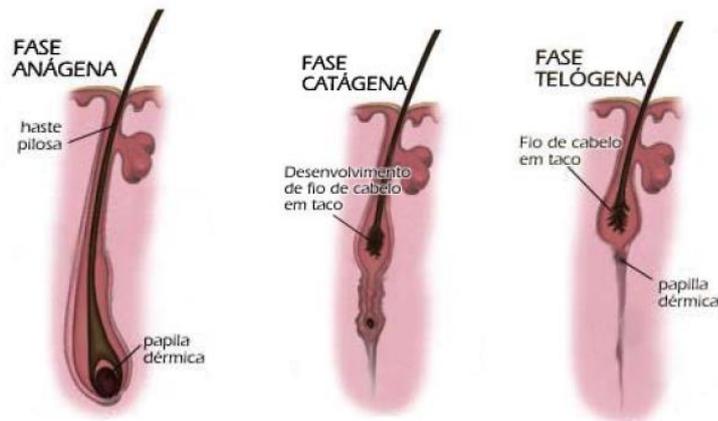


Figura 05: Fases de desenvolvimento do cabelo (anágena, catágena, telógena) – Fonte: Merk, Sharp e Dohme (2008).

Estas fases são descritas abaixo:

1. Anágena: é o estágio de desenvolvimento e crescimento ativo dos filamentos, o folículo é irrigado por vasos sanguíneos, por onde substâncias presentes nos fluidos circulantes chegam ao cabelo e são absorvidas. Evidencia-se que 90% dos filamentos de um indivíduo estão nesse estágio, exceto em casos em que há presença de problemas causados por doenças do couro cabeludo ou contaminação por metais pesados.

2. Catágena: esse é um estágio transitório, com algumas semanas de duração, nesse momento o cabelo para de crescer e a irrigação sanguínea é interrompida determinando assim a morte do filamento. Cerca de 1% dos filamentos de um indivíduo encontram-se nesse estágio. Um outro fator que pode provocar a morte do cabelo é quando há a contaminação com metais pesados tais como Tl, Cd e Hg (Pozebon *et al.*, 1999).

3. Telógena: Nesse estágio há a queda do cabelo que é empurrado por um novo folículo que nasce no mesmo local (Chatt & Katz, 1988).

2.2.3 Composição química do Cabelo

A composição química do cabelo humano consiste de aproximadamente 65-95% de queratina, demais componentes são os lipídios (estruturais e livres), água, pigmentos (melanina) (Robbins, 2002; Harrison & Sinclair, 2004; Bhushan, 2008). E também por elementos considerados macrominerais tais como Ca, Mg, Na, K e Cl, e os elementos traço Fe, Zn, Cu, Mn, I, Cr, Se e Mo (Pozebon *et al.*, 1999).

As queratinas ou proteínas queratinosas consiste em um grupo de proteínas complexas, caracterizadas como fibrosas, altamente estáveis, ricas em ligações de dissulfeto que confere a esse grupo resistência a ação de enzimas e tornando-as também de difícil solubilidade. Essas características são revertidas por meio do rompimento das pontes de dissulfeto por reações de oxidação ou redução como exposto na Figura 06 (Dawber, 1996; Valkovic, 2000; Bhushan, 2008). Os principais aminoácidos que compõem as cadeias peptídicas das proteínas queratinosas do cabelo (Figura 07) são: a cisteína (15,9%), serina (12,2%), ácido glutâmico (12,2%), prolina (8,4%), treonina (7,6%), arginina (6,5%), entre outros (Valkovic, 2000; Bhushan, 2008).

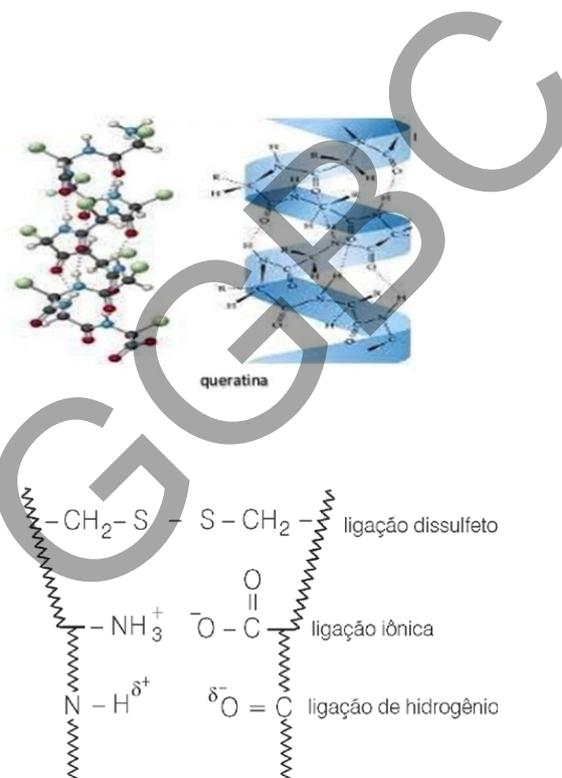
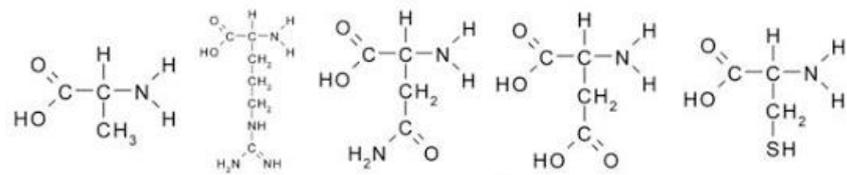


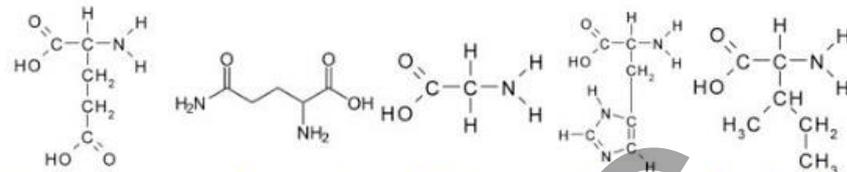
Figura 06: Estrutura secundária da queratina do cabelo – e ligações químicas entre os aminoácidos. Fonte: <http://qnint.s bq.org.br/>.

Essas proteínas estão imersas na matriz do córtex que é composta por células proteicas ricas em tirosina e S, estão presentes também de forma significativa na cutícula (camada mais externa do filamento). A queratina não possui coloração, sendo a presença de melanina no córtex que fornece cor ao cabelo, e é derivada a partir de melanócitos presentes no folículo piloso (Bolduc & Shapiro, 2001).

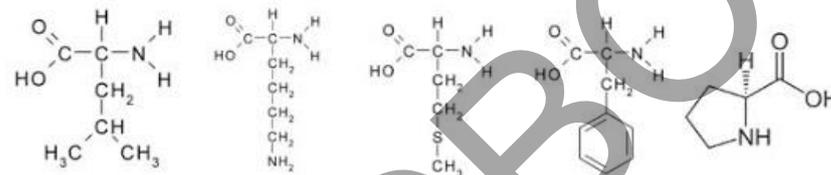
AMINOÁCIDOS



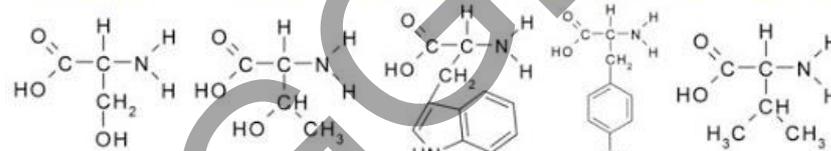
Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cisteina



Ácido glutâmico Glutamina Glicina Histidina Isoleucina



Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Prolina



Serina Treonina Triptofano Tirosina Valina

Figura 07: Fórmulas estruturais dos aminoácidos que compõem as proteínas -
Fonte: <http://qnint.sbg.org.br/>.

A presença de numerosos resíduos de cisteínas (Figura 06) contendo enxofre, conferem as cadeias de queratinas a formação de ligações dissulfeto que são covalentes, cruzadas e fortes entre as cadeias adjacentes. A forma, estabilidade e textura do cabelo são determinadas principalmente por essas ligações. Durante o processo de umidificação do cabelo essas ligações dissulfetos permanecem intactas e por isso a fibra sempre retorna a sua forma original. Porém demais ligações que também interagem com as cadeias polipeptídicas: interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas, podem ser rompidas pela ação da água (Bolduc & Shapiro, 2001; Harrison & Sinclair, 2004; Bhushan, 2008).

2.2.4 Absorção de Elementos Químicos Pelo Cabelo

Elementos traço presentes nos fluidos corporais que estão em constante circulação incorporam-se continuamente ao cabelo durante seu crescimento, dando viabilidade ao registro da variação da concentração de determinado elemento durante os diferentes períodos, que podem ser posteriormente medida. Análises morfofisiológicas e da composição química do cabelo evidenciam que as diferentes regiões podem apresentar diferentes potenciais de distribuição de elementos traços, algumas regiões podem facilitar a uma maior incorporação enquanto outras dificultam (Bencze, 1990).

A absorção endógena dos elementos dá-se a partir da raiz, e são advindos de diversos fluidos corporais como linfa, sangue, líquidos extracelulares, cuja concentração é diretamente proporcional a quantidade que é incorporada no filamento. Em um tempo médio de 30 dias, após a absorção, acontece o equilíbrio do elemento no cabelo. Os mecanismos desse processo não são bem elucidados, mas é aceita a hipótese da incorporação por gradiente de concentração, de forma passiva (Pozebon *et al.*, 1999).

A contaminação exógena do cabelo por elementos advindos de cosméticos, fumaça, poeira, o suor e sebo produzidos por glândulas presentes no couro cabeludo, promovem o arraste de substâncias externas. E também pela água, devido a característica hidrofílica do cabelo. A fixação dos elementos presentes na água acontece na queratina e em alguns casos diretamente à membrana das células. Interações eletrostáticas entre as camadas da cutícula podem reter elementos arrastados pela poeira em quantidades expressivas principalmente quando esta estiver danificada (Pozebon *et al.*, 1999).

A presença de determinado componente nesse tecido é um indicativo de sua absorção e da exposição do indivíduo a esses elementos, porém não determina se a exposição foi exógena ou endógena, já que a queratina que compõe a maior parte do cabelo combina-se tanto com elementos de fontes exógenas e endógenas (Chatt & Katz, 1988, Bencze, 1990)

Tratando-se de valores padrão e faixas de concentração consideradas normais, os estudos demonstraram grandes variações devido a interferência de vários fatores como localização geográfica, sexo, ocupação, idade, hábitos alimentares, uso de medicamentos, todos eles podem alterar de forma significativa a concentrações de elementos no cabelo em dada população. Pozebon *et al.* (1999) apresenta a faixa de valores considerados normais a partir de estudos encontrados na literatura (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações normais de elementos traço e macrominerais em cabelo humano.

Elemento	Concentração, µg/g	Elemento	Concentração, µg/g
Ag	0,16 - 0,70	Mg	1,49 - 567
Al	0,10 - 36	Mn	0,04 - 24
As	0,03 - 25	Mo	0,03 - 2,16
B	0,88 - 0,98	Na	0,02 - 2,02
Ba	0,76 - 1,41	Ni	0,002 - 4,05
Br	2- 35	Pb	0,004 - 95
Ca	0,17 - 4,69 ^a	Pd	< 0,02
Cd	0,04 - 5,3	Pt	≤ 0,05
Cl	0,12 - 14	Rb	0,06 - 5,34
Co	0,07 - 1,7	S	733
Cr	0,08 - 2,50	Sb	0,05 - 0,06
Cs	0,05 - 1	Se	0,002 - 6,6
Cu	6,0 - 293	Sn	0,036 - 8,30
Fe	10 - 900	Sr	1,7 - 860
Ga	1 -250	Ti	0,13 - 12
Hg	0,3 - 12,2	V	0,04 - 160
I	0,03 - 4,2	Zn	53,7 - 327
K	4 - 700	P	88,9 - 773
Li	9 -460 ^b		

a: mg/g; b: ng/g

Fonte: Pozebonet al. (1999)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as concentrações dos metais cálcio, ferro e zinco em cabelos de pacientes com Doença de Parkinson.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar as concentrações de metais em cabelo de pacientes com a doença e compara-las com o grupo controle.
- Verificar o estágio de incapacidade motora dos indivíduos e avaliar se há associação dos estágios de incapacidade e às alterações nas concentrações de metais encontradas no cabelo.
- Analisar a variação das concentrações dos metais estudados de acordo com sexo, idade e tempo de doença.

4 JUSTIFICATIVA

As recentes evidências demonstraram que o estudo das concentrações de metais, além de serem importantes na explicação etiológica da Doença de Parkinson, podem ser úteis como biomarcadores dessa doença, e guiar novos critérios de diagnóstico e tratamento dessa doença.

A utilização do cabelo como biomarcador tem importantes vantagens quando comparadas aos fluidos corporais utilizados em outros estudos (sangue, urina, soro, líquido cefalorraquidiano), primeiro devido a sua particular fisiologia, estrutura e composição química, e assim pode refletir a circulação total de certos elementos no corpo. E segundo devido ao fenômeno de acumulação, a concentração de metais no cabelo é maior do que nos fluidos (Senofonte *et al.*, 2000). A distribuição de elementos no cabelo de indivíduos saudáveis foi extensivamente analisada por diversos outros estudos, porém dados a respeito da presença de metais em cabelo de indivíduos afetados pela Doença de Parkinson é escasso (Forte *et al.*, 2005).

Sendo assim esse estudo justifica-se pela necessidade de maiores esforços para explicação da etiologia da Doença de Parkinson, e desenvolvimento de melhores biomarcadores, que sejam de fácil acesso e que possam ser analisados por meio técnicas simples de alta exatidão. E que contribuam para a elaboração de novas formas de diagnóstico e estratégias de prevenção, sendo que essa doença ainda permanece sem cura, e as terapias ainda são ineficazes.

5 MÉTODOS

5.1 Sujeitos da Pesquisa:

A população deste estudo foi composta de todos os pacientes com Doença de Parkinson cadastrados no Núcleo Regional de Saúde na unidade de Jequié-Ba até o mês de dezembro de 2014. Foram encontrados cadastros de 60 pacientes, dentre eles 26 indivíduos preencheram os critérios de inclusão para este estudo. Adicionalmente, 30 indivíduos também residentes da cidade de Jequié-Ba, de ambos os sexos e com a mesma faixa etária, sem a doença foram convocados aleatoriamente para constituir o grupo controle.

Foram incluídos os indivíduos com diagnóstico confirmado de Doença de Parkinson realizado por um médico neurologista, em uso contínuo ou não de medicamento dopaminérgica, de ambos os sexos e de qualquer faixa etária. E para impedir que variáveis conflitantes interferissem nos resultados de forma direta ou indireta, foram adotados como critério de exclusão de ambos os grupos: tratamento de alguma outra doença orgânica neurogênica ou psiquiátrica, presença de histórico de outras alterações neurológicas além da Doença de Parkinson, histórico neurocirúrgico, distúrbios cardiológicos, respiratórios, renais ou hepáticos, anormalidades de absorção intestinal; infecções ativas; ingestão de hormônios da tireoide ou de lítio, qualquer outro consumo de drogas psicoativas, exceto para medicação antiparkinsoniana, consumo de vitaminas ou suplementos minerais e ou utilização de objetos metálicos no corpo (próteses cirúrgicas).

As abordagens ao paciente foram realizadas em domicílio, e consistiram de entrevistas para investigar o histórico de doença dos indivíduos e comorbidades associadas; aplicação da Escala de Estágios de Incapacidade de Hoehn e Yahr (Hoehn & Yahr 1967) para avaliação do estado geral. No grupo controle foi realizada entrevista para análise do histórico de doença dos indivíduos e comorbidades associadas. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB sob protocolo n. 38942814.1.0000.0055 e todos os pacientes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (CTLE).

5.2 Coleta e Tratamento das Amostras de Cabelos:

As amostras de cabelo foram coletadas especificamente na região suboccipital dos indivíduos a uma distância média de 1 cm do couro cabeludo. O armazenamento foi feito por meio de tubos plástico individuais em ausência de luz e umidade até serem submetidos à lavagem, secagem e cominuição (Figura 7). Recomenda-se que as amostras de cabelo devem ser submetidas à lavagem externa adequada para eliminar contaminações do meio, pois o nível de metais no cabelo poder ser alterado devido a contato com contaminantes externos tais como poeira ambiental, suor, descamação da epiderme, bem como detergentes e cosméticos de tratamento estético. Após a eliminação desse interferentes podemos quantificar apenas os componentes acumulados na estrutura interna do cabelo.



Figura08: Corte de cabelo em região occipital e recipiente plástico utilizado para armazenamento. Fonte: www.uov.com.br e epimed.com.br

Após a coleta, as amostras foram submetidas à etapa de lavagem para a remoção de partículas de poeira, suor, gordura e outros contaminantes, por meio da imersão individual em uma solução de Triton X-100 5% (v/v), com agitação manual por 5 min e enxague três vezes com água deionizada. Logo em seguida, realizou-se a secagem à temperatura ambiente. Após secar, cerca de 0,1 g de cabelo de cada amostra foi então pesado e transferido para tubos de vidro e uma mistura 2:1 de HNO_3 e H_2O_2 (Merck, Alemanha) foi adicionado.

Água deionizada obtida de um sistema de purificação de água (QUIMIS, São Paulo, Brasil) foi utilizada para preparar todas as soluções. Todos os reagentes usados foram de grau analítico. A vidraria utilizada foi mantida em solução de HNO_3 5% v/v durante por no mínimo 24 horas, para descontaminação antes do uso.

A digestão das amostras foi realizada em bloco digestor, e vidros de relógio foram utilizados para manter os tubos devidamente cobertos, a temperatura foi mantida a 90°C, e após digeridas, as amostras foram transferidas para balões volumétricos com volumes completados até 10 ml com água deionizada. Em cada ciclo, uma amostra em branco do reagente foi incluída para avaliar o grau de contaminação pelos metais estudados durante o processo de digestão ácida.

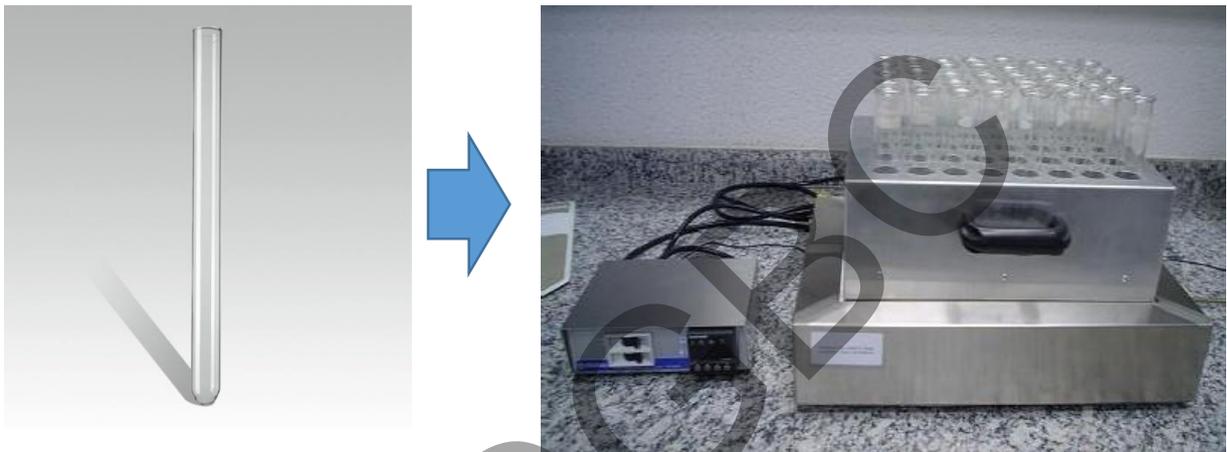


Figura 09: Tubos de vidro e bloco digestor utilizados para digestão das amostras de cabelo.
Fonte: www2.sorocaba.unesp.br

5.3 Determinação de Metais nas Amostras de Cabelos

Os metais estudados foram determinados nos digeridos das amostras de cabelo usando-se um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chamas - FAAS (*Analist 200 - Perkin Elmer*) apresentado na Figura 10.



Figura 10: Espectrômetro de Absorção Atômica com Chamas - FAAS. Fonte: <http://allchemistry.iq.usp.br>

Os parâmetros adotados para o funcionamento do equipamento foram aqueles recomendados pelo fabricante. As condições operacionais do são listados na Tabela 2. O Limite de quantificação (LQ) foi calculado e de acordo com recomendações da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) - matematicamente expresso como dez vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica – após esses valores foram multiplicados pelo volume da solução da amostra (10 mL) e divididos pela massa (0,1g) os valores encontrados foram: Cálcio, 36 ($\mu\text{g/g}$); Ferro, 30 ($\mu\text{g/g}$) e Zinco 32 ($\mu\text{g/g}$).

Tabela 2: Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para determinação de Ca, Fe e Zn nos digeridos das amostras de cabelo.

Parâmetros	Valores de Trabalho		
Altura do queimador (mm)	13,5		
Vazão do fluxo de gás acetileno (L/min)	2,0		
Vazão do fluxo de ar (L/min)	13,5		
Taxa de aspiração da amostra (mL/min)	5,0		
Operação das Lâmpadas de Cátodo Oco			
	Ca	Fe	Zn
Comprimento de onda (λ) nm	422.67	248.33	215.86
Largura da fenda (mm)	0,6	1,35	5,0
Corrente da lâmpada (mA)	20	30	15

5.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA). As variáveis categóricas, sexo, estágio de incapacidade, e idade foram analisadas quanto à distribuição de frequência absoluta e relativa. Para as variáveis quantitativas idade, tempo de doença, e concentração dos metais nas amostras foram apresentados seus valores de média, mediana, e desvio padrão percentuais.

A análise estatística das concentrações dos elementos iniciaram com exclusão dos *outliers* (por abordagem de aproximação em que os valores superiores e inferiores a 1,5 vezes a diferença interquartil foram considerados como valores aberrantes). Após os dados foram analisados quanto à normalidade, verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e em seguida foram tratados por testes estatísticos paramétricos, sem necessidade de outras transformações, todos os testes utilizados foram ANOVA, test t e correlação de Pearson. Os parâmetros só foram considerados significativos quando o valor de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Características gerais dos pacientes

Quanto às características gerais dos pacientes estudados, verificou-se que 69,2% foram do sexo masculino, 46% dos indivíduos possuíam idade entre 60 a 70 anos, e a média de idade foi de $69,8 \pm 14,7$ anos. Quanto a idade de início verifica-se que a maior parte dos indivíduos, ou seja, 65,3%, apresentaram os primeiros sintomas entre 60 e 75 anos, porém destaca-se também um percentual de 27% de indivíduos que apresentaram início precoce da doença. Todos os pacientes utilizavam pelo menos um medicamento antiparkinsoniano (levodopa, pramipexole, amantadina, biperideno). Estas estatísticas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características gerais dos pacientes com DP investigados, Jequié-BA, Brasil, 2015.

Características Gerais		N	Frequência (%)
Sexo (Parkinson – Controle)	Feminino	8 – 14	30,8 – 46,2
	Masculino	18 – 16	69,2 – 53,8
Idade (Parkinson – Controle)	< 60 anos	5 – 12	19,2 – 39,6
	60 a 70 anos	12 – 13	46,2 – 42,9
	> 70 anos	9 – 5	34,6 – 16,5
Idade de Início	Início Precoce (<de 50 anos)	7	27,0
	Início comum (50 a 75 anos)	17	65,3
	Início tardio (>75 anos)	2	7,7
Estágios da Doença (H & Y)	I	6	23,0
	II	2	7,7
	III	9	34,6
	IV	6	23,0
	V	5	19,2

N total = 26, e percentual total 100%

6.2 Concentrações dos metais estudados nas amostras de cabelo

A Tabela 04 apresenta os valores das concentrações dos elementos analisados nos cabelos dos pacientes com Doença de Parkinson (DP) e no grupo controle (GC). Observa-se que a média das concentrações de Ca (Cálcio) e Fe (Ferro) foram mais baixas nos pacientes com DP do que no GC. O inverso é observado na concentração de Zn (Zinco) que apresentou concentrações mais elevadas nos pacientes e menores no grupo controle.

Ao analisar a diferença entre as médias da concentração dos elementos nos GC e dos pacientes com DP verificou-se que a média foi significativamente mais baixa para concentração de Ca nos pacientes ($p = 0,04$) e foi significativamente mais alta para concentração de Zn ($p = 0,003$), e não houve diferença significativa entre as médias de concentração de Fe.

Tabela 4: Ca, Fe e Zn quantificados ($\mu\text{g/g}$) em cabelo de indivíduos do grupo controle e dos pacientes com Doença de Parkinson.

		Ca	Fe	Zn
Grupo Controle	Média	866.92	63.96	438.46
	Desvio Padrão	220.33	39.98	190.34
	Mediana	451.36	49.13	451.56
	P25	329.70	41.83	288.13
	P75	1085.26	67.75	528.04
	Pacientes DP	Média	680.39**	53.59
Desvio Padrão		177.63	17.99	267.03
Mediana		380.13	47.62	604.12
P25		309.50	43.89	472.06
P75		713.52	58.53	694.23

Indicativos dos valores de p (*($p < 0,05$), **($p < 0,01$)) quando pacientes comparados com controle, ANOVA de um critério.

Quando separados por sexo (Figura 11), verificou-se que os pacientes do sexo masculino apresentaram, ligeiramente, uma concentração de Fe em cabelo menor ($47.8 \pm 14.7 \mu\text{g/g}$) que o sexo feminino ($58.8 \pm 14.95 \mu\text{g/g}$). A diferença entre as médias da concentração nesses dois grupos foi considerada significativa para o elemento Fe ($p = 0,02$). As concentrações de Ca também se apresentaram discretamente reduzida no sexo masculino ($488.36 \pm 368.2 \mu\text{g/g}$) em comparação com o sexo feminino ($540.0 \pm 325.9 \mu\text{g/g}$) porém não se mostrou significativa.

Quanto ao Zn houve maior concentração no sexo masculino ($626.4 \pm 243.3 \mu\text{g/g}$) e menor no sexo feminino ($605.9 \pm 327.0 \mu\text{g/g}$) (Figura 11).

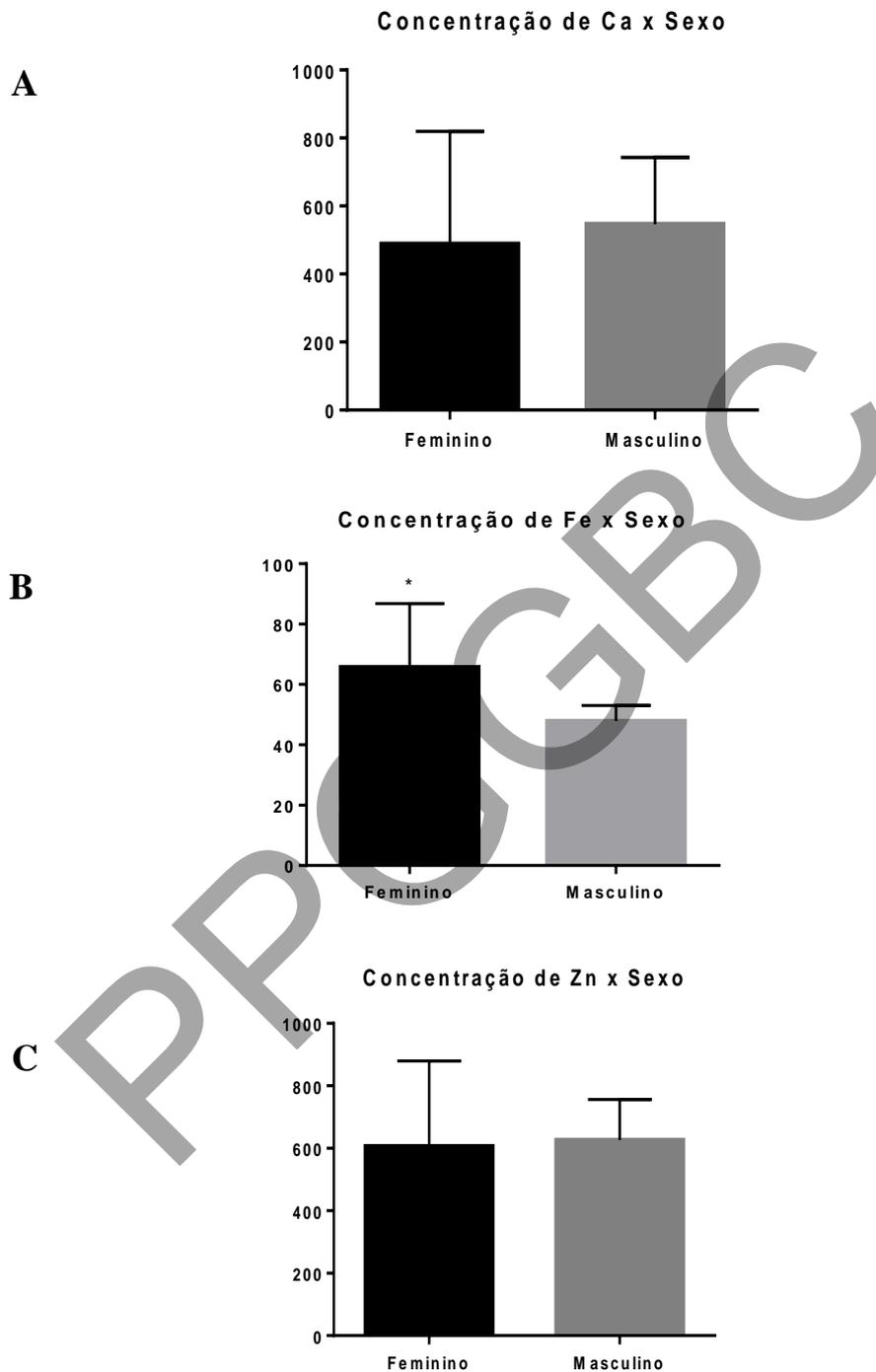


Figura 11: Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por Sexo (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. $*(p < 0,05)$, ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo.

A divisão por subgrupos de idade (< 60 anos, 60 a 70 anos e > 70anos), observadas na Figura 12, apresentou um gradativo aumento das concentrações de Ca com o avanço da idade, em cabelo dos pacientes que apresentavam menos de 60 anos verificou-se uma considerável redução nas concentrações de Ca ($298.92 \pm 104.9 \mu\text{g/g}$) quando comparados com o subgrupo de 60 a 70 anos ($372.12 \pm 189.8\mu\text{g/g}$) acentuando-se mais quando comparados com os indivíduos mais idosos ($612.24 \pm 326.7 \mu\text{g/g}$), porém essas diferenças não foram consideradas significativas.

As médias das concentrações de Zn também apresentaram uma discreta redução com o avanço da idade, os pacientes com menos de 60 anos apresentaram os valores $585.4 \pm 40.3 \mu\text{g/g}$, nos pacientes com menos de 60 anos, $550.8 \pm 106.3 \mu\text{g/g}$ para os pacientes de 60 a 70 anos e $553.5 \pm 239.9 \mu\text{g/g}$ para os pacientes acima de 70 anos. Já para o Fe os valores não foram menores apenas entre os pacientes com menos de 60 anos e os demais grupos, e não foram observadas decréscimo nas médias das concentrações com o avanço da idade. Os resultados quanto as análises das diferenças entre as medias das concentrações de Fe e Zn nos subgrupos por idade, e das correlações entre idade e Zn, idade e Fe não foram significativas.

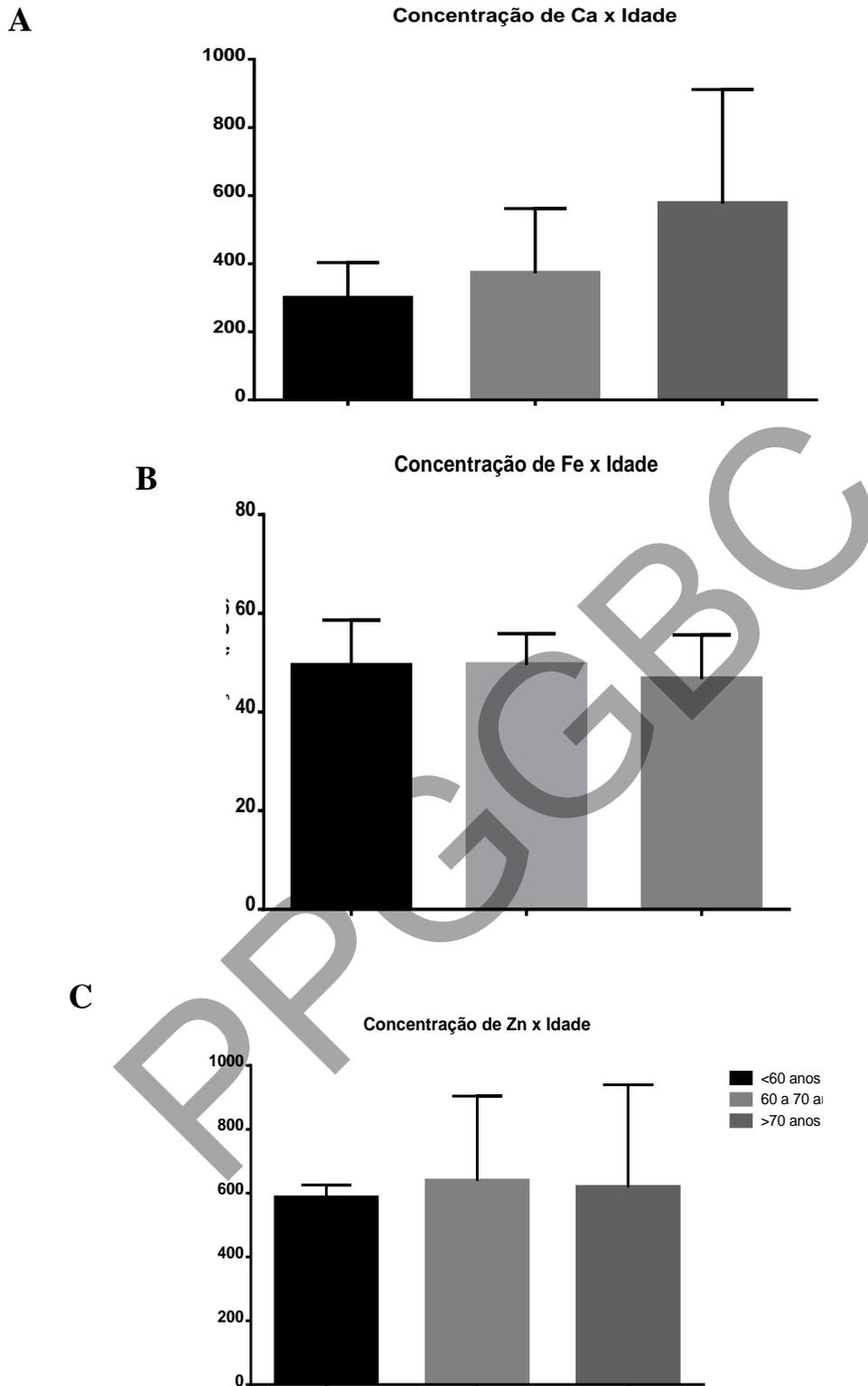


Figura 12: Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por grupos de idade em anos (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo.

Quanto as concentrações dos elementos de acordo com os estágios da doença (Figura 13) verificou-se decréscimo acentuado na média das concentrações de Ca entre os pacientes no estágio inicial (correspondente ao estágio 01) da doença ($593.72 \pm 217.69 \mu\text{g/g}$) e o estágio mais avançado, correspondente ao estágio 05, ($308.47 \pm 138.8 \mu\text{g/g}$), cuja diferença das médias entre esses estágios foi significativa ($p = 0,001$). Foi verificado um acentuado aumento na concentração Zn quando comparado o estágio inicial ($475.38 \pm 187.47 \mu\text{g/g}$) e o estágio mais grave ($906.6 \pm 300.7 \mu\text{g/g}$) com diferença significativa ($p = 0,04$). Quanto ao Fe foi observada uma discreta redução na média da concentração desse elemento com o avanço da doença, a média no estágio inicial foi $56.18 \pm 12.55 \mu\text{g/g}$ e no estágio mais avançado $45.53 \pm 1.90 \mu\text{g/g}$, porém sem significância estatística.

PPGGGBC

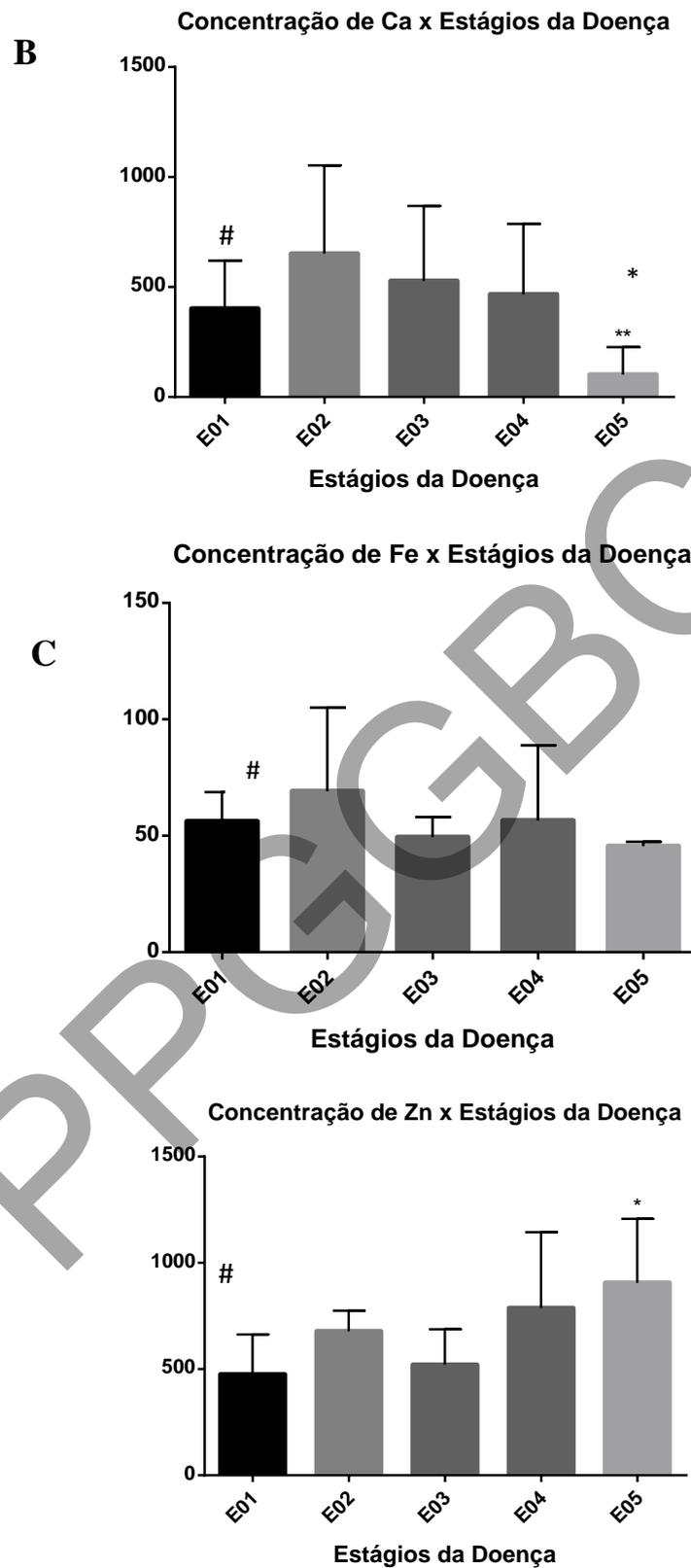


Figura 13: Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por estágios da doença (Hohen e Yahr 1967) (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. #E01 vs E05*($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo.

As médias das concentrações dos elementos também foram analisadas por subgrupos de tempo de duração da doença (<10 anos, de 10 a 20 anos e >20 anos). A média de concentração do Ca foi maior nos pacientes com menos de 10 anos da doença ($665.2 \pm 441.2 \mu\text{g/g}$) do que nos pacientes com tempo de doença entre 10 e 20 anos ($331.8 \pm 86.8 \mu\text{g/g}$) e dos pacientes com mais de 20 anos de doença ($473.4 \pm 181.8 \mu\text{g/g}$). Considerando o elemento Fe a média das concentrações foram menores nos pacientes com menos de 10 anos ($50.3 \pm 12.6 \mu\text{g/g}$), e nos pacientes entre 10 e 20 anos ($46.6 \pm 53.1 \mu\text{g/g}$) e foi maior para os pacientes com mais de 20 anos de doença ($55.1 \pm 7.9 \mu\text{g/g}$). As médias da concentração de Zn aumentaram gradativamente entre os grupos, verificou-se uma média $528.1 \pm 121.2 \mu\text{g/g}$ nos pacientes com menos de 10 anos, $562.3 \pm 175.7 \mu\text{g/g}$ nos pacientes com 10 a 20 anos e $771.8 \pm 109.8 \mu\text{g/g}$ nos pacientes com mais de 20 anos de doença. As diferenças entre as médias foi verificada entre os elementos e os subgrupos por tempo de doença, e foi significativa apenas para o Zn ($p = 0,05$) e não significativa para os demais elementos (Figura 14).

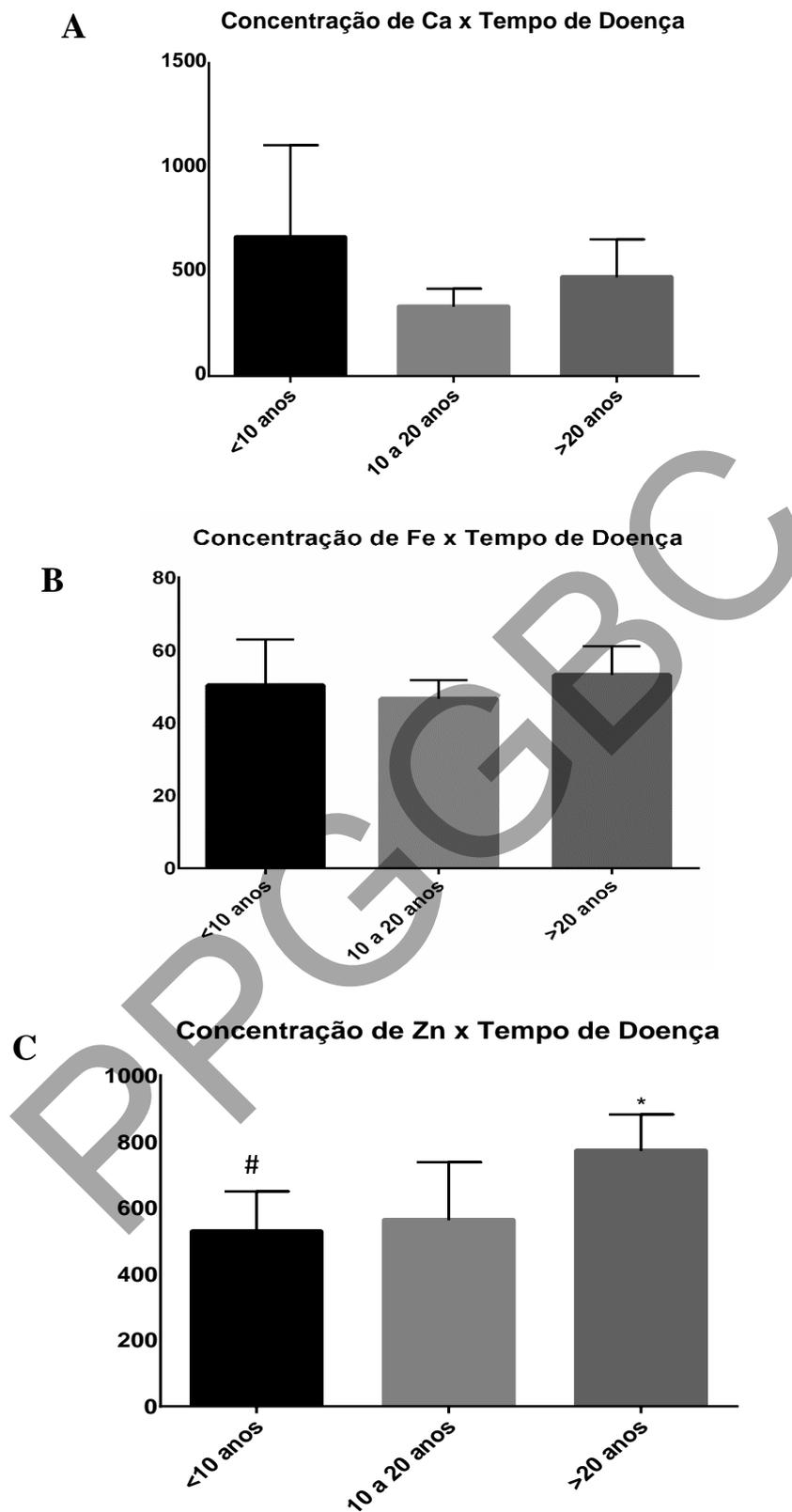


Figura 14: Concentração dos elementos em cabelo subdivididos por grupos por tempo de doença em anos (A) concentração de Ca (B) concentração de Fe (C) Concentração de Zn. *($p < 0,05$), ANOVA de um critério. Fonte: Dados provenientes da análise das amostras de cabelo.

4 DISCUSSÃO

A proposta desse estudo foi avaliar as concentrações de metais em cabelo de pacientes com Doença de Parkinson e investigar as variações dessa concentração de acordo com características como sexo, idade, tempo de doença e gravidade da doença. Os resultados encontrados sugerem que há um decréscimo na concentração de Ca no cabelo de pacientes com DP e há uma notável redução desse metal nos estágios mais graves da doença, assim como foram descritos por Forte *et al.* (2005) que avaliou metais em cabelo de pacientes com Doença de Parkinson e observou decréscimos na concentrações desse elemento e Pande *et al.* (2005) também verificou essa variação, porém utilizando soro sanguíneo como matriz biológica, e esses mesmos autores encontraram menores concentrações de Ca no estágio mais avançado da doença.

O envolvimento do decréscimo do Ca na patogênese e no aumento da gravidade da doença pode ser explicada pela dependência crescente de Ca pelos neurônios da substância negra, com avanço da idade. Os canais de Ca do tipo L necessitam de Ca extracelular para serem mantidos em atividade autônoma essa dependência pode representar um estresse metabólico constante em mitocôndrias, com a produção de radicais livres de Oxigênio, acelerando o envelhecimento celular e morte desses neurônios (Sumeier 2007; Sumeier *et al.*, 2010; Dryanovski *et al.*, 2013).

Quando foram separados por sexo nenhuma mudança significativa foi vista entre os indivíduos estudados. E a discreta redução desse elemento observadas com o avanço da idade e com o tempo de doença, que aqui não tiveram significância, foram inesperados já que o Ca decresce com o avanço da idade (Sumeier, 2007).

Os resultados deste estudo demonstraram uma visível redução das concentrações de Fe quando comparados com o grupo controle, mas apesar de não ter sido significativa a diferença, essa redução do Fe foi observada em outros estudos, em cabelo (Forte *et al.* 2005; Bocca *et al.*, 2006), soro sanguíneo (Logroscino *et al.*, 1997), líquido cérebro espinal (Bocca *et al.*, 2006), pode-se considerar que em uma amostra maior essa diferença poderia ser considerada significativa, nesse estudo. Na análise das diferenças nas concentrações, de acordo com algumas características dos pacientes, verificou-se que no sexo feminino há uma concentração maior de Fe do que no sexo masculino assim como nas investigações de Bocca *et al.* (2006) e Forte *et al.* (2005). Estes resultados sugerem a existência de alterações nos sistemas

que regulam a síntese das principais proteínas responsáveis pelo metabolismo do ferro no corpo, assim como no cérebro de pacientes com Doença de Parkinson, que podem ao longo do tempo, acelerar a entrada de ferro no cérebro e diminuir sua concentração no compartimento extracelular, isso explica o aumento da deposição desse elemento encontrado na substância negra (Dexter *et al.*, 1991; Logroscino *et al.*, 1997; Lotfipour *et al.*, 2012) e conseqüentemente reduzindo sua concentração em outros tecido como o cabelo.

O aumento da concentração de Zn no cabelo foi marcante tanto nesse estudo e quanto em outras investigações que também utilizou cabelo como biomarcador para os metais na Doença de Parkinson (Forte *et al.*, 2005; Bocca *et al.*, 2006). E foi marcante o aumento da concentração desse metal no estágio mais grave da doença e o aumento gradativo com o avanço do tempo de doença. As concentrações de Zn não mudaram quando houveram comparações entre os sexos, ou diferenças por faixa de idade, o inverso foi verificado por Bocca *et al.*, (2006) em cabelo, e Zhao *et al.*, (2013) no plasma sanguíneo.

As alterações nas concentrações de Zn iniciam uma cascata de eventos que são os principais fatores da patogênese da DP (Urvesky *et al.*, 2001; Stelmashook *et al.*, 2014), os distúrbios em seu equilíbrio intracelular podem causar um aumento na produção de radicais livres (Isaiev *et al.*, 2012), e intensificar o processo de agregação e acumulação da alfa-sinucleína (Urvesky *et al.*, 2001). A participação do Zn na crescente produção de radicais livres de oxigênio causa disfunção das mitocôndrias (Leuner *et al.*, 2012; Aizenman *et al.*, 2000). E o estresse oxidativo pode induzir a liberação de zinco a partir de metal-proteínas e, por conseguinte, afetar o equilíbrio da sua concentração no cérebro e ativar vias apoptóticas da morte celular (Aizenman *et al.*, 2000) que resultam finalmente na disfunção e morte dos neurônios da substância negra (Stelmashook *et al.*, 2014; Greenough *et al.*, 2013).

O papel dos metais no envolvimento da etiologia da doença tem se apresentado complexo, e mesmo após extensas investigações, permanecem pouco compreendida as alterações encontradas nas concentrações de macroelementos nas diversas matrizes biológicas analisadas, uma das razões é o número limitado de observações, e as marcantes variações populacionais (Zhao *et al.*, 2013). Ainda assim Pande *et al.* (2005) conseguiram demonstrar, a partir de algoritmos computacionais, que a variação na concentração de metais tem um valor diagnóstico, para Doença de Parkinson. Esses pesquisadores demonstraram as zonas de variação da concentração de metais que levam o indivíduo do estado saldável para a Doença de Parkinson, tomando o soro sanguíneo como parâmetro.

Nesse estudo o perfil dos pacientes quanto a frequência de faixa de idade, sexo, idade de início e estágios da doença são similares com outras investigações que analisaram metais e sua relação com a Doença de Parkinson (Forte *et al.*, 2005; Miyake *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Xiaojun *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2014). Os interferentes foram minimizados com rigorosos critérios de inclusão e exclusão das amostras. E nenhum dos metais analisados apresentavam alta volatilidade, garantindo que houvessem perdas desses elementos devido a temperatura de digestão.

Algumas limitações vistas nesse estudo é que outros metais também analisados como Mn (Manganês), Co (Cobalto), e (Cd) Cádmio em nossas amostras, estavam abaixo do limite de detecção e o número das amostras de cabelos de pacientes com a doença aqui utilizados foi reduzida.

PPGGGBC

CONCLUSÃO

A partir desses resultados esse estudo permite sugerir que há uma relação entre a Doença de Parkinson, o aumento de Zn, deficiência de Ca em cabelo de pacientes com Doença de Parkinson. O avanço do tempo de doença e da gravidade da doença são acompanhados pela variação de Zn e Ca. O avanço da idade não afetam de forma significativa as concentrações dos 3 elementos analisados nesse estudo. Isoladamente apenas no caso do Fe essas concentrações se diferenciam por sexo.

O cabelo pode ser considerado um biomarcador útil para análises de desequilíbrios das concentrações de Fe, Ca e Zn, em DP determinados por meio de uma técnica de alta precisão e de fácil acesso como o FASS. Outros estudos com maiores subgrupos são necessários para melhores esclarecimentos sobre a possibilidade do uso dessa matriz biológica e a inferência eficaz dos desequilíbrios desses elementos para DP e também para sugerir valores de referência, que aumentaria a eficiência do cabelo como biomarcador tanto para Doença de Parkinson quanto para os estágios dessa doença. Essas informações são importantes para a elaboração de estratégias de diagnóstico e prevenção da doença, além da elaboração de novas terapias medicamentosas.

REFERÊNCIAS

- AIZENMAN, E. STOUT, AK. HARTNETT, KA. DINELEY, KE. MCLAUGHLIN, B. 2000. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *Journal Neurochemical*, vol. 75, no. 5, p. 1878-88.
- ALTSCHULER, E. 1999. Aluminum-containing antacids as a cause of idiopathic Parkinson's disease. *Medicine and Hypotheses*, vol. 53, p. 22–23.
- ARNOLD, W.; SACHS, H. 1994. Hair Analysis for Medicaments—The Best Proof for a Drug Career. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, vol. 348, 484.
- AZEVEDO, MM. GALHARDO, MC. AMARAL AKFJ, VIEIRA ACC. 2009. Caracterização dos distúrbios cognitivos na Doença de Parkinson. *Revista Cefac*, vol. 11 p. 251-7.
- BARNHAM KJ & BUSH AI. 2008. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, p. 222–8.
- BENCZE, K. 1990. What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis Part2. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, vol. 338, p. 58-61.
- BERMEJO BARRERA, A. M.; ROSSI, S. S. 1995. Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites *Forensic Science International*, vol. 70, 203-9.
- BOCCA, B. ALIMONTI, A. SENOFONTE, O. PINO, A. VIOLANTE, N. PETRUCCI, F. SANCESARIO, G. FORTE, G. 2006. Metal changes in CSF and peripheral compartments of parkinsonian patients. *Journal of Neurological Science*, vol. 248, p. 23 – 30.
- BOLDUC C, SHAPIRO J. 2001. Hair care products: waving, straightening, conditioning, and coloring, *Clinical Dermatologic*, vol. 19, no 4, p. 431-6.
- CHATT, A.; KATZ, S. A. 1988. Hair analysis - applications in the biomedical and environmental sciences. New York, NY: VCH Publishers, Inc. 88, p. 221.
- D'ILIO, S. VIOLANTE, N. SENOFONTE, O. CAROLI, S. 2000. Occupational exposure of goldsmith workers of the area of Rome to potentially toxic metals as monitored through hair analysis. *Microchemistry Journal*, vol. 67, p. 343–9.
- DAWBER R. 1996. HAIR: Its structure and response to cosmetic preparations, *Clinic Dermatologic*, vol. 14, no 1, p. 105-12.
- DEXTER, DT. CARAYON, A. JAVOY-AGID, F. AGID, Y. WELLS, FR. DANIEL, SE. LEES, AJ. JENNER, P. MARSDEN, C. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*. vol. 114, no. 4, p. 1953-75.

- DICK FD, DE PALMA G, AHMADI A, SCOTT NW, PRESCOTT GJ, BENNETT J, et al. 2007. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occupation and Environmental Medicine*, vol. 64, no 10, p. 666–72.
- DRYANOVSKI, DI. GUZMAN, JN. XIE, Z. GALTERI, DJ. VOLPICELLI-DALEY, LA. LEE, VM. MILLER, R. SCHUMACKER, PT. SURMEIER, DJ. 2013. Calcium entry and α -synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *Journal Neuroscience*, vol. 12, no. 24, p. 10154-64.
- DUSEK, P. ROOSC, PM. LITWINE, T. et al. 2014. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 31, p. 391-99
- FORTE, G. ALIMONTI, A. VIOLANTE, N. DI GREGORIO, M. SENOFONTE, O. PETRUCCI, F. SANCESARIO, G. BOCCA, B. 2005. Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 19, p. 195–201.
- FORTE, G. BOCCA, B. SENOFONTE, O. PETRUCCI, F. BRUSA, L. STANZIONE, P. ZANNINO, S. VIOLANTE, N. ALIMONTI, A. SANCESARIO, G. 2004. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, vol. 111, p. 1031–41.
- FRIEDMAN, JH, MILLMAN, RP. 2008. Sleep Disturbances and Parkinson 's Disease. *CNS Spectrums*, vol. 13, no. 3, p. 12-17.
- FUKUSHIMA, T. TAN, X. LUO, Y. WANG, P. SONG, J. KANDA, H. HAYAKAWA, T. KUMAGAI T. KAKAMU, T. TSUJI, M. HIDAKA, T. MORI, Y. 2014. Heavy Metals In Blood And Urine And Its Relation To Depressive Symptoms In Parkinson's Disease Patients. *Journal of Medicine and Science*, vol. 59, no. 2.
- GAILLARD, Y.; PÉPIN, G. 1997. Screening and identification of drugs in human hair by high performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine. *Journal of Chromatography, A*, vol.762, p. 251-267.
- GIBB, WR. 1992. Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurology Clinical*, vol. 10, no. 2, p. 361-76.
- GORELL, JM. JOHNSON, CC. RYBICKI, BA. PETERSON, EL. KORTSHA, GX, BROWN, GG. RICHARDSON, RJ. 1999. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, vol. 20, p. 239–247
- GREENOUGH, MA. CAMAKARIS, J. BUSH, AI. 2013. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer. *Journal of Neurochemistry International*, vol. 62, n. 540-555
- HERTZMAN, C. WIENS, M. SNOW, B. KELLY, S. CALNE, D. 1994. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. *Movement Disorder*, vol. 9, p. 69-75.

HOEHN, MM. YAHR, MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, vol. 17, no. 5, p.427-42.

ISAEV, NK. LOZIER, ER. NOVIKOVA, SV. SILACHEV, DN. ZOROV, DB. STELMASHOOK, EV. 2012. Glucose starvation stimulates Zn²⁺ toxicity in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Research Bulletin*, vol. 87, p. 80-84.

JIANG H, SONG N, WANG J, REN LY, XIE JX. 2007. Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Journal of Neurochemistry International*, vol. 51, no 1, p. 32–6.

KASTNER, A. HIRSCH, EC. LEJEUNE, O. JAVOY-AGID, F. RASCOL, O. AGID, Y. 1992. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *Journal Neurochemical*, vol. 59, p. 1080–89.

KATZ, S. A.; KATZ R.B. 1992. Use of hair analysis for evaluating mercury intoxication of human body: a review. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 12, p. 79-84.

KLEVAY, ML. BISTRAN, BR. FLEMING, CR. 1987. Hair analysis in clinical and experimental medicine. *American Journal and Clinical Nutrition*, vol. 46, p. 233-9.

LE COUTEUR, DG. MCLEAN, AJ. TAYLOR, MC. WOODHAM, BL. 1999. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 53, p. 122-30.

LEES, AJ. HARDY, J. REVESZ, T. 2009. "Parkinson's disease," *The Lancet*, vol. 373, no. 9680, p. 2055–66.

LEUNER, K. SCHUTT, T. KURZ, C. ECKERT, SH. SCHILLER, C. OCCHIPINTI, A. MAI, S. JENDRACH, M. ECKERT, GP. KRUSE, SE. PALMITER, RD. BRANDT, U. DROSE, S. WITTIG, I. WILLEM, M. HAASS, C. REICHERT, AS. MULLER, WE. 2012. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxidant Redox Signal*, vol. 16, p. 1421-33.

LEVY, AO. MALAGELADA, C. GREENE, LA. 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*, vol. 14, p. 478-500.

LEWIS, P. PROWLAND, MD. 2007. *Merrit tratado de neurologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.768-83.

LOGROSCINO, G. MARDER, K. GRAZIANO, J. FREYER, G. SLAVKOVICH, V. et al. 1997. Altered systemic iron metabolism in Parkinson's disease. *Neurology*, vol. 49, p. 714-17.

LOTFIPOUR, AK. WHARTON S. SCHWARZ, ST. GONTU, V. SCHÄFER, A. et al. 2012. High resolution magnetic susceptibility mapping of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 35, p. 48-55.

MIYAKE, Y. TANAKA, K. FUKUSHIMA, W. SASAKI, S. KIYOHARA, C. TSUBOI, Y. YAMADA, T. OEDA, T. MIKI, T. KAWAMURA, N. SAKAE, N. FUKUYAMA, H. HIROTA, Y. NAGAI, M. 2011. Dietary intake of metals and risk of Parkinson's disease: A case-control study in Japan. *Journal of Neurological Science*, vol. 98, p. 306–102.

- PANDE, SMB. NAGABHUSHANA, P. HEGDE, ML. RAO, TS. JAGANNATHA, KSR. 2005. An algorithmic approach to understand trace elemental homeostasis in serum samples of Parkinson disease. *Computers in Biology and Medicine*, vol. 35, p. 475–493
- PASSWATER, R. A. E CRANTON, E. M. 1983. *Trace Elements, Hair Analysis and Nutrition*, Keats Publishing Inc., New Canaan, CT, USA, p. 171-7
- PEREIRA, D.& GARRETT, C. 2010. Factores de risco da Doença de Parkinson um estudo epidemiológico. *Acta Medica de Portugal*, vol. 23, p. 15-24.
- PINHEIRO JES. *Tratado de geriatria e gerontologia*. 2006. Rio de janeiro: Guanabara, p.355-60.
- POZEBON, D.; DRESSKER, V.L.; CURTIUS, A.J. 1999. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Química Nova*, vol. 122, n. 6, p. 838-46.
- RIVERA-MANCIA, S., PEREZ-NERI, I., RIOS, C., TRISTAN-LOPEZ, L., RIVERAESPINOSA, L., AND MONTES, S. 2010. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 186, p. 184–199
- ROBBINS, C. R. 2002. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 3rd ed. Springer-Verlag, New Iork, p. 454-9.
- RYBICKI, BA. JOHNSON, CC. UMAN, J. GORELL, JM. 1993. Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Movement Disorders*, vol .8, p. 87–92.
- SENAFONTE, N. V.; CAROLI, S. 2000. Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 14, p. 6-13.
- SENOFONTE, O. VIOLANTE, N. CAROLI, S. 2000. Assessment of reference value for elements in human hair of urban schoolboys *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 14, p. 6–13.
- SQUITTI, R. LUPOLI, D. PASQUALETTI, P. DAL FORNO, G. VERZIERI, F. CHIOVENDA, P. ROSSI, L. CORTESI, M. CASSETTA, E. ROSSIGNI, P.M. 2002. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology*, vol. 59, p. 1153–61.
- STELMASHOOK, EV. ISAEV, NK. GENRIKHS, EE. AMELKINA, GA. KHASPEKOV, L G. SKREBITSKY, VG. ILLARIOSHKIN, SN. 2014. Role of Zinc and Copper Ions in the Pathogenetic Mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Biochemistry*, vol. 79, no. 5, p. 391-6
- SURMEIER, DJ. 2007. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, vol. 6, no. 10, p. 933-8.
- SURMEIER, DJ. GUZMAN, JN. SANCHEZ-PADILLA, J. 2010. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium*, vol. 47, no. 2, p. 175-82.

TEIVE HAG. 2005. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. *Revista de Neurociência*, vol. 13, p. 201-14.

UVERSKY, VN. LI, J. FINK, AL. 2001. Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein: A Possible Molecular Link Between Parkinson's Disease and Heavy Metal Exposure. *Journal of Biology and Chemistry*, vol. 276, no. 47, p. 44284-96.

WILHELM, M., MÜLLER, F.; IDEL, H. 1996. Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine. *Toxicology Letters*, vol. 88, no. 3, p. 221-6.

XIAOJUN, Y. TINGTING, D. NING, S. QING, H. et al. 2013. Decreased iron levels in the temporal cortex in postmortem human brains with Parkinson disease. *Neurology*, vol. 80, p. 123-29.

YANG, J. BENYAMIN, B. MCEVOY, BP. GORDON, S. HENDERS, AK. NYHOLT, DR. et al., 2010. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Genetics*, vol. 42, p. 565-9.

YAO, Z. WOOD, NW. 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria. *Antioxidant and Redox Signal*, vol. 11, p. 2135-49.

ZAYED, J. DUCIC, S. CAMPANELLA, G. PANISSET, JC. ANDRE, P. MASSON, H. ROY, M. 1990. Environmental factors in the etiology of Parkinson's disease. *Canadian Journal in Neurological Sciences*, vol. 17, p. 286-91.

ZHAO, H-W. LIN, J. WANG, X-B. CHENG, X. WANG, J-Y. et al. 2013. Assessing Plasma Levels of Selenium, Copper, Iron and Zinc in Patients of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* vol. 8, no. 12, p. 83060-9.

ANEXOS

PPGGGBC

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a), sou Altair Brito dos Santos e estou realizando juntamente com o professor Marcos de Almeida Bezerra, o estudo: Avaliação da Concentração de Metais em Cabelo de Pacientes com Doença de Parkinson. Gostaríamos de convidá-lo para participar dessa pesquisa. Mas antes iremos esclarecer alguns pontos importantes e se o Sr.(a) estiver de acordo poderá assinar no final concordando em participar da pesquisa.

- Esse estudo tem como objetivo avaliar as concentrações de metais presentes no cabelo de pacientes com essa doença, e também compreender se isso tem uma relação com outros problemas como depressão, ansiedade, e problemas com o sono.
- Essa pesquisa é importante para explicar o papel dos metais nessa doença, e em outras alterações pioram ainda mais a qualidade de vida e estado de saúde dos pacientes (depressão, ansiedade, distúrbio do sono). Esse conhecimento é muito importante para os profissionais de diferentes áreas que ajudam a tratar essa doença, porque vai permitir a utilização desses resultados para elaborar melhor o tratamento, e o diagnóstico da doença.
- No início após assinar esse termo nós retiraremos na região da sua nuca, uma pequena quantidade de cabelo (cerca 1 grama) é nesse cabelo que vamos verificar a quantidade de metais presentes. Após nos aplicaremos alguns protocolos, em uma seção com média de 60 min, os protocolos serão para analisar o sono, investigar a presença e o histórico de outras doenças, e a presença de depressão e ansiedade, investigarão a presença de alterações do movimento, e avaliará memória.
- Essa pesquisa poderá oferecer ao Senhor (a) um pequeno desconforto psicológico apenas no sentido de demorar um pouco fazendo a entrevista e aplicando os protocolos, mas você será consultado, no início e durante a seção, sobre esse desconforto durante a aplicação desses protocolos. Se houver algum problema podemos pausar a qualquer momento até que o Senhor (a) autorize o retorno da entrevista.
- Todas as informações aqui coletadas serão confidenciais e tratadas como segredo profissional;
- A sua participação na pesquisa é voluntária e livre de qualquer forma de remuneração, que será confirmada após o Sr.(a) assinar 2 vias deste termo (importante mencionar que todas as páginas devem ser assinadas), sendo que uma ficará com o Sr.(a) e outra com o pesquisador.
- **Consentimento para participação:** Eu estou de acordo com a participação no estudo descrito acima. Eu fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido e os possíveis riscos envolvidos na minha participação. Os pesquisadores me garantiram disponibilizar qualquer esclarecimento adicional que eu venha solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação em qualquer momento, sem que a minha desistência implique em qualquer prejuízo à minha pessoa ou à minha família, sendo garantido

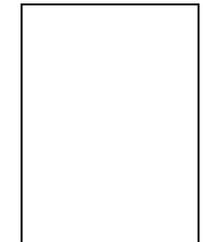
anonimato e o sigilo dos dados referentes a minha identificação, bem como de que a minha participação neste estudo não me trará nenhum benefício econômico.

Eu, _____, aceito livremente participar do estudo intitulado “AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS NA EM CABELO DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON” desenvolvido sob responsabilidade do acadêmico Altair Brito dos Santos, e do Professor Marcos de Almeida Bezerra da Universidade estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Local _____, ____/____/____

Nome do Participante

Nome da pessoa ou responsável legal _____



Polegar direito

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com cada participante do estudo. É minha opinião que cada indivíduo entenda os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a esta pesquisa.

Jequié, Data: __/__/__

Assinatura do Pesquisador

Para maiores informações, pode entrar em contato com:

Endereço:

Comitê de Ética em Pesquisa da UESB – CEP/UESB; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB; CAP - 1º andar; Av. José Moreira Sobrinho, S/N - Bairro: Jequezinho; CEP: 45.206-510; Jequié – Bahia;

Atendimento ao Público: de segunda a sexta, das 8 às 12 e das 14 às 18 h.

Telefone: (73) 3528 9727

Endereços eletrônicos: cepuesb.jq@gmail.com ou cepjq@uesb.edu.br

ESCALA DE ESTADIAMENTO DE HOEHN E YAHR

ESTÁGIO 0	nenhum sinal da doença.
ESTÁGIO 1	doença unilateral.
ESTÁGIO 2	doença bilateral sem comprometer o equilíbrio
ESTÁGIO 3	doença bilateral de leve a moderada, alguma instabilidade postural, fisicamente independente.
ESTÁGIO 4	incapacidade grave, ainda capaz de ficar ereto sem ajuda
ESTÁGIO 5	preso à cadeira de rodas ou leito. Necessita de ajuda.

PPGGGBC