UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JEANE CRISTINA FONSECA VIEIRA

**Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson:
Estudo de validação da *Parkinson Anxiety Scale* (PAS)
e associação com o sistema endocanabinóide**

Ribeirão Preto
2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

JEANE CRISTINA FONSECA VIEIRA

**Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson:
Estudo de validação da *Parkinson Anxiety Scale (PAS)*
e associação com o sistema endocanabinóide**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Vitor Tumas

**Ribeirão Preto
2019**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vieira, Jeane Cristina Fonseca

Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson: Estudo de validação da *Parkinson Anxiety Scale* (PAS) e associação com o sistema endocanabinóide.

Orientador: Tumas, Vitor.

Ribeirão Preto, 2019.

105 f. : il.; 30 cm

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Neurologia do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento. Área de Concentração: Neurologia.

1. Ansiedade. 2. Doença de Parkinson. 3. Endocanabinóide. 4. Validação. 5. Cortisol.

Nome: Vieira, Jeane Cristina Fonseca

Título: Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson: Estudo de validação da *Parkinson Anxiety Scale* (PAS) e associação com o sistema endocanabinóide

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 03/10/2019

Banca examinadora

Prof. Dr. Vitor Tumas (orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Assinatura:_____

Prof. Dr. Henrique Ballalai Ferraz

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Assinatura:_____

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Instituição: Universidade de São Paulo Assinatura:_____

Prof. Dr. Antônio Waldo Zuardi

Instituição: Universidade de São Paulo Assinatura:_____

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo Seu auxílio em toda a minha vida, especialmente ao direcionamento para a área de saúde.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Tumas, pela oportunidade de ser sua orientanda e pelos seus ensinamentos. Agradeço por ter aberto as portas para uma aluna de Curitiba que mal fazia idéia de como era uma rotina ambulatorial e trabalhar com pacientes. Agradeço pela confiança de que em algum momento eu iria me adaptar e traria algum resultado satisfatório. Foi uma honra ser sua doutoranda.

Agradeço a minha família, pelo amor, apoio e incentivo aos meus estudos. Mãe Neusa, pai Walmir, Jefferson, Gláucia e Arthur, obrigada.

Agradeço aos parentes e amigos que também fizeram parte dessa trajetória. Não caberia o nome de todos aqui, mas sou grata pela torcida e pela boa vontade em tentar entender o que eu fazia realmente (neuro o quê?).

In memoriam: Agradeço à minha avó materna Francisca que era portadora da doença de Parkinson e me iniciou no contato com a doença, desde quando eu era criança. Apesar de tudo o que ela sofreu, ela foi uma vencedora. Esse estudo, também é por ela.

Agradeço a equipe do Hospital das Clínicas (FMRP) que me ajudou diretamente ou indiretamente no estudo. Em especial, agradeço à neuropsicóloga Dra Nyanne Bosaipo pelas conversas além da pesquisa, e pela colaboração no estudo. Agradeço à equipe multiprofissional, em especial à enfermeira Angela Pimentel, biomédica Larissa Serveli e terapeuta ocupacional Márcia Motta pelo auxílio na pesquisa e amizade. Agradeço à equipe médica, residentes da neurologia/geriatria/psiquiatria. Em especial, agradeço à Dra. Manuelina Brito pela colaboração na pesquisa e papos sobre Star Wars e afins. Agradeço ao Dr. Carlos Maurício Almeida pela parceria e risadas nervosas de pós-graduandos tentando resolver os problemas nas coletas. Agradeço à psicóloga Camila Pessini, pelas várias avaliações psicológicas e pela amizade.

Agradeço aos profissionais envolvidos nas análises laboratoriais, desde a coleta de amostras biológicas (Unidade de Pesquisa Clínica, enfermeira Elaine e técnicas) até o resultado analítico final. Em especial, agradeço à profa Dra Maria Eugênia Nassur e sua doutoranda Camila Marchioni pela colaboração e atenção. Também agradeço pela disponibilidade de espaço e de uso de equipamentos cedidos pelos laboratórios de Endocrinologia e Imunoclínica (técnica Muriel). Agradeço pela colaboração instantânea e de qualidade com a Dra Itiana Menezes, apesar do pouco tempo juntas.

Agradeço aos discentes das disciplinas da pós que cursei. Obrigada pelo apoio e ensinamentos.

Agradeço à secretaria do departamento de Neurologia, especialmente as funcionárias Vilma Pessini, Luci e Silvana pela ajuda técnica.

Agradeço ao apoio estatístico realizado pelo prof. Cássio no HC e pela amiga estatística da UFPR, Ângela Legey, que mesmo de longe me ajudou a entender melhor esse mundo de testes estatísticos que tanto ama.

Agradeço à CAPES e FAEPA pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos pacientes que participaram do estudo. Agradeço à disponibilidade, paciência e entusiasmo de muitos ao participar da pesquisa. Afinal, eles são a razão do estudo.

“Seca-se a erva, e cai a flor, porém a palavra
de nosso Deus subsiste eternamente.”
Isaías 40:8,

RESUMO

VIEIRA, J. C.F (2019). Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson: Estudo de validação da *Parkinson Anxiety Scale* (PAS) e associação com o sistema endocanabinóide. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

INTRODUÇÃO: Alterações neurobiológicas na doença de Parkinson (DP) têm sido propostas como relacionadas a sintomas não motores. A ocorrência de transtornos de ansiedade acarreta um impacto negativo na qualidade de vida de pacientes e cuidadores. O manejo clínico desses sintomas não motores não é adequado, com dificuldades desde o diagnóstico psiquiátrico. Alterações no sistema endocanabinóide relacionadas à ansiedade podem estar associadas com a DP. Além disso, uma desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) presente na DP poderia influenciar as interações com o sistema endocanabinóide já afetado em uma condição neuropsiquiátrica. **OBJETIVO:** Nesse sentido, investigamos a associação entre transtornos de ansiedade na DP com níveis de endocanabinóides. Além disso, traduzimos e validamos um novo instrumento, a *Parkinson Anxiety Scale* (PAS), para auxiliar na avaliação de transtornos de ansiedade na DP em uma realidade ambulatorial brasileira. **MÉTODO:** Para a validação, optou-se a versão autoaplicável (SR-PAS). Integrou a amostra total do estudo 100 voluntários para a validação da SR-PAS, sendo 40 pacientes selecionados para a dosagem de endocanabinóides e cortisol salivar. Desses 40 pacientes, foram divididos em grupo com ansiedade (n=20) e grupo sem ansiedade (n=20) com idade entre 43 e 73 anos de ambos os sexos. Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de DP idiopática, não demenciados, com Hoehn e Yahr até 3. Os participantes foram avaliados quanto aos sintomas da DP, aspectos cognitivos e sintomas psiquiátricos relacionados ao quadro de transtorno de ansiedade, quando presente. Para a dosagem plasmática de endocanabinóides (anandamida e 2-AG) foram coletadas amostras de sangue matinal em jejum. Na avaliação endócrina duas amostras de cortisol salivar foram analisadas para a avaliação da atividade do eixo HPA. **RESULTADOS:** Na etapa de validação, os resultados indicaram que a SR-PAS demonstrou dados de boa qualidade e alta confiabilidade como evidenciado pelos valores de alfa de Cronbach ($\geq 0,7$). Na etapa referente ao estudo de endocanabinóides, não foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos e não houve associação com transtornos de ansiedade. Entretanto, a maioria dos pacientes apresentou perda da funcionalidade do ritmo circadiano de cortisol. **CONCLUSÃO:** Nossos achados indicam uma aplicabilidade clínica da SR-PAS. Não foi constatada uma relação entre transtornos de ansiedade e endocanabinóides. Sugeriu-se que alterações no ritmo circadiano do eixo HPA podem ter influenciado os níveis plasmáticos de endocanabinóides. Essa disfunção prejudicaria ainda mais a neurobiologia da DP e pode ter dificultado a detecção a nível plasmático de 2-AG e anandamida.

Palavras-chave: Ansiedade. Parkinson. Endocanabinóides. Validação. Cortisol.

ABSTRACT

VIEIRA, J. C.F (2019). Anxiety disorders in Parkinson's disease: Validation study of the Parkinson's Anxiety Scale (PAS) and association with the endocannabinoid system. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BACKGROUND: Neurobiological changes in Parkinson's disease (PD) have been proposed to be related to non-motor symptoms. The occurrence of anxiety disorders has a negative impact on the quality of life of patients and caregivers. The clinical management of these non-motor symptoms is not adequate, with difficulties since the psychiatric diagnosis. Changes in the endocannabinoid system related to anxiety may be associated with PD. In addition, dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis present in PD could influence the interactions with the already affected endocannabinoid system in a neuropsychiatric condition. **AIM:** In this sense, we investigated the association between anxiety disorders in PD with levels of endocannabinoids. In addition, we translated and validated a new instrument (Parkinson Anxiety Scale-PAS) to assist in the evaluation of anxiety disorders in PD in a Brazilian outpatient setting. **METHOD:** For the validation, the self-rated version (SR-PAS) was chosen. The study sample was 100 volunteers for the validation of SR-PAS, with 40 patients selected for the analysis of endocannabinoids and salivary cortisol. Of these 40 patients, they were divided into groups with anxiety (n = 20) and non-anxiety group (n = 20), aged between 43 and 73 years old of both sexes. Patients with diagnosed idiopathic PD, with no dementia and Hoehn and Yahr up to 3 were included. Participants were assessed for PD symptoms, cognitive aspects, and psychiatric symptoms related to anxiety disorder when present. For the plasma quantification of endocannabinoids (anandamide and 2-AG) fasting morning blood samples were collected. In the endocrine evaluation two salivary cortisol samples were analyzed for HPA axis activity evaluation. **RESULTS:** In the validation step, the results indicated that SR-PAS demonstrated data of good quality and high reliability as evidenced by Cronbach's alpha values (≥ 0.7). Related to study of endocannabinoids, no difference was found between the groups and no association with anxiety disorders. However, most patients have loss of functionality of the circadian rhythm of cortisol. **CONCLUSIONS:** Our results demonstrated a clinical use of SR-PAS. No relationship was found between anxiety disorders and endocannabinoids. It has been suggested that changes in the circadian rhythm of the HPA axis may have influenced the plasmatic endocannabinoids. This dysfunction would further impair PD neurobiology and may have made it difficult to detect plasma levels of 2-AG and anandamide.

Keywords: Anxiety. Parkinson. Endocannabinoids. Validation. Cortisol.

SIGLAS E ABREVIATÖES UTILIZADAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
AA	Ácido araquidônico
AEA	Anandamida
AUC	Área Sob a Curva
BAI	Inventário de Ansiedade de Beck
BDI-II	Inventário de Depressão de Beck – versão II
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CCI	Coeficiente de correlação intraclasse
CID-10	Classificação Internacional de Doenças
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
D1	Receptor de dopamina D1
D2	Receptor de dopamina D2
DP	Doença de Parkinson
d.p.	Desvio padrão
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
eCB (s)	Endocanabinóide (s)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EXP	Extrapiramidal
EQ VAS	Escala Análogo Visual do <i>Euro Quality of Life Instrument – 5D</i> ;
FAAH	Enzima amida hidrolase de ácidos graxos
HADS	Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão
HARS	Escala Hamilton de Classificação de Ansiedade
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HY	Hoehn e Yahr
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corporal
IL-1 β	Interleucina – 1 beta
IL-6	Interleucina – 6
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LED	Dose diária equivalente de L-Dopa
MAGL	Enzima lipase monoacilglicerol
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MDS	Movement Disorder Society
MINI-Plus	Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
mg	Miligramas
mL	Mililitros
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa b
ng	Nanograma
NSB	<i>Non-Specific Binding</i>
PAG	Substância cinzenta periaquedutal

PAS	<i>Parkinson Anxiety Scale</i>
PAS-A	<i>Parkinson Anxiety Scale</i> , subescala de ansiedade persistente
PAS-B	<i>Parkinson Anxiety Scale</i> , subescala de ansiedade episódica
PAS-C	<i>Parkinson Anxiety Scale</i> , subescala de comportamentos de evitação
PDQ-8	Questionário de Qualidade de Vida na doença de Parkinson - 8
PG	Prostaglandina
PG-G	Prostaglandina glicerol éster
PPAR γ	Peroxissoma Gama
RC	Ritmo Circadiano da Secreção de Cortisol Salivar
RCr%	Redução Relativa das Concentrações de Cortisol Salivar na Avaliação do Ritmo Circadiano
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SPIN	Inventário de Fobia Social
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
SR141716A	Antagonista do receptor CB1 (ou Rimonabant)
SR-PAS	<i>Self –rated Parkinson Anxiety Scale</i>
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizado
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1
UPDRS	Escala Unificada de Avaliação da doença de Parkinson
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

n	Número de Sujeitos na Amostra
p	Valor de Significância Estatística
ρ	Coeficiente de correlação de Spearman (ρ)

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Fluxograma geral do estudo.	36
Figura 4.1 - Curva ROC para diferentes notas de corte da SR-PAS versão brasileira – escore total	52
Figura 4.2. - Curva ROC para diferentes notas de corte da SR-PAS versão brasileira – escore das subescalas	53
Figura 4.3 - Gráfico boxplot, mostrando a comparação entre os níveis plasmáticos de AEA e 2-AG entre grupos com (n=20) e sem ansiedade (n=20) de pacientes com doença de Parkinson.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Características demográficas, sociais, e clínicas da amostra de 100 pacientes com doença de Parkinson.	46
Tabela 4.2 - Frequência da classificação de transtornos de ansiedade, segundo a MINI, presentes na amostra diagnosticada (n=56).	47
Tabela 4.3 – Resultados dos questionários de ansiedade e depressão aplicados aos 100 pacientes com doença de Parkinson.	48
Tabela 4.4 - Média, desvio padrão (DP) de cada item e correlação item total da escala SR- PAS versão brasileira (n=100).	50
Tabela 4.5 – Valores de curvas ROC da SR-PAS e subescalas (transtornos de ansiedade específicos).	55
Tabela 4.6 - Características demográficas, sociais, e clínicas da amostra de pacientes com DP (n=40) divididos em grupo com e sem ansiedade.	57
Tabela 4.7 – Frequência da classificação de transtornos de ansiedade, segundo a MINI, presentes na amostra diagnosticada com ansiedade (n=20).	59
Tabela 4.8 – Resultados dos questionários de ansiedade e depressão e histórico de ansiedade e depressão de pacientes com doença de Parkinson.	60
Tabela 4.9 - Níveis basais de cortisol salivar de pacientes com doença de Parkinson com e sem ansiedade.	63
Tabela 4.10 - Medidas referentes ao Ritmo Circadiano (RC) em pacientes com doença de Parkinson com e sem ansiedade.	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1.1 Doença de Parkinson: aspectos gerais e sintomas não motores.....	18
1.1.2 Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson	19
1.1.3. O sistema endocanabinóide na doença de Parkinson	22
1.1.3.1 O sistema endocanabinóide: visão geral.....	22
1.1.3.2 Alterações do sistema endocanabinóide na doença de Parkinson	23
1.1.4 Endocanabinóides nos transtornos de ansiedade.....	26
1.1.5 Ansiedade, endocanabinóides e o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal	27
1.1.6 Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal na doença de Parkinson.....	31
1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES DO ESTUDO.....	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVOS GERAIS	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3.1 AMOSTRA	35
3.1.1 Critérios de inclusão.....	35
3.1.2 Critérios de exclusão.....	36
3.2 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS	36
3.2.1 Tradução e adaptação cultural da PAS.....	37
3.2.2 Validação da SR-PAS	38
3.2.3 Avaliação clínica.....	39
3.2.4 Estudo de endocanabinóides e cortisol.....	40
3.2.5 Análises laboratoriais	41
3.2.5.1 Quantificação de endocanabinóides	41

3.2.5.2 Quantificação de cortisol salivar.....	42
3.2.6 Avaliação endocrinológica.....	42
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
3.3.1 Validação da SR- PAS	43
3.3.2 Estudo de endocanabinóides e cortisol.....	44
4 RESULTADOS.....	46
4.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO DA VERSÃO EM PORTUGUÊS BRASILEIRO DA <i>PARKINSON ANXIETY SCALE</i> AUTOAPLICÁVEL (SR-PAS).....	46
4.1.1 Tradução transcultural.....	46
4.1.2 Características sociodemográficas e clínicas da amostra geral	46
4.1.3 Propriedades psicométricas da PAS autoaplicável (SR-PAS)	50
4.1.3.1 Estabilidade e confiabilidade.....	50
4.1.3.1.1 Estabilidade temporal da SR- PAS (“teste-reteste”).....	50
4.1.3.1.2 Homogeneidade dos componentes da SR-PAS (consistência interna).....	50
4.1.3.2 Validade da SR-PAS.....	51
4.1.3.2.1 Aceitabilidade e distribuição.....	51
4.1.3.2.2 Curva ROC e escolha do ponto de corte.....	52
4.1.3.2.3 Validade convergente.....	54
4.1.3.2.4 Validade divergente.....	55
4.1.3.3 Prevalência e correlações clínicas de sintomas de ansiedade	56
4.2 ETAPA II: ASSOCIAÇÃO ENTRE TRANSTORNOS DE ANSIEDADE NA DOENÇA DE PARKINSON COM ENDOCANABINÓIDES E CORTISOL SALIVAR.....	57
4.2.1 Caracterização da amostra de conveniência	57
4.2.2 Análise dos níveis de endocanabinóides em pacientes com DP com e sem ansiedade.....	61

4.2.3. Análise de potenciais correlações entre os níveis de endocanabinóides e a gravidade dos sintomas de ansiedade nos pacientes com DP	62
4.2.5 Análise qualitativa do ritmo circadiano (RC) nos pacientes com DP	63
5.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO DA VERSÃO EM PORTUGUÊS BRASILEIRO DA <i>PARKINSON ANXIETY SCALE</i> AUTOAPLICÁVEL (SR-PAS).....	64
5.2 ETAPA II: ASSOCIAÇÃO ENTRE TRANSTORNOS DE ANSIEDADE NA DOENÇA DE PARKINSON COM ENDOCANABINÓIDES E CORTISOL SALIVAR.....	69
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS	93
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	93
ANEXO B - Autorização do autor da PAS original, Leentjens (Universidade de Maastricht).....	98
ANEXO C – Escala <i>Parkinson Anxiety Scale</i> versão brasileira.....	100
ANEXO D – Instruções para coleta de saliva e folha de registro	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Doença de Parkinson: aspectos gerais e sintomas não motores

O Brasil é um dos países em que apresenta uma transição demográfica significativamente rápida na qual há um aumento exponencial no número de cidadãos idosos. A prevalência de doenças que acometem principalmente pessoas acima dos 65 anos de idade está aumentando e já é um fator negativo na atenção à saúde do idoso (Bovolenta e Felício, 2017). Uma dessas doenças crônicas é a doença de Parkinson, classificada como o segundo transtorno neurodegenerativo mais comum em todo o mundo. A prevalência dessa doença mostrou-se aumentar com o avanço da idade (Nussbaum e Ellis, 2003; Lau e Breteler, 2006; Kempster et al., 2010).

A fisiopatologia da doença de Parkinson (DP) envolve a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigrostriatais e a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo paralelamente à degeneração concomitante dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (Braak et al., 2004; Kish et al. 2008; Halliday, 2012). O progresso da DP evoluiria de estágios pré-sintomáticos até a disseminação de inclusões proteicas (principalmente de α -sinucleína) pelo neocórtex e componentes dos sistemas autonômico, límbico e somatomotor (Braak et al., 2004). Embora a DP seja conhecida por ser um distúrbio motor e apresente principalmente sintomas motores, como bradicinesia, rigidez, tremor e distúrbio da marcha, foi descrita a presença de sintomas não motores, como distúrbios do sono e transtornos psiquiátricos (Storch et al., 2013; Schapira et al., 2017). Dentre esses sintomas, o transtorno comportamental do sono *Rapid Eye Movement* (TCSREM) (Iranzo et al., 2006; de Almeida et al., 2018) e a disfunção olfativa (Boesveldt et al., 2008; Fullard et al., 2017) podem preceder sintomas motores e muitas vezes antecede o diagnóstico por anos (Braak et al., 2004). Além disso, as alterações neurobiológicas da DP têm sido propostas como relacionadas a transtornos de depressão e ansiedade e ocorrem antes do mesmo do início de sintomas motores DP e durante sua fase motora (Kano et al., 2011; Dissanayaka et al.,

2014).A existência de sintomas não motores na DP é considerada um fator importante na redução da qualidade de vida dos pacientes e também um impacto negativo na vida das famílias e dos cuidadores (Storch et al., 2013; Schapira et al., 2017). Apesar das pesquisas dedicadas à sintomatologia não motora da DP terem sido publicadas, ainda é necessário um melhor diagnóstico e manejo dos transtornos de ansiedade entre os indivíduos com DP (Prediger et al., 2012; Broen et al., 2018).

1.1.2 Transtornos de ansiedade na doença de Parkinson

Transtornos de ansiedade e depressão foram incluídos entre os sintomas não motores, e sua coexistência frequentemente ocorre (Pachana et al., 2013). Estudos recentes indicam que a prevalência de transtornos de ansiedade na DP varia de 12,8% a 43,0% e o ponto médio demonstrado em uma revisão sistemática em torno de 31% mostrou-se superior à média de depressão (17%) (Reijnders et al., 2008; Broen et al., 2016). Alguns tipos de transtornos de ansiedade são mais comuns em pacientes com DP, entretanto, cerca de um terço dos pacientes tem dois ou mais transtornos de ansiedade comórbidos. Além disso, até 13% dos pacientes com DP têm distúrbios que não preenchem os critérios para qualquer perturbação de ansiedade específica e são classificadas como transtorno ansioso não especificado (Broen et al., 2016; Broen et al., 2018). O transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizado (TAG) e fobia social são os transtornos de ansiedade mais comuns relatados (Lauterbach et al., 2003; Bolluk et al., 2010; Dissanayaka et al., 2010; Leentjens et al., 2011a).

Dificuldades no diagnóstico de transtornos de ansiedade e depressão são encontradas na população em geral, como uma limitação de que apenas diagnósticos listados no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais em sua 5ª edição (DSM-IV) podem ser feitos quando esse método diagnóstico é usado. Assim, não há inclusão de categorias para “transtorno de ansiedade não especificado” ou estados de ansiedade subsindrômicos (Leentjens et al. 2014). Porém, o desafio é maior na população com a doença de Parkinson. Manuais (como o DSM-IV e a Classificação Internacional de

Doenças (CID-10)) e escalas padrões para avaliação de ansiedade e depressão apresentam critérios não tão adequados como a sobreposição a sintomas motores característicos da DP (Leentjens et al., 2011; Starkstein et al., 2014; Broen et al., 2016). Isso requer uma distinção do que é característico da DP e em qual condição o paciente se encontra, devido a variações em períodos *on-off*, da heterogeneidade e comorbidades da doença. Além disso, as influências do pesquisador e/ou paciente ao responder os questionários podem interferir na confiabilidade do uso de tais escalas. Dessa forma, se os sintomas não se referem tão especificamente à ansiedade, essa interferência pode ser agravada e dificultar a avaliação (Dissanayaka et al., 2010, 2014; Prediger et al., 2012; Storch et al., 2013).

Atualmente no contexto da doença de Parkinson, as escalas de gravidade de sintomas de ansiedade frequentemente usadas são: Escala de Classificação de Ansiedade de Hamilton (HARS) (Hamilton, 1959), Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) (Beck, 1988) e Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HADS) (Zigmond e Snaith, 1983) (Leentjens et al., 2008; Dissanayaka et al., 2014). Leentjens e colaboradores (2011b) indicaram que a validade preditiva negativa das escalas HARS, BAI e HADS revelou-se moderada e a validade positiva mostrou-se fraca. Primeiramente, a Escala de Classificação de Ansiedade de Hamilton possui como foco os sintomas do TAG que apesar de apresentar pontos positivos ao detectar sintomas psíquicos e somáticos desse transtorno, complica-se ao ser aplicada na DP. Pacientes com TAG também pontuaram mais do que os pacientes sem este transtorno de ansiedade em ambas subescalas, o que sugere que a ansiedade em DP poderia não ser somente uma característica somática (Kummer et al., 2010). Já o autoquestionário BAI (Beck, 1988; Cunha, 2001), tem como objetivo principal a avaliação de sintomas de Pânico, ansiedade esporádica. Assim, sintomas de ansiedade não esporádica não são adequadamente detectados, com a diminuição na pontuação dessa escala (Leentjens et al., 2011b). A influência de outras escalas utilizadas para a avaliação de depressão como o Inventário de Depressão de Beck (BDI) (Beck et al., 1961) foi observada nos itens de BAI assim como na pontuação final. Isso demonstra a dificuldade de avaliar fatores relacionados a ansiedade e depressão

separadamente. Deve-se levar em consideração que em uma percentagem variável de parkinsonianos (19 a 40%) os sintomas de depressão e ansiedade coexistem (Nutti et al., 2004; Yamanishi et al., 2013). Também foram observadas as influências de gênero e idade do paciente, ao serem obtidos pontos mais elevados na escala aplicada a mulheres jovens (Rutten et al., 2014).

Além dessas escalas e visando a melhoria do diagnóstico de ansiedade, a *Movement Disorder Society* (MDS) indicou uma nova escala formulada: a *Parkinson Anxiety Scale* (PAS). A PAS (Leentjens et al., 2014) consiste de 3 subescalas: Ansiedade persistente (PAS-A), ansiedade episódica (PAS-B) e comportamento de evitação (PAS-C). O poder discriminatório das dimensões de ansiedade persistente e esporádica da PAS mostrou-se melhor do que o encontrado em HARS, BAI e HADS, além de demonstrar de moderada a alta sensibilidade e especificidade (Forjaz et al., 2014; Leentjens et al., 2014).

Apesar de apresentar limitações, a PAS apresentou-se como um bom instrumento auxiliar quando aplicada por um profissional da saúde ou em sua forma de autoquestionário. O desenvolvimento de escalas como a PAS, ao propor a ampliação de aplicabilidade aos transtornos de ansiedade variados com parâmetros adequados é uma estratégia primordial para o avanço da pesquisa clínica nessa área. Porém, ainda é necessário uma compreensão mais aprofundada com respeito aos aspectos neurofarmacológicos desses transtornos de ansiedade em DP.

Embora as medicações dopaminérgicas sejam amplamente usadas no tratamento da DP, ainda há necessidades clínicas não satisfeitas, incluindo falta de medicamentos adequados para tratar sintomas não motores. Antidepressivos, ansiolíticos, sedativos e antipsicóticos usados no tratamento desses sintomas não motores possuem eficácia limitada e induzem reações adversas (WHO, 2006). Assim, dos pacientes que recebem farmacoterapia, 83% ainda vivenciaram um transtorno de ansiedade (Broen et al., 2018). Além disso, sob tratamento a longo termo, a eficácia da L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa, precursor de dopamina) flutua e pode causar sérios efeitos colaterais (Shimizu e Ohno, 2013). Há evidência de que pode haver uma associação de alterações neuroquímicas na DP com ansiedade, embora alguns autores

propuseram que o tratamento com medicamentos antiparkinsonianos poderia induzir ou complicar esta ansiedade (Vázquez et al., 1993; Richard et al., 1996; Walsh e Bennett, 2001). Assim, a melhor compreensão de sistemas neurobiológicos envolvidos nesses sintomas não motores e a possibilidade de novos alvos farmacológicos relevantes seriam essenciais para o avanço no manejo clínico.

1.1.3. O sistema endocanabinóide na doença de Parkinson

1.1.3.1 O sistema endocanabinóide: visão geral

O sistema endocanabinóide é composto de moléculas sinalizadoras lipídicas conhecidas como endocanabinóides, as enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação, e os receptores metabotrópicos, ionotrópicos e nucleares ativados por esses ligantes. Possui ações como sistema neuromodulatório, agindo não somente no sistema nervoso central (SNC), mas também como mediadores locais em vários tecidos periféricos. Suas ações envolvem desde controle de ingestão de alimentos e regulação do balanço energético (DiMarzo e Matias, 2005; Quarta et al., 2011) a um modulador de uma série de processos fisiológicos, incluindo memória (Marsicano et al., 2002), ansiedade (Ahn et al., 2008, Lisboa et al., 2017) e nocicepção (Pertwee, 2001).

Acredita-se que os endocanabinóides (eCBs), sejam sintetizados sob demanda em resposta ao estímulo neuronal (Kano et al., 2009) e exercem a maioria de suas ações biológicas via ativação de receptores canabinóides usualmente canabinóides tipo 1 (CB1) que são expressos principalmente no cérebro (Matsuda et al., 1990; Glass et al., 1997). Além disso, eles são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (Willoughby et al., 1997; Glaser et al., 2006) e estudos sustentam que as concentrações circulantes de eCBs estão em equilíbrio com as concentrações nos tecidos (Hillard, Weinlander e Stuhr, 2012).

Entre os principais eCBs estão os derivados do ácido araquidônico, anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG)

(Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). A hidrólise de AEA é catalisada principalmente pela enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e 2-AG por monoacilglicerol (MAGL) (Cravatt et al., 1996; Blankman et al., 2007; Long et al., 2009). Um número considerável de estudos investigou os efeitos dos inibidores da FAAH e do inibidor de MAGL em diferentes modelos animais de ansiedade, depressão e comportamento compulsivo para entender o mecanismo do aumento do conteúdo de AEA e 2-AG por essa interferência no seu catabolismo (Fowler, 2015).

1.1.3.2 Alterações do sistema endocanabinóide na doença de Parkinson

Monoaminas relacionadas na fisiopatologia da DP como a dopamina foram investigadas com uma maior frequência, no entanto, alterações em outros componentes neurais como o sistema eCB transformam a DP em uma doença muito mais complexa (Pisani et al., 2011; Lang e Espay, 2018).

Mecanismos apoiam um papel direto dos eCBs na modulação da transmissão dopaminérgica como a interação de AEA com receptores vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) que são expressos em neurônios dopaminérgicos (Mezey et al., 2000; Starowicz et al., 2007). Além disso, os níveis de AEA são geralmente baixos em todo o cérebro de indivíduos saudáveis, com exceção de diferentes regiões dos gânglios da base (Fernandez-Ruiz, 2009).

Disfunções na transmissão de dopamina e eCBs podem interromper um mecanismo de *feedback*, particularmente na ativação em longo prazo de receptores de dopamina, como no caso da administração crônica de L-Dopa. A AEA combinada com alterações na ligação e expressão de receptores CB1 estaria relacionada a uma tentativa compensatória do organismo de substituir a dopamina depletada (Maccarrone et al., 2003; Pisani et al., 2011).

Com relação aos receptores, os receptores CB1 podem formar heterômeros com receptores dopaminérgicos D1 e D2 (Ferré et al., 2009) e o receptor canabinóide tipo 2 (CB2) foi identificado em neurônios dopaminérgicos nigrostriatais humanos (García et al., 2015). Estudos prévios experimentais na DP mostraram atividade aumentada do sistema eCB nos gânglios da base,

incluindo aumento da expressão de receptores CB1 nos gânglios da base (Lastres-Becker et al., 2001; Brotchie, 2003). O aumento da atividade dos receptores CB1 no cérebro de pacientes com DP poderia ser uma tentativa de normalizar a função resultante da depleção de dopamina no estriado, aumentando a sinalização dos receptores CB1 para reduzir a liberação de glutamato e ativando o complexo G normalmente ativado pela via dopaminérgica do receptor D2 (Meschler et al., 2001; Brotchie, 2003). Além disso, relatou-se que os receptores CB1 exibem uma resposta bifásica, com perdas em estágios iniciais, durante os quais a disfunção dopaminérgica é possivelmente o evento principal, seguido de regulação positiva em estágios avançados, caracterizados pela presença de patologia nigrostriatal incluindo morte neuronal (Garcia-Arencibia et al., 2009).

Um fator nas alterações homeostáticas do sistema eCB na DP foi demonstrado pelo nível de AEA encontrado no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP não tratados que foram pelo menos duas vezes maiores que os controles. Curiosamente, os níveis de AEA foram independentes da fase e progressão da doença ou do tipo de terapia farmacológica quando os pacientes estavam em tratamento. Além disso, a substituição dopaminérgica crônica restaura os níveis de AEA nos pacientes com DP (Pisani et al., 2010; Pisani et al., 2011). Esta normalização dos níveis de AEA foi observada no modelo animal de 6-OHDA, onde se assemelha ao resgate da atividade glutamatérgica normal, sugestiva de uma homeostase restaurada (Gerdeman e Lovinger, 2001; Gubellini et al., 2002).

Como o TRPV1 é direcionado apenas pela AEA, essa interação poderia neutralizar a ação de outros eCBs como 2-AG nos terminais GABAérgicos dentro do estriado. Assim, a AEA pode interferir na transmissão GABAérgica, regulando negativamente os níveis de 2-AG através da ativação dos canais TRPV1 nos neurônios estriatopallidais (Adermark et al., 2009; Tanimura et al., 2010).

Outro aspecto a ser levado em consideração seria a característica neuroinflamatória da DP. A primeira observação que aponta para um envolvimento do sistema imunológico na DP foi a descrição de ativada aglomeração da micróglia que regularia uma inflamação não específica, em

torno de neurônios dopaminérgicos da substância *nigra* em cérebros doentes (McGeer et al., 1988). Embora na DP, a infiltração do cérebro pelas células imunes circulantes é geralmente limitada e o envolvimento do sistema imunológico periférico na patogênese da neurodegeneração não é bem elucidado, estudos revelaram anormalidades sutis na distribuição de subgrupos de linfócitos no sangue periférico de pacientes com DP (Centonze et al., 2008). Evidências direcionam o fato de 2-AG ser um eCB com função neuroprotetora na DP, ao ser constatada uma proteção de danos neurais em modelo animal parkinsoniano, porém o mecanismo se relacionado à inflamação ou não, precisa ser melhor elucidado (Mounsey et al., 2015).

Além da inativação canônica feita pela MAGL, 2-AG também pode ser oxigenado por ciclooxigenase 2 (COX-2) para gerar prostaglandinas glicerol ésteres (PG-G). A expressão da COX-2 está aumentada nos processos inflamatórios periféricamente e central e é essencial para a oxidação do ácido araquidônico às prostaglandinas (Kozak et al. 2000; Rouzer e Marnett, 2011). Com base em achados por Morgan e colaboradores (2018), as condições sob as quais a sinalização de PG-Gs ocorre provavelmente exigiriam expressão elevada de COX-2 e níveis aumentados de produção de 2-AG, como aqueles observados após lesão cerebral ou inflamação, por exemplo. Em contraste com o papel anti-inflamatório do 2-AG, o metabólito PGE2-G produz aumento da neurodegeneração induzida pela inflamação (Hu et al. 2008; Guindon e Hohmann, 2008). Digno de nota é que o 2-AG suprime a elevação da expressão de COX-2 através de um mecanismo mediado pelo receptor CB1 envolvendo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma Gama (PPAR γ) e a via de sinalização proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) / NF κ -B (Du et al. 2011; Zhang e Chen, 2008). Porém, as relações entre 2-AG e citocinas na circulação precisam de estudos mais aprofundados de como os eCBs circulantes participam na regulação da inflamação em humanos. Isso se deve a alguns resultados contraditórios ainda presentes na literatura quanto ao mecanismo anti-inflamatório de 2-AG (Hillard et al., 2018).

1.1.4 Endocanabinóides nos transtornos de ansiedade

Desde o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas para investigar a participação do sistema eCB em respostas semelhantes à ansiedade, foram observados dados díspares em modelos animais (Lisboa et al., 2017). Por exemplo, dependendo da dose e dos locais do cérebro afetados pela AEA, sugere-se que a diminuição desse eCB em áreas relacionadas à ansiedade, como a amígdala basolateral, poderia desencadear um efeito ansiogênico (Rademacher et al., 2008; Patel et al., 2009, Aguiar et al., 2014). A ligação de CB1 pela AEA na amígdala basolateral fornece um tom inibitório através do qual múltiplos processos de saída, incluindo extinção de medo e ansiedade, são modulados (Hill et al., 2009; Gunduz-Cinar et al., 2013).

Além disso, a ativação dos receptores CB1 pela AEA, quando o fármaco inibidor da FAAH é usado, demonstrou ter propriedades ansiolíticas parcialmente obstruídas pela ação paralela da AEA no TRPV1 (Moreira et al., 2008; Batista et al., 2015). Considerando que a AEA pode se ligar aos receptores CB1 e TRPV1, também se pode sugerir que há uma interação recíproca entre esses dois receptores na modulação das respostas de pânico, incluindo a participação da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (PAG) (Aguiar et al., 2014).

Ensaios clínicos do SR141716A, um antagonista do receptor CB1 (ou Rimonabant), revelaram efeitos colaterais psiquiátricos, principalmente ansiedade e depressão em um subconjunto de indivíduos sem história de doença mental (Christensen et al., 2007; Nissen et al., 2008; Hill e Gorzalka 2009; Moreira e Crippa, 2009). Isso também foi confirmado por Bergamaschi et al. (2014), os quais observaram que o Rimonabant aumentou a ansiedade de falar em público em indivíduos saudáveis, embora sem interferir nos níveis de pré-estresse, apoiando a noção de que o sistema de eCB pode trabalhar sob demanda para neutralizar as conseqüências de estímulos aversivos.

Estudos em mulheres com depressão mostraram que as concentrações circulantes de AEA se correlacionam com variáveis emocionais (Hill et al., 2008), sugerindo que os eCBs circulantes refletem e poderiam contribuir para respostas emocionais. Em outro estudo, entre indivíduos com transtorno de

estresse pós-traumático, aqueles com menor conteúdo de AEA periférica apresentaram mais sintomas intrusivos (Hill et al., 2013).

Nesse sentido, existem algumas evidências de que o sistema eCB está envolvido na resposta ao estresse psicossocial agudo. Também foi demonstrado que a ansiedade de base se correlaciona inversamente com o conteúdo de AEA periférico em indivíduos saudáveis (Duglos et al., 2012).

A relação entre o sistema eCB e transtornos mentais como os de ansiedade é reforçada pelos estudos experimentais e clínicos que apontam para uma maior afirmação da eficácia terapêutica de direcionar o sistema eCB para auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP.

1.1.5 Ansiedade, endocanabinóides e o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal

O estresse é reconhecido como uma resposta adaptativa de um organismo a uma ameaça real ou percebida no ambiente cujo objetivo é restabelecer a homeostase (McEwen, 2007). Além disso, em humanos, a definição incorpora respostas cognitivas e emocionais, onde o estresse é uma condição na qual as exigências ambientais excedem as habilidades de enfrentamento do indivíduo (Cohen et al., 1986). O estresse pode ser dividido em três componentes principais: 1) o estressor, estímulo que perturba a homeostase; 2) estresse, aquilo que o cérebro percebe quando é confrontado com a alteração da homeostase; 3) resposta ao estresse, reação do sistema nervoso diante do que lhe foi exposto e as reações fisiológicas/comportamentais que se seguem para enfrentar o estressor (Goldstein, 2010).

Quando uma situação é interpretada como estressante, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ativação induzida pelo estresse do eixo HPA é mediada pelos neurônios que expressam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo. Esses neurônios respondem e integram *inputs* do complexo amigdalóide, córtex pré-frontal medial, hipocampo e tronco encefálico resultando em uma cascata que desencadeia a secreção dos chamados hormônios do estresse. Um desses hormônios é o cortisol, um glicocorticóide secretado pelos humanos. Para a avaliação de funcionalidade do eixo HPA considera-se a análise de

ritmos circadianos como um indicador importante (Herman et al., 2003; Joëls e Baram, 2009; Lupien, 2013).

Ritmos circadianos são ciclos comportamentais e fisiológicos com a periodicidade de aproximadamente 24 horas e são importantes reguladores na manutenção da homeostase. O principal marcapasso circadiano endógeno, o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo, envia sinalizações neural e hormonal que regulam atividades de diferentes órgãos efetores periféricos (coração, rins, entre outros). Além disso, órgãos considerados como relógios periféricos, como a glândula adrenal, são regulados por meio de sinais neurais e hormonais pelo próprio NSQ (Dunlap et al., 2004; Ferre, Valenzuela e Farfan 2007).

Assim, ritmos circadianos podem ser caracterizados pela análise de biomarcadores como o cortisol (Videnovic e Willis, 2016), o qual pode ser medido pela saliva. Essa forma de coleta tem sido preferida pelos pesquisadores por sua vantagem não invasiva. Além disso, ao contrário do sangue, a coleta de saliva não requer a colaboração de pessoal qualificado para instalação de um catéter ou conjunto de punções, permitindo uma amostragem não complicada e sem problemas de coleta. Porém, como outras coletas para cortisol, um controle das atividades do indivíduo deve ser realizado previamente. Atividade física, exposição a estressores e dieta são fatores que podem influenciar na análise de cortisol (Lupien, 2013).

A secreção de cortisol mostra acentuada ritmicidade circadiana em situações de não estresse, em que as concentrações são mais altas pela manhã (o pico), declinam progressivamente do final da tarde para o início da noite e mostram elevações abruptas após as primeiras horas de sono. Além disso, o cortisol ajuda a mediar e suprimir respostas de estresse saudáveis. Portanto, a ativação e inibição da liberação de glicocorticóides é um processo regulado temporalmente que envolve ativação neuronal rápida e inibição eficiente (Sapolsky, Romero e Munck, 2000; Joëls e Baram, 2009; Lupien, 2013; Herman, 2013).

O impacto do estresse no eixo HPA é dependente da modalidade de estresse, duração e intensidade (Herman e Seroogy, 2006). No estresse agudo, mediadores como epinefrina e norepinefrina, juntamente com

glicocorticóides, são protetores e importantes para a sobrevivência. No entanto, no estresse crônico, a secreção excessiva de glicocorticóides durante um período prolongado de tempo tem sido observada com numerosos efeitos patológicos, incluindo mudanças no SNC (Hillard, Beatka e Sarvaideo, 2018). Porém, não está claro se as regiões cerebrais que medeiam as respostas agudas ao estresse são necessárias para o desenvolvimento da disfunção do eixo HPA relacionada ao estresse crônico (Herman, 2013).

O estímulo crônico do eixo HPA com estresse prolongado precipita, a longo prazo, alterações nos sistemas efetores centrais e periféricos. Estes incluem hipertrofia adrenal, associada à exposição prolongada do córtex adrenal a corticotropina e atrofia tímica (Prewitt e Herman, 1997; Herman e Seroogy, 2006).

O sistema eCB tanto no SNC quanto na periferia pode modular as respostas comportamentais e endócrinas ao estresse agudo e crônico. Nesse sentido, sob situações estressantes, mudanças plásticas no sistema eCB são observadas (Patel e Hillard, 2008; Hill et al., 2010). O estresse repetitivo provoca adaptações bioquímicas nos eCBs corticolímbicos, sinalizando que comprometem um circuito neural que subsidia a regulação do comportamento emocional (Hill et al., 2005; Gorzalka et al., 2008; Rossi et al., 2008; Reich et al., 2009).

Os eCBs exercem efeitos bidirecionais no eixo HPA. Vários estudos mostraram que ativação do receptor CB1, particularmente com altas concentrações de agonistas diretos, aumenta concentrações circulantes de glicocorticóides (Bloom e Kiernan, 1980; Romero et al., 2002). Como os receptores CB1 são expressos em várias regiões envolvidas na regulação do eixo HPA (Herkenham et al., 1990, 1991; Cote et al., 2007; Ziegler et al., 2010), a sinalização do receptor CB1 é relevante para modular a integração da resposta de estresse. Por exemplo, a redução da liberação de glutamato das sinapses glutamatérgicas pela ativação do receptor CB1 é responsável pela regulação do *feedback* do eixo HPA mediada por glicocorticóides (Di et al., 2003). A hipótese de que a redução da sinalização eCB e do estresse crônico teria efeitos convergentes sobre os circuitos corticolímbicos tem sido apoiada pelo fato de que a perda da sinalização do receptor CB1 produz efeitos na

morfologia dendrítica tanto no córtex pré-frontal medial quanto na amígdala semelhantes aos produzidos por estresse crônico (Hill, Hillard e McEwen, 2011). Dados sugerem que a plasticidade eCB / CB1 permite a habituação do cérebro a exposições repetidas e previsíveis ao estresse. A capacidade de habituar-se a um estímulo não ameaçador reduz o risco de desenvolvimento de consequências negativas produzidas pelo estresse crônico (Hillard, Beatka e Sarvaideo, 2018).

Além dos receptores CB1, foram encontrados 2-AG e AEA na glândula pituitária (Pagotto et al., 2001). Sob condições de repouso, AEA parece restringir a ativação dos comportamentos de ansiedade e a ativação *downstream* do eixo HPA. Na amígdala, os níveis de AEA mudam dinamicamente em resposta a estímulos estressantes, dependendo da atividade da FAAH (Rademacher et al., 2008; Hill et al., 2009, 2013; Gray et al., 2015). O estresse afetaria as concentrações de AEA através de pelo menos dois mecanismos. O primeiro efeito seria mediado pela liberação extra-hipotalâmica do CRH que resultaria em aumento da atividade da FAAH, aumento do catabolismo da AEA e redução das concentrações de AEA. O segundo seria mediado pelo cortisol e envolveria um aumento no AEA através de um mecanismo ainda desconhecido (Hillard, Beatka e Sarvaideo, 2018).

Quanto à associação direta entre o 2-AG e o estresse, foi proposto que o 2-AG seja recrutado pelos glicocorticóides para desligar o eixo HPA após a cessação do estresse, embora isso ocorra em uma escala temporal mais tardia (Hill e Tasker, 2012). As concentrações séricas de 2-AG variam amplamente e de forma reproduzível ao longo do período de 24 horas quando medidas em indivíduos saudáveis, sendo que 2-AG demonstrou um pico no meio do período normal de alimentação (Copinschi, Turek e Van Cauter, 2010; Hanlon et al., 2015).

Tem sido sugerido que o estresse crônico pode levar a exaustão e morte de neurônios dopaminérgicos em pacientes com DP, devido às condições energéticas desfavoráveis aos neurônios (Kibel e Drenjančević-Perić, 2008; Djamshidian e Lees, 2014). Embora os níveis de cortisol mostrem associação com a gravidade motora na DP, sua relação com progressão da DP não é

clara. Nenhum dos estudos averiguados até o momento, verificou a influência do cortisol na progressão da doença (Soares et al., 2018).

1.1.6 Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal na doença de Parkinson

Uma alteração no ritmo circadiano na DP poderia ter não somente consequências negativas na expressão de sintomas primários. Essa disfunção poderia influenciar na biologia da neurodegeneração associada à DP (Videnovic e Willis, 2016).

O estresse também afeta a fisiologia normal da dopamina nos sistemas mesocortical, mesolímbico e na via nigrostriatal (Keefe et al., 1990; Pani et al., 2000; Hemmerle, Herman e Seroogy, 2012; Soares et al., 2018). Dependendo da intensidade e / ou duração da exposição ao estresse, a liberação de dopamina é alterada. Enquanto o estresse agudo geralmente age para aumentar a liberação de dopamina, o estresse crônico diminui o conteúdo de dopamina (Rasheed et al., 2010; Hemmerle, Herman e Seroogy, 2012).

Níveis elevados de cortisol têm sido descritos na maioria dos estudos em pacientes com DP quando comparados com controles saudáveis (Hartmann et al., 1997; Bocharov et al., 2010; Djamshidian et al., 2011; Gruden et al. 2011; Breen et al., 2014 Ibrahimagic et al., 2016). Entretanto, esses estudos apresentaram metodologias diversas, já que o tamanho da amostra nos grupos DP variou de 7 a 239 pacientes e avaliação do cortisol ocorreu através de materiais biológicos distintos como sangue (plasma ou soro), saliva ou LCR (Soares et al., 2018).

Além de fatores inerentes à própria DP, drogas convencionais no tratamento da DP, como a L-Dopa mostraram influência na regulação e liberação de cortisol. Neste sentido, estudos prévios sugerem um estímulo excitatório do sistema dopaminérgico no eixo HPA (Marakaki et al., 2015). Além disso, em modelos animais de DP avançada, uma disfunção circadiana pode ser agravada pela terapia a longo prazo com a L-Dopa (Li et al., 2017).

Sintomas depressivos foram relacionados ao aumento (Seifried et al., 2013) e diminuição (Müller e Muhlack, 2007) na liberação de cortisol em

pacientes com DP. Porém, baixos níveis de cortisol noturno foram encontrados em idosos deprimidos (Bremmer et al., 2007; Kabia et al., 2016). Além disso, os pacientes com DP com depressão e / ou estresse crônico podem experimentar um ambiente neuroinflamatório crônico, possivelmente ligado à patologia exacerbada da DP (Hemmerle, Herman e Seroogy, 2012).

O papel e a função precisos dos hormônios do estresse na DP ainda não estão claros. Nesse sentido, estudos mostraram que o estresse pode modular o sistema nigrostriatal lesado (Keefe et al., 1990) e os glicocorticóides possivelmente estão afetando a resposta compensatória ao sistema motor danificado (Metz, 2007). No entanto, alguns dados demonstraram que os glicocorticóides são neuroprotetores para os neurônios dopaminérgicos nigrostriatais lesados (Ros-Bernal et al., 2011). Dessa forma, a literatura apresenta resultados contraditórios.

Portanto, os eCBs e o eixo HPA apresentam uma relação à nível de estresse e ansiedade. Além disso, alterações tanto no sistema eCB quanto no eixo HPA são observadas na DP e em transtornos de ansiedade. Dessa forma, é ressaltada a importância de mais investigações quanto à essas relações.

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES DO ESTUDO

Considerando que a ansiedade é um problema clínico muito importante em pacientes com DP, seria relevante adaptar e validar uma escala específica como a PAS recomendada por especialistas para avaliação de ansiedade nesses pacientes. Acreditamos que a versão adaptada para utilização em pacientes brasileiros deve manter as principais propriedades semelhantes da escala original.

Considerando que o sistema eCB está associado de várias maneiras aos sintomas de ansiedade em geral, e que esse sistema pode estar alterado na DP, podemos especular que alterações desse sistema poderiam estar também associados ao aparecimento dos sintomas de transtornos de ansiedade em pacientes com DP. Especulamos que os níveis plasmáticos de eCBs em pacientes com DP poderiam ser associados com a ocorrência de transtornos de ansiedade. Outra hipótese seria a de que a concentração de eCBs plasmáticos estaria associada à gravidade dos sintomas de ansiedade nesses pacientes. Considerando os aspectos farmacológicos da ansiedade na DP, nossa hipótese é de que a variação do nível de eCBs representaria uma tentativa do organismo em regular o estresse crônico inerente à própria DP. Desse modo, os sintomas de ansiedade poderiam também se correlacionar com alterações no padrão do ritmo circadiano e com os níveis de cortisol associadas às variáveis clínicas da DP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Traduzir, adaptar culturalmente e validar a versão em português brasileiro da PAS versão autoaplicável (SR-PAS).

Verificar a existência de associação entre ansiedade na DP e níveis plasmáticos de eCBs e cortisol salivar.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar um novo instrumento auxiliar no diagnóstico mais específico de transtornos de ansiedade na DP para o Brasil em um contexto ambulatorial de saúde pública;

Quantificar os níveis de AEA e 2-AG no plasma de pacientes com DP, com e sem transtornos de ansiedade;

Quantificar os níveis de cortisol salivar (noturno e matutino) de pacientes com DP, com e sem transtornos de ansiedade;

Determinar o padrão circadiano do cortisol em pacientes com DP;

Verificar associação entre os transtornos de ansiedade com níveis de AEA, 2-AG, cortisol salivar e outros parâmetros clínicos da DP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Foi realizado um levantamento anual de pacientes com diagnóstico de DP recrutados no ambulatório especializado em distúrbios do movimento (EXP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Inicialmente, identificou-se um total de 666 pacientes com CID (G20/G22) sendo que 622 apresentavam DP. Para a validação da PAS, foram incluídos 100 pacientes que se adequavam aos critérios de participação e finalizaram essa etapa do estudo.

Desses pacientes, 40 voluntários foram incluídos para a coleta de material biológico (sangue e saliva) e participarem do estudo de eCBs e cortisol. Foram separados em 2 grupos (n=20 em cada) a partir dessa amostra de conveniência, constituídos por um grupo de pacientes com DP e ansiedade e um grupo com DP e sem ansiedade. Os grupos foram pareados com relação ao sexo, idade, estágio da doença, sintomas depressivos e uso de dose-equivalente de drogas dopaminérgicas. Também foram documentados os tratamentos usados pelos pacientes já previamente diagnosticados com os transtornos de ansiedade e depressão.

Todos os participantes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A) para a admissão ao estudo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Número do protocolo: 3.087.445).

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico de DP segundo os critérios do banco de cérebros de Londres (Hughes *et al.*, 1992) de língua materna portuguesa e sem demência.

3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com demência, Hoehn e Yahr ≥ 4 ou outra comorbidade grave, histórico de trauma cerebral, uso prévio e atual de estimulação cerebral profunda (DBS), distúrbios psiquiátricos que não fossem transtornos de ansiedade (com ou sem depressão maior) e se o paciente apresentar uma pontuação de Mini Exame do Estado Mental (MEEM) de acordo com pontos de corte relacionado a escolaridade (Brucki *et al.*, 2003) que indique um prejuízo cognitivo. Para o grupo DP sem ansiedade, exclusão de depressão atual.

3.2 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS

Resumidamente, podemos observar abaixo um fluxograma geral do estudo (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Fluxograma geral do estudo.

3.2.1 Tradução e adaptação cultural da PAS

A primeira etapa do estudo compreendeu a tradução para a língua portuguesa falada no Brasil e a adaptação cultural da PAS (autorização expressa do autor original – anexo B). Essa etapa seguiu, de forma adaptada, ao processo sugerido por Beaton e colaboradores (2000). Três falantes nativos do português brasileiro fluentes em inglês traduziram o PAS para o português brasileiro, independentemente. Essa equipe consistia em um especialista clínico em distúrbios do movimento, um psiquiatra e um farmacêutico. Uma versão consensual inicial da PAS foi realizada com o auxílio de profissionais médicos experientes (neurologistas e/ou psiquiatra e os pesquisadores principais, cientes dos objetivos do estudo) que não participaram da tradução inicial, sendo formada uma única versão consensual inicial em língua portuguesa do Brasil. A versão consensual inicial da PAS foi então aplicada em pacientes portadores de DP em um serviço ambulatorial brasileiro. A pesquisadora perguntou ao paciente e, caso presente, ao seu acompanhante, o significado de cada questão e da respectiva resposta escolhida, além disso, versões diferentes de cada questão foram apresentadas (versões essas procedentes das três traduções iniciais). Após essas avaliações (10 pacientes avaliados) os avaliadores relataram suas impressões pessoais resultando em uma versão traduzida única após discussão final entre todos os integrantes. Em seguida, um editor científico de língua inglesa retraduziu a versão de PAS para o inglês sem acesso à versão original da escala. A versão consensual de versão única com comentários do comitê de profissionais envolvidos no estudo foi encaminhada para o autor principal da escala original para análise. Na comparação entre a primeira retrotradução e a versão original, quaisquer discrepâncias foram discutidas e corrigidas, de modo a obter uma primeira versão em português do Brasil de PAS que pudesse ser avaliada pelo observador e pelo paciente (Anexo C).

3.2.2 Validação da SR-PAS

Para que a escala fosse testada em uma realidade ambulatorial de um serviço público de saúde brasileiro, somente a versão autoaplicável da PAS foi avaliada, ou seja, a SR-PAS. Após a inclusão dos pacientes segundo os critérios estabelecidos pelo estudo, a escala SR-PAS era entregue para preenchimento com uma instrução inicial feita pela pesquisadora. Caso o voluntário não compreendesse algum item ou seu nível educacional fosse deficiente para uma boa leitura, poderia ser auxiliado pela pesquisadora que estava observando o progresso desse preenchimento. A leitura dos itens era realizada para todos os pacientes (para preencher ou após preencher para conferência), independente da escolaridade. Porém, as respostas eram unicamente oriundas da impressão do paciente sobre aquele sintoma, sem a avaliação de um observador. Dessa maneira, ao ser autoaplicável, poderíamos testar uma forma de inclusão mais viável a uma realidade em que o paciente forneceria dados que podem auxiliar na avaliação clínica de transtornos de ansiedade, sem a necessidade prévia da disponibilidade de profissional treinado para aplicá-la como observador.

A escala é composta de três subescalas: uma pertencente a ansiedade persistente (SR-PAS-A com 5 itens), uma relacionada a ansiedade episódica (SR-PAS-B com 4 itens), e uma para comportamento de evitação (SR-PAS-C com 3 itens). O comportamento de “evitar” foi considerado uma terceira característica dos transtornos de ansiedade, não capturados pelas primeiras subescalas (SR-PAS-A e SR-PAS-B). O número total de itens da escala total foi 12. Os itens foram pontuados em uma escala Likert de 5 pontos, com “0” significando “não ou nunca” e “4” significando “Grave ou quase sempre”. Isso implica uma pontuação total máxima de 48.

A validade do questionário (sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia, razões de verossimilhança) foi determinada a partir dos dados colhidos de todos os pacientes analisados no estudo, incluindo o preenchimento da SR-PAS e o diagnóstico “com transtornos de ansiedade” e “sem transtornos de ansiedade” de acordo com um instrumento padrão ouro de avaliação diagnóstica.

3.2.3 Avaliação clínica

Todos os pacientes do estudo (n=100) tanto para a validação ou para o estudo de eCBs e cortisol foram avaliados clinicamente por manuais e escalas. Para a avaliação motora, um neurologista especialista em distúrbios do movimento aplicou:

- a versão da *Movement Disorders Society* da escala Unificada para Avaliação da DP (Escala Unificada de Avaliação da doença de Parkinson – MDS-UPRDS (Fahn e Elton, 1987; Goetz et al., 2003).
- A escala do estágio de Hoehn & Yahr (HY), (Hoehn e Yahr, 1967; Goetz et al., 2004).

Um psiquiatra/psicólogo realizou o diagnóstico dos transtornos de ansiedade e/ou depressão de acordo com critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 4ª edição Revisada (DSM-IV-TR) através da aplicação da Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional (*Mini International Neuropsychiatric Interview* - MINI), na versão Plus (Amorim, 2000; Sheehan et al., 1998). Para diagnosticar transtornos de ansiedade clinicamente significativos (ou seja, transtorno do pânico, agorafobia, fobias sociais e específicas, TAG, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e transtorno depressivo maior, módulos E, F, G, H, I, P e O foram utilizados. Depressão e TOC não foram critérios de inclusão, porém foram descritos como comorbidades. Transtornos que não preenchiam os critérios para qualquer transtorno de ansiedade específico foram classificados como ansiedade sem outra especificação.

A análise do estado cognitivo global foi realizada pela aplicação do MEEM (Folstein et al., 1975) e do teste de fluência verbal (animais), (Nitrini et al., 1994; 2004).

O diagnóstico de demência foi feito segundo o fluxograma sugerido pela *Movement Disorders Society* (Dubois et al., 2007). Os pacientes que apresentavam flutuações motoras eram sempre avaliados no estado *on* (sob o efeito da medicação para DP) (Dissanayaka et al., 2014; Leentjens et al., 2008). Informações sobre os pacientes foram coletadas para dados

demográficos, terapia farmacológica (principalmente os medicamentos para DP e ansiedade/depressão) e presença de outros problemas de saúde, idade de início e duração da doença. Após a avaliação clínica geral e as devidas exclusões, outro profissional qualificado aplicava as escalas de avaliação de ansiedade e depressão (Leentjens et al., 2011b). Para a avaliação de transtornos de ansiedade:

- *Parkinson Anxiety Scale* (PAS) que foi validada (Leentjens et al., 2014) como autoquestionário (versão SR-PAS) (com ajuda do pesquisador/acompanhante quando necessário, em casos de baixa escolaridade). Foram utilizadas para a validação:
 - Inventário de Ansiedade de Beck (Beck et al., 1988; Cunha, 2001; Osório et al., 2011).
 - Inventário de Fobia Social (SPIN) (Osório et al., 2004, 2009, 2011; Vilete, Coutinho e Figueira, 2004);
 - Para a avaliação de depressão, quando presente, era aplicado o Inventário de Depressão de Beck – versão II (Beck et al. 1996; Gorenstein et al., 2011).

Para avaliação de qualidade de vida aplicaram-se: Questionário de Qualidade de Vida, - *Eight-item Parkinson's disease questionnaire*, (PDQ8) (Jenkinson et al., 1997) e escala análogo visual (EAV) presente no *Euro Quality of Life Instrument – 5D* (EQ-5D) (EuroQoL Group, 1990).

3.2.4 Estudo de endocanabinóides e cortisol

Dentre os 100 pacientes, 40 pacientes foram incluídos no estudo de eCBs e cortisol e realizaram a coleta de sangue e saliva. A coleta de sangue matinal era realizada em jejum de 12 horas e após desjejum ao meio-dia através de punção de uma veia periférica. O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulantes, EDTA ou fluoreto, e centrifugado até 2 horas após a coleta. Um tubo da coleta em jejum foi destinado para análises de rotina do hospital como hemograma, lipidograma, glicemia em jejum, proteína C reativa e

enzimas hepáticas TGO/TGP. O restante foi processado para que o plasma resultante fosse armazenado para posterior análise de AEA e 2-AG.

Além disso, os participantes foram convidados para a coleta de saliva (2 amostras) por 2 dias consecutivos, iniciando a coleta na própria residência na noite anterior (22 horas) e finalizando no HC (entre 8 - 9 horas). A coleta de saliva foi um procedimento simples, não invasivo e livre do estresse da punção venosa, utilizando-se tubos Salivette® (Sarsted, Alemanha), conforme descrito por Castro et al. (2000). Para a coleta de saliva, os participantes receberam instruções verbais e documentais para o correto manejo da coleta (Adaptado de Bosaipo, 2016, anexo D). Os tubos Salivette® utilizados pelos participantes do estudo foram recolhidos e centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C para a separação das amostras do cortisol salivar do tubo de algodão. Amostras aliqüotadas de plasma e saliva foram armazenadas a -80°C até o dia das análises e as amostras não utilizadas poderão ser usadas para outras pesquisas devido à criação de biorrepositório denominado Biomarcadores Ansiedade Parkinson aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCMFMRP – USP e da FMRP-USP (CAAE: 57063516.9.0000.5440, Parecer: 3087445).

3.2.5 Análises laboratoriais

3.2.5.1 Quantificação de endocanabinóides

A quantificação de AEA e 2-AG foi realizada no plasma através de métodos de quantificação com cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem no modo *column switching* para a análise direta de eCBs. A preparação das amostras e o método detalhado estão disponíveis em estudo prévio realizado por Marchioni e colaboradores (2017, 2018).

3.2.5.2 Quantificação de cortisol salivar

Utilização da técnica imunoenzimática *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para a análise de cortisol na saliva realizada no Laboratório de Imunoclinica no HCFMRP-USP. As análises foram realizadas em duplicata para cada amostra. O cortisol salivar apresenta uma boa correlação com o cortisol previamente dosado em soro ($r(47) = 0.91$, $p < 0.0001$), segundo as instruções do fabricante do kit. Foram utilizados 2 kits provenientes da empresa SALIMETRICS® (lote 1807501). As instruções detalhadas para o ensaio estão contidas na bula do fabricante. Resumidamente, os kits anteriormente armazenados (2-8°C) foram colocados em temperatura ambiente e os reagentes foram preparados (diluição do tampão de enxágue (10:1), solução do conjugado diluído (15 µL de conjugado em 24 mL de solução diluente (1:1600)). Nas microplacas (com 96 poços) foram adicionados: as soluções padrões de cortisol (82,77; 27,59; 9,19; 3,06; 1,02; 0,33 nmol/L) para a curva de calibração, controles (*high* e *low*), ZERO, *Non-Specific Binding* (NSB) e salivas (25 µL) previamente homogeneizadas e à temperatura ambiente nos respectivos poços. Foi acrescentado 200 µL de solução de conjugado em cada poço com pipeta multicanal, colocado no *plate rotator* (5 minutos, no máximo 500 rpm) e as microplacas foram incubadas no escuro por 60 minutos. Após esse tempo, as placas foram lavadas em local próprio automatizado com solução de lavagem e adicionado 200 µL de tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço. Novamente, as microplacas colocadas no *plate rotator* (5 minutos, no máximo 500 rpm) e incubadas no escuro por 25 minutos. Finalmente, foram adicionados 50 µL de solução de parada a cada poço e as microplacas foram levadas à leitora de ELISA (comprimento de onda de 450 nm) no intervalo máximo de 10 minutos.

3.2.6 Avaliação endocrinológica

Adicionalmente ao cortisol noturno (22h) e matinal (8-9h), incluímos como variáveis o cálculo da Área sob a Curva em relação entre os momentos 22 h inicial e às 8-9h ($AUC_{22h-8/9h}$). Assim, utilizamos o método trapezoidal

proposto por Pruessner et al. (2003) que considera a distância entre as medidas individuais entre si e em relação à base, conforme a fórmula descrita na equação 1.1:

$$AUC_{22h-8/9h} = (m_2 + m_1) \times t_1 / 2$$

Equação 1.1 - Fórmula para o cálculo da Área Sob a Curva (AUCg) dos níveis de cortisol na saliva em diferentes momentos. Nota: *m_i*: medidas individuais; *t_i*: tempo de intervalo entre as medidas.

Já para a avaliação de um padrão circadiano normal para o cortisol salivar, adotou-se o critério de uma variação de pelo menos 73,5% entre os níveis de cortisol noturno (às 22h) pela manhã (às 8/9h) (Castro et al., 1999). Esse valor foi resultante da subtração de 3 vezes o valor do coeficiente de variação interensaio (26,5%) em relação ao cortisol matinal que foi considerado 100% (Castro et al., 1999; Castro e Moreira, 2007).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.3.1 Validação da SR- PAS

Seguiram-se os passos estatísticos realizados na validação de Leentjens et al., 2014) para a SR-PAS.

Variáveis demográficas e relacionadas à doença foram apresentadas de forma descritiva. A estatística de teste de *Kolmogorow-Smirnow* (K-S) Z foi usada para verificar se a distribuição era gaussiana.

A aceitabilidade da escala foi acessada pela porcentagem de itens perdidos ou inválidos (< 5% é um índice aceitável). Além disso, outros dados como média, mediana, assimetria (critério: -1 a +1) e extensão efeitos de teto e piso (< 15% foram definidos como ótimos) foram computados para avaliar a qualidade dos dados.

Para avaliação da estabilidade temporal calculou-se, inicialmente, o coeficiente de correlação de *Spearman* entre as medidas teste e a reteste. A seguir, para avaliação da concordância, o coeficiente de correlação intraclass

(CCI), aleatório de uma via. Um CCI de pelo menos 0,70 foi considerado satisfatório. Para avaliação da homogeneidade do questionário (consistência interna) foi calculado o alfa de Cronbach (um valor $\geq 0,70$ foi considerado aceitável).

A validade convergente foi avaliada pela correlação de *Spearman* entre os escores total, subescalas e escores do SR-PAS e do BAI e SPIN ($p > 0,60$ ou superior indicou alta associação).

A validade divergente foi avaliada pela correlação de *Spearman* entre o total de subescalas da SR-PAS e as escalas que avaliam os sintomas depressivos (BDI-II) e o funcionamento cognitivo (MEEM).

Curvas de características operacionais do receptor (ROC) foram realizadas para identificar um escore de corte do total de SR-PAS para o diagnóstico de ansiedade clinicamente significativa. Sensibilidade, especificidade, área sob a curva ROC (AUC) e índice de Youden (maior soma de sensibilidade e especificidade) foram calculados. O escore de corte e as propriedades diagnósticas das três subescalas foram avaliados em relação a transtornos ansiosos específicos (segundo critérios do DSM): a subescala de ansiedade persistente com transtorno de ansiedade generalizada, a subescala de ansiedade episódica com transtorno de pânico e a escala de evitação com fobia social e agorafobia. Para confecção e análise do banco de dados foram utilizados os *softwares* Microsoft Office Excel, *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3.3.2 Estudo de endocanabinóides e cortisol

Para averiguar se os dados seguiam uma distribuição normal (paramétricos) foi utilizado o teste de *Shapiro Wilk*. Ao ser constatado que os dados não seguiam uma distribuição normal (não paramétricos) foram utilizados os testes não paramétricos para realizarmos as comparações e as correlações. Para comparações entre os dados do grupo Parkinson sem ansiedade (grupo 0) com o grupo Parkinson com ansiedade (grupo 1) foi aplicado o teste de *Mann-Whitney*. Este é um teste não paramétrico indicado para comparação de dois grupos não pareados para se verificar se pertencem

ou não à mesma população (se possuem a mesma média). Já para as correlações entre os dados provenientes dos dois grupos, foi utilizado o coeficiente de correlação *Spearman*. Foi considerada uma correlação significativa se $p \leq 0,05$ sendo que valores de rho de *Spearman* (ρ) >0 a correlação seria positiva, $\rho < 0$ seria negativa e $\rho = 0$ não haveria associação. Se $\rho > 0,7$ a correlação era considerada forte.

Para confecção e análise do banco de dados foram utilizados os *softwares* Microsoft Office Excel, SPSS versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL) e R 3.5.2. (Team, R. C. (2013)).

4 RESULTADOS

4.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO DA VERSÃO EM PORTUGUÊS BRASILEIRO DA *PARKINSON ANXIETY SCALE* AUTOAPLICÁVEL (SR-PAS)

4.1.1 Tradução transcultural

Realizamos a tradução e a adaptação transcultural da escala em questão seguindo os procedimentos padronizados por Beaton et al, (2000). Todas as divergências encontradas neste processo foram solucionadas em consenso pelo comitê local de peritos. A versão final da escala com seus 12 itens foi elaborada de forma a ter apresentação visual semelhante à utilizada pela escala BAI. Dessa forma, os pacientes recebiam menor quantidade de páginas, tinham melhor espaço para preenchimento nos campos, e isso agilizou o tempo de preenchimento e melhorou a adesão dos pacientes em responderem as questões. Isso foi averiguado na fase em que estávamos aplicando a escala em um número inicial de pacientes.

4.1.2 Características sociodemográficas e clínicas da amostra geral

A amostra do estudo foi composta por 100 pacientes com diagnóstico de DP segundo os critérios do Banco de Cérebros de Londres (Hughes et al., 1992) atendidos consecutivamente no Ambulatório de Doenças Extrapiramidais do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Dentre os 100 pacientes, havia 46 mulheres e 54 homens, com idade média de 58,6 anos variando entre 39 a 80 anos. A escolaridade média foi de 8 anos com pontuação média no MEEM de 27,4. A maioria dos participantes era composta por brancos (95%) e casados (67%). Com relação às características da DP, a duração média de tempo de doença foi de 8,7 anos com estágio de Hoehn e Yahr médio de 2,1. Para o escore total da MDS-UPDRS foi constatada uma pontuação média de 55,4. Quanto à medicação em uso, a dose equivalente de L-Dopa média era de 1114 mg/dia e 53% dos pacientes estavam em uso de antidepressivos. Para as

escalas de qualidade de vida, PDQ-8 e EQ-VAS, os pacientes tiveram uma pontuação média de 10,9 e 6,7, respectivamente. Na tabela 4.1 estão apresentadas as características sociodemográficas e clínicas da amostra.

Tabela 4.1 - Características demográficas, sociais, e clínicas da amostra de 100 pacientes com doença de Parkinson.

Idade (anos) (Média (DP))	58,6 (9,0)
Gênero (F/M)	46/54
Cor (n)	
Branco	95,0
Negro	3,0
Mulato	2,0
Estado conjugal (n)	
Casados	67,0
Divorciados	17,0
Viúvos	8,0
Solteiros	8,0
Anos de estudo (Média (DP))	8,0 (4,5)
Duração da doença de Parkinson (anos)	8,7(5,8)
Em uso de antidepressivos (n)	53,0
Dose equivalente de L-dopa em uso (mg) (Média (DP))	1114,0 (675,7)
Escore no MEEM (Média (DP))	27,4 (2,0)
Estágio de Hoehn e Yahr (Média (DP))	2,1 (0,5)
MDS-UPDRS (parte 1) (Média (DP))	11,6 (7,5)
MDS-UPDRS (parte 2) (Média (DP))	12,9 (8,1)
MDS-UPDRS (parte 3) (Média (DP))	29,4 (13,3)
MDS-UPDRS (parte 4) (Média (DP))	1,8 (3,6)
MDS-UPDRS (total) (Média (DP))	55,4 (24,3)
PDQ-8	10,9 (7,1)
EQ-VAS	6,7 (1,7)

Nota: Dados apresentados como média (desvio-padrão-DP), ou frequência simples (%). Abreviações: EQ VAS: Escala Análogo Visual do *Euro Quality of Life Instrument – 5D*; MDS-UPDRS: Versão da MDS da Escala Unificada para Avaliação da doença de Parkinson; MEEM: Mini-exame do estado mental; PDQ-8: Questionário de Qualidade de Vida na doença de Parkinson.

Em relação à avaliação comportamental realizada nesses pacientes com a utilização da MINI, foram diagnosticados transtornos de ansiedade em 56 pacientes (56%). Na tabela a seguir, são apresentadas as frequências dos tipos de transtornos de ansiedade diagnosticados nesses pacientes (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Frequência da classificação de transtornos de ansiedade, segundo a MINI, presentes na amostra diagnosticada (n=56).

Transtorno de ansiedade	n (%)
TAG	15 (27,0%)
Fobia social	1 (1,8%)
Transtorno do Pânico	6 (10,7%)
Agorafobia associada a fobia social e específica	5 (8,9%)
Comorbidade com outros transtornos de ansiedade	29 (51,8%)
Comorbidade com depressão	27 (48,2%)

Nota: Dados apresentados como n (%). Abreviações: TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada.

Para transtorno de ansiedade não específico foram diagnosticados 5 (8,9%) pacientes dos 56.

Nessa amostra, os transtornos mais frequentes foram TAG e fobia social. Desses 56 pacientes, 27 (48,2%) apresentaram sintomas de transtornos de ansiedade em associação com sintomas de depressão. O TAG revelou-se o transtorno com maior frequência com depressão (17 pacientes dentre os 56, ou seja, 30,3%).

Os resultados das avaliações com as escalas de ansiedade (SR-PAS e subsescalas (A,B,C), BAI e SPIN) e depressão (BDI-II) estão apresentadas na tabela 4.3, a seguir.

Tabela 4.3 – Resultados dos questionários de ansiedade e depressão aplicados aos 100 pacientes com doença de Parkinson.

Escore na BAI	18,5 (12,9)
Escore na BDI-II	13,7 (10,7)
Escore na SPIN	21,8 (16,7)
Escore total SR-PAS (Subescalas A+B+C)	19,5 (10,0)
Escore na SR-PAS- A (ansiedade persistente)	10,6 (5,1)
Escore na SR-PAS-B (ansiedade episódica)	4,5 (3,6)
Escore na SR-PAS-C (comportamentos de evitação)	4,5 (3,2)

Nota: Dados apresentados como média (desvio-padrão-DP). Abreviações: BAI, Inventário de Ansiedade de Beck; BDI-II, Inventário de Depressão de Beck, versão 2. SR-PAS, *Self-Rated Parkinson Anxiety Scale*; SPIN, Inventário de fobia social.

A pontuação média de BAI (18,5) descreve uma gravidade de ansiedade leve (Beck et al., 1988). Para BDI-II, o escore médio de 13,7 indicou uma depressão leve a moderada (Beck et al., 1996). Para SPIN, a pontuação média de 21,8 indica presença de sintomas compatíveis com o diagnóstico de fobia social na amostra (Critério: ≥ 19) (Osório et al., 2004; Vilete et al., 2004). Já para a SR-PAS podemos considerar os critérios de *cut-off* observados na validação original. Para a média de 19,5 na SR-PAS total, indica a presença de transtorno de ansiedade na amostra (*cut-off* =14). Para a SR-PAS-A com a média de 10,6 revelou a presença de ansiedade persistente (*cut-off* = 10). Já a SR-PAS-B com média 4,5 não alcançou o valor de corte para ansiedade episódica (*cut-off* = 5). Para SR-PAS-C com média de 4,5, indica-se a presença de comportamentos de evitação (*cut-off* = 4).

4.1.3 Propriedades psicométricas da PAS autoaplicável (SR-PAS)

4.1.3.1 Estabilidade e confiabilidade

4.1.3.1.1 Estabilidade temporal da SR- PAS (“teste-reteste”)

Uma amostra de 15 pacientes foi submetida à avaliação em reteste do questionário. O tempo considerado para reteste foi de aproximadamente 40 dias.

O coeficiente de correlação de *Spearman* entre as medidas teste e reteste da SR-PAS total foi de $\rho = 0,867$ ($p=0,001$), indicando uma correlação forte entre as medidas. Já para a SR-PAS-A foi de $\rho = 0,509$ ($p=0,05$); para SR-PAS-B, $\rho = 0,613$ ($p=0,01$) e para SR-PAS-C $\rho = 0,588$ ($p=0,02$).

Foi calculado o coeficiente de correlação intraclassa (CCI) que pode variar entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a concordância entre as medidas de interesse. Para a SR-PAS total foi obtido CCI = 0,96 com IC=(0,89;0,99), indicando alta concordância. Para a subescala SR-PAS-A foi obtido CCI= 0,82 com IC = (0,47;0,94). Para a subescala SR-PAS-B, CCI= 0,92 e IC= (0,75;0,97). Para a subescala SR-PAS-C, CCI=0,86 e IC=(0,58;0,95).

4.1.3.1.2 Homogeneidade dos componentes da SR-PAS (consistência interna)

A confiabilidade também foi estudada por meio da análise da consistência interna utilizando o coeficiente de confiabilidade alfa de Cronbach. Assim, as consistências internas pelo alfa de Cronbach foram: SR-PAS total= 0,96; SR-PAS-A=0,82; SR-PAS-B=0,92 e SR-PAS-C=0,86). Todas as correlações item-total e correlações inter-itens (média, desvio padrão de cada item e correlações de item-total) são relatadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Média, desvio padrão (dp) de cada item e correlação item total da escala SR- PAS versão brasileira (n=100).

Item da SR-PAS	Média±dp	Correlação Item/Total Corrigida	Alfa de Cronbach, se item deletado
SR-PAS A1	2,18 ±1,14	0,65	0,85
SR-PAS A2	2,11 ± 1, 26	0,64	0,85
SR-PAS A3	2,00±1,44	0,68	0,85
SR-PAS A4	2,48±1,36	0,58	0,85
SR-PAS A5	1,79±1,46	0,62	0,85
SR-PAS B1	0,89±1,12	0,56	0,85
SR-PAS B2	1,09±1,20	0,47	0,86
SR-PAS B3	1,11±1,18	0,43	0,86
SR-PAS B4	1,27±1,33	0,65	0,85
SR-PAS C1	1,77±1,50	0,55	0,85
SR-PAS C2	1,37±1,37	0,42	0,85
SR-PAS C3	1,34±1,29	0,36	0,87

4.1.3.2 Validade da SR-PAS

4.1.3.2.1 Aceitabilidade e distribuição

Com respeito a qualidade dos dados, não foram encontrados dados perdidos para SR-PAS total e nem efeitos teto ou piso (*Floor and Ceiling Effects*). A assimetria (*skewness*) da escala foi dentro do limite aceitável (0,8 para SR-PAS total; 0,5 para SR-PAS-A; 0,8 para SR-PAS-B e 0,7 para SR-PAS-C). A média e mediana da SR-PAS total foi de 19,5 ± 9,9 e 20, respectivamente. Não foi encontrado efeito teto para a SR-PAS total e suas subescalas, porém efeito piso foi encontrado para as subescalas de ansiedade episódica (SR-PAS-B, piso= 16%) e de evitação (SR-PAS-C, piso=17%).

4.1.3.2.2 Curva ROC e escolha do ponto de corte

Para avaliar as propriedades das escalas como diagnóstico, a validade de critério foi testada contra diagnósticos do DSM-IV usando as características de curva ROC. Isso foi feito em toda a escala (qualquer transtornos de ansiedade versus ausência de transtorno de ansiedade) e para cada subescala. Adicionalmente para as subescalas, as propriedades diagnósticas avaliadas em relação a transtornos de ansiedade específicos: a subescala persistente com TAG, a subescala episódica com transtorno do pânico e escala de evitação com fobia social e agorafobia combinados (tabela 4.5) .

A seguir, a figura 4.1 apresenta a curva ROC para o escore total (SR-PAS total). A figura 4.2 relata o escore da subseção de ansiedade não episódica (SR-PAS-A), escore da subescala de ansiedade episódica (SR-PAS-B) e escore da subescala de ansiedade de evitação (SR-PAS-C), respectivamente.

Para o escore total e subescalas (A, B, C), a área abaixo da curva foi de 0,86 (IC: 0,78;0,93, $p = 0,004$), 0,84 (IC: 0,76;0,92, $p = 0,004$), 0,75 (IC: 0,65;0,85, $p = 0,005$) , 0,80 (IC: 0,71;0,89, $p=0,004$), respectivamente.

A análise da curva ROC revelou um valor de 17 como escore total de *cut-off* para identificar clinicamente um transtorno de ansiedade (com sensibilidade = 0,80; especificidade = 0,75 e índice Youden = 1,55).

Quanto a análise das curvas ROC para qualquer transtorno de ansiedade obtivemos os seguintes valores: o *cut-off* para SR-PAS-A (ansiedade persistente) foi de 8 (sensibilidade=0,94; especificidade=0,60 e índice Youden= 1,54). Para a SR-PAS-B (ansiedade episódica), o *cut-off* encontrado foi de 5 (sensibilidade=0,62; especificidade=0,78 e índice Youden= 1,40). Por fim, para a SR-PAS-C (ansiedade de evitação), o *cut-off* foi de 3 (sensibilidade=0,83; especificidade=0,61 e índice Youden= 1,44).

Porém, quando analisamos o *cut-off* para cada subescala em relação aos transtornos de ansiedade correspondentes podemos observar uma pequena variação dos valores de curva ROC, exceto para a ansiedade episódica (SR-PAS-B) cujos valores aumentam consideravelmente (tabela 4.5).

Figura 4.1 - Curva ROC para diferentes notas de corte da SR-PAS versão brasileira – escore total. Área abaixo da curva ROC (AUC) = 0,858 (IC: 0,782;0,933, $p = 0,004$), Sensitivity = Sensibilidade; Specificity = Especificidade.

Figura 4.2. Curva ROC para diferentes notas de corte da SR-PAS versão brasileira – escore das subescalas (A, B, C) (com qualquer transtorno de ansiedade x sem ansiedade). (A): SR-PAS-A. (B):SR-PAS-B e (C) SR-PAS-C. Área abaixo da curva ROC (AUC) = gráfico2 (A): SR-PAS-A: 0,841 (IC: 0,759;0,923, $p = 0,004$), gráfico3 (B): SR-PAS-B: 0,748 (IC: 0,648;0,848, $p = 0,005$), gráfico4 (C): SR-PAS-C: 0,804 (IC: 0,715;0,892, $p = 0,004$).
Sensitivity = Sensibilidade; Specificity = Especificidade.

Tabela 4.5 – Valores de curvas ROC da SR-PAS e subescalas (transtornos de ansiedade específicos).

Escala	Variável de grupo	AUC (%)	Cut-off ótimo	Sensibilidade cut-off ótimo	Especificidade cut-off ótimo	Índice Youden
SR-PAS total	Qualquer transtorno de ansiedade	85,8	17,0	0,80	0,75	1,55
SR-PAS A (persistente)	Transtorno de Ansiedade Generalizada	78,8	9,0	0,77	0,67	1,44
SR-PAS B (episódica)	Transtorno do Pânico	99,5	9,0	1,00	0,96	1,96
SR-PAS C (evitação)	Transtornos de ansiedade de evitação	81,9	4,0	0,81	0,74	1,55

a Transtornos de ansiedade caracterizados por evitação são: agorafobia e fobia social/específico (aqui considerados em conjunto como transtornos de ansiedade de evitação). O índice de Youden é a soma mais alta de sensibilidade e especificidade. O ponto de corte em que o índice de Youden é atingido é o ponto de corte ideal para dicotomização de pacientes com e sem transtorno de ansiedade.

Abreviações: ROC, características operacionais do receptor; AUC, área sob a curva; PAS, Escala de Ansiedade de Parkinson; SR, autoavaliação do paciente.

4.1.3.2.3 Validade convergente

A correlação entre SR-PAS total com pontuações de BAI foi significativa, positiva e forte ($p = 0,787$; $p \leq 0,01$). Para todas as subescalas de SR-PAS, a correlação com BAI foi significativa ($p \leq 0,01$), variando os valores de rho de Spearman (SR-PAS-A $\rho = 0,763$; SR-PAS-B $\rho = 0,718$; SR-PAS-C $\rho = 0,492$). Também foram encontradas correlações positivas e significativas ($p \leq 0,01$) para SR-PAS e SPIN (SR-PAS total $\rho = 0,554$; SR-PAS-A $\rho = 0,435$; SR-PAS-B $\rho = 0,375$; SR-PAS-C $\rho = 0,590$).

4.1.3.2.4 Validade divergente

A correlação entre SR-PAS total com pontuações de BDI-II foi significativa e positiva ($p = 0,591$; $p \leq 0,01$). Para todas as subescalas de SR-PAS, a correlação com BDI-II foi significativa ($p \leq 0,01$), variando os valores de rho de Spearman (SR-PAS-A $\rho = 0,556$; SR-PAS-B $\rho = 0,434$; SR-PAS-C $\rho = 0,480$). Já a correlação entre SR-PAS total com pontuações de MMSE foi significativa e negativa ($p = -0,266$; $p \leq 0,01$). Essa correlação também foi

negativa para todas as subescalas de SR-PAS e não foi significativa, exceto para SR-PAS-A ($p = -0,251$, $p \leq 0,05$).

4.1.3.3 Prevalência e correlações clínicas de sintomas de ansiedade

De acordo com a pontuação de *cut-off* SR-PAS versão brasileira, ocorreu ansiedade geral em 60 indivíduos (60%). Dentre os 100 pacientes, ansiedade persistente (SR-PAS-A) e episódica (SR-PAS-B) foram encontradas em 65% e 13% dos pacientes, respectivamente. Comportamentos de evitação foram reportados em 59% do total de pacientes.

Associações significantes ($p \leq 0,01$) da SR-PAS total, ansiedade não episódica (SR-PAS-A), episódica (SR-PAS-B) e de comportamentos de evitação (SR-PAS-C) foram observadas com escores da MDS-UPDRS I (SR-PAS total: $p=0,674$; SR-PAS-A: $p=0,627$; SR-PAS-B: $p=0,551$; SR-PAS-C: $p=0,488$), MDS-UPDRS II (SR-PAS total: $p=0,505$; SR-PAS-A: $p=0,430$; SR-PAS-B: $p=0,457$; SR-PAS-C: $p=0,377$). Já para a MDS-UPDRS III foram vistas correlações fracas para SR-PAS total, SR-PAS-A e SR-PAS-B. Para a MDS-UPDRS IV, foram significantes e fracas para SR-PAS total ($p=0,220$); SR-PAS-A ($p=0,242$) SR-PAS-B ($p=0,240$).

As correlações com o estágio de HY foram significantes em sua maioria, porém fracas. Apenas SR-PAS-C não obteve correlação com HY ($p=0,352$). Nenhuma correlação significativa foi observada entre a SR-PAS e subescalas com a duração da DP.

4.2 ETAPA II: ASSOCIAÇÃO ENTRE TRANSTORNOS DE ANSIEDADE NA DOENÇA DE PARKINSON COM ENDOCANABINÓIDES E CORTISOL SALIVAR

4.2.1 Caracterização da amostra de conveniência

Foi selecionada uma amostra de conveniência, composta por 40 pacientes, sendo que 20 deles apresentavam diagnóstico de algum transtorno de ansiedade segundo a avaliação pela MINI, enquanto 20 pacientes não apresentavam ansiedade. Os pacientes foram selecionados de maneira a haver pareamento entre os grupos para idade, gênero, escolaridade, duração e gravidade da DP.

As características dessa amostra de pacientes com e sem ansiedade estão apresentados na tabela 4.5.

Como é possível verificar, os grupos com e sem ansiedade obtiveram uma paridade quanto à idade, sexo, cor da pele, escolaridade, estado civil, ser ou não fumante, IMC, dose diária equivalente de L-Dopa, duração e gravidade da DP. Além disso, escores como do MEEM, fluência verbal e parte 2, 3, 4 e total da MDS-UPDRS não demonstraram diferença significativa entre os grupos. Os escores da parte 1 da MDS-UPDRS, PDQ-8, EQ VAS apresentaram uma diferença significativa entre os grupos com e sem ansiedade. O grupo de pacientes com ansiedade fazia uso de mais antidepressivos que os pacientes sem ansiedade.

Tabela 4.5 - Características demográficas, sociais, e clínicas da amostra de pacientes com DP (n=40) divididos em grupo com e sem ansiedade.

Variável	Doença de Parkinson		p
	Com ansiedade	Sem ansiedade	
n	20	20	
Idade (anos)	57,2 ± 6,8	59,6 ± 9,4	0,551
Gênero (F/M)	11/9	10/10	0,766
Cor (n (%))			0,990
Branco	19,0 (95,0)	19,0 (95,0)	
Negro	1,0 (5,0)	1,0 (5,0)	
Estado conjugal (n (%))			0,164
Casados	10,0 (50,0)	13,0 (65,0)	
Divorciados	6,0 (30,0)	2,0 (10,0)	
Viúvos	1,0 (5,0)	4,0 (20,0)	
Solteiros	3,0 (15,0)	1,0 (5,0)	
Fumantes (n (%))	1,0 (5,0)	1,0 (5,0)	0,990
Índice de Massa Corporal (IMC)	27,9 (6,3)	24,9 (3,2)	0,133
Anos de estudo formal	8,3 (4,2)	9,5 (4,9)	0,503
Duração da doença (anos)	8,5 (4,9)	8,9 (5,6)	
Em uso de antidepressivos (n)	12	6	0,041*
Sertralina	8	5	
Escitalopram	1	1	
Paroxetina	1	0	
Mirtazapina	2	0	
Dose equivalente de L-dopa (mg)	1132 (541)	1219 (845)	0,935
Escore no MEEM	27,7 (1,8)	28,1 (2,1)	0,370
Fluência verbal (animais)	18,4 (3,4)	17,3 (3,9)	0,513
Estágio de Hoehn e Yahr	2,1 (0,5)	2,1 (0,4)	0,920
MDS-UPDRS (parte 1)	13,5 (6,2)	8,3 (8,0)	0,017*
MDS-UPDRS (parte 2)	13,9 (5,4)	9,6 (7,2)	0,070
MDS-UPDRS (parte 3)	25,4 (12,8)	26,4 (11,6)	0,840
MDS-UPDRS (parte 4)	0,7 (2,7)	0,45 (1,4)	0,780
MDS-UPDRS (escore total)	53,5 (18,4)	44,8 (19,1)	0,256
Escore PDQ-8	13,5 (7,5)	6,3 (4,1)	0,001*
EQ-VAS	6,3 (1,4)	8,4 (1,3)	0,0001*

Nota: Dados apresentados como média ±Desvio Padrão ou frequência simples (%). N total = 40, Teste de *Mann-Whitney*, *p≤ 0.05.

Abreviações: EQ VAS, Escala Análogo Visual do *Euro Quality of Life Instrument – 5D*; IMC, Índice de Massa Corporal; MINI, Mini International Neuropsychiatric Inventory; MEEM, Mini Exame do Estado Mental; PDQ-8, Inventário de fobia social; UPDRS: Versão da MDS da Escala Unificada para Avaliação da doença de Parkinson.

Tabela 4.7 - Resultados dos questionários de ansiedade e depressão e histórico de ansiedade e depressão de pacientes com doença de Parkinson.

	Com ansiedade	Sem ansiedade	<i>p</i>
n	20	20	
	média±DP	média±DP	
Escore na BAI	21,4 (12,9)	9,6(7,8)	0,002*
Escore na BDI-II	15,9 (10,9)	6,9 (4,7)	0,002*
Escore na SPI	26,4 (17,2)	12,6 (10,6)	0,001*
Escore total SR-PAS	23,4 (9,1)	11,5 (6,6)	0,0001*
Escore na SR-PAS- A (ansiedade persistente)	11,9 (4,7)	6,5 (3,5)	0,0005*
Escore na SR-PAS-B (ansiedade episódica)	5,3 (3,8)	3,0 (2,8)	0,038*
Escore na SR-PAS-C (ansiedade de evitação)	6,3 (3,0)	1,9 (1,8)	0,0001*
	n (%)	n (%)	
Histórico de ansiedade	20,0 (100,0)	11,0 (55,0)	0,0008*
Histórico de depressão	15,0 (75,0)	9,0 (45,0)	0,05*

Nota: Dados apresentados como média (±Desvio padrão (dp) ou frequência simples (%). N total = 40, Teste de *Mann-Whitney*, * $p \leq 0,05$.

No grupo com ansiedade, a pontuação média de BAI (21,5) descreve uma gravidade de ansiedade moderada (Beck et al., 1988). Para BDI-II, o escore médio de 15,9 indicou uma depressão leve a moderada (Beck et al., 1996). Para SPIN, a pontuação média de 26,4 indica presença de sintomas compatíveis com o diagnóstico de fobia social na amostra (Critério: ≥ 19) (Osório et al., 2004; Vilete et al., 2004).

Já para a SR-PAS podemos considerar os critérios de *cut-off* observados na validação prévia. Para a média de 11,9 na SR-PAS total, não indicaria a presença de transtorno de ansiedade total na amostra (*cut-off* = 17). Para a SR-PAS-A com a média de 11,9 revelou a presença de ansiedade persistente (*cut-off* = 8). Já a SR-PAS-B com média 5,3 alcançou o valor de corte para ansiedade episódica (*cut-off* = 5). Para SR-PAS-C com média de 6,3 indica-se a presença de comportamentos de evitação (*cut-off* = 3). É óbvio por esses

resultados que os grupos se diferenciam significativamente quanto à presença de sintomas de ansiedade e também de depressão.

4.2.2 Análise dos níveis de endocanabinóides em pacientes com DP com e sem ansiedade

Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de eCBs quando comparamos os dois grupos, tanto para AEA ($p=0,90$), quanto para 2-AG ($p=0,63$) (Figura 4.3).

Figura 4.3. Gráfico boxplot, mostrando a comparação entre os níveis plasmáticos de AEA e 2-AG entre grupos com (n=20) e sem ansiedade (n=20) de pacientes com doença de Parkinson. Nota: Concentrações de AEA e 2-AG em ng/mL.

4.2.3. Análise de potenciais correlações entre os níveis de endocanabinóides e a gravidade dos sintomas de ansiedade nos pacientes com DP

A análise de correlação entre os níveis plasmáticos de AEA e 2-AG de todos os pacientes (n=40) com os escores nas diversas escalas de ansiedade e depressão não revelou correlação significativa.

A análise de correlação entre os níveis plasmáticos de AEA e 2-AG em cada grupo (com e sem ansiedade) revelou uma correlação negativa significativa entre os níveis plasmáticos de 2-AG e os escores da escala SR-PAS-C ($p = -0,526$; $p=0,02$), somente no grupo sem ansiedade.

Quanto à dose equivalente de L-Dopa (LED), não houve associação a nenhum dos subtipos de ansiedade. Com relação à duração da DP (anos), houve uma associação moderada com uma escala de fobia social (SPIN) no grupo com ansiedade ($p = 0,456$; $p=0,04$). Também foi observada uma correlação moderada entre SR-PAS-B (ansiedade episódica) e estágio de HY ($p = 0,514$; $p=0,02$) no grupo com ansiedade.

4.2.4 Análise do cortisol salivar

Não observamos diferença significativa para os níveis de cortisol noturno ($p = 0,63$) ou cortisol diurno ($p=0,32$). Além disso, não houve diferença entre a AUC entre os horários em comparação aos grupos ($p= 0,48$), como apresentado na tabela 4.8.

Também não encontramos correlações significativas entre níveis de cortisol salivar e os escores nas escalas de ansiedade e depressão. Porém, como observado na tabela 4.9, os pacientes com doença de Parkinson podem ter uma alteração no ritmo circadiano e isso possivelmente prejudicou o uso de cortisol como biomarcador.

Tabela 4.8 - Níveis basais de cortisol salivar de pacientes com doença de Parkinson com e sem ansiedade.

	Com ansiedade	Sem ansiedade	<i>p</i>
n	20	20	
	média±dp	média±dp	
22 horas (noite anterior)	4,0 ± 2,7	4,4 ± 3,7	0,63
8-9 horas (manhã seguinte)	9,6 ± 7,5	10,2 ± 5,5	0,32
AUC (22h – 8-9h)	67,3 ± 42,9	73,7 ± 36,2	0,48

Nota: Dados apresentados como média (±desvio padrão (d.p.), mediana (amplitude). Teste de *Mann-Whitney*.

4.2.5 Análise qualitativa do ritmo circadiano (RC) nos pacientes com DP

Na tabela 4.9, podemos observar a análise qualitativa do Ritmo Circadiano (RC) nos pacientes com DP com e sem ansiedade. Podemos verificar que a grande maioria dos pacientes não apresenta ritmo circadiano normal. Isso independe da presença de sintomas de ansiedade.

Tabela 4.9 - Medidas referentes ao Ritmo Circadiano (RC) em pacientes com doença de Parkinson com e sem ansiedade.

	Com ansiedade	Sem ansiedade	<i>p</i>
n	20	20	
	n (%)	n (%)	
Sem ritmo circadiano (RC)	15 (75%)	14 (70%)	0,74
	média±DP	média±DP	
RC % do total	-42,9 (44,1)	-47,0 (45,9)	0,74

Nota: Dados apresentados como média (±desvio padrão (d.p.), mediana (amplitude) ou frequência simples (%). Teste de *Mann-Whitney*

Dentre esses pacientes, 10 no grupo com ansiedade apresentavam TCSREM (6 com perda de RC). Já no grupo sem ansiedade, houve 5 pacientes com TCSREM (todos com perda de RC) (diagnóstico de TCSREM realizado em projeto em andamento do grupo de pesquisa (doutorando Carlos Maurício de Almeida).

5 DISCUSSÃO

5.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO DA VERSÃO EM PORTUGUÊS BRASILEIRO DA *PARKINSON ANXIETY SCALE* AUTOAPLICÁVEL (SR-PAS)

O presente estudo é o primeiro a traduzir, adaptar culturalmente e a investigar as propriedades psicométricas da SR-PAS em português brasileiro em pacientes não demenciados de DP. Além disso, foi feita uma abordagem em ambiente ambulatorial para verificarmos a aplicabilidade do novo instrumento nesse contexto clínico.

Os resultados indicaram que a SR-PAS demonstrou dados de boa qualidade e aceitabilidade desde que não ocorreu ausência de dados e não existiram efeitos piso e teto. Reafirmando o estudo original (Leentjens et al., 2014) e uma validação italiana (Santangelo et al., 2016) foram encontrados efeito piso para as subescalas de ansiedade episódica e de evitação, mostrando uma alta porcentagem de pacientes sem ansiedade episódica ou comportamento de evitação. Portanto, tal achado pode apoiar a idéia de uma menor prevalência de ansiedade episódica e comportamento de evitação em pacientes com DP (Forjaz et al., 2013; 2014; Leentjens et al., 2014).

A SR-PAS e suas subescalas relataram alta confiabilidade como evidenciado pelos valores de alfa de Cronbach ($\geq 0,7$). Quanto à validade, uma correlação forte entre SR-PAS e BAI indicou uma boa validade convergente para a escala. Além disso, uma correlação entre SR-PAS e SPIN foi observada, com um maior destaque para SR-PAS-C que estaria mais associada a comportamentos de evitação, medidos pela SPIN.

Uma fraca correlação significativa entre SR-PAS e SR-PAS-A, assim como a ausência de significância (SR-PAS-B e SR-PAS-C) com dados de rastreio cognitivo (MEEM) suporta a hipótese que SR-PAS identifica ansiedade na DP. Também foi encontrada uma correlação moderada de SR-PAS e subescalas com o BDI-II refletindo uma sobreposição entre ansiedade e depressão. Esse resultado é consistente com descrições prévias que relatam a coexistência de transtornos de ansiedade e de depressão por volta de 19-40% dos pacientes com DP (Nuti et al., 2004).

No presente estudo, foi encontrada uma pontuação de *cut-off* para SR-PAS brasileira (≥ 17) mais alta do que a relatada no estudo original (≥ 14). Essa inconsistência poderia refletir as diferenças das características clínicas entre as amostras de DP envolvidas nos dois estudos, sendo que a amostra do nosso estudo apresentou menor duração de doença e mais complicações motoras que a amostra de Leentjens et al., (2014) (média de duração de doença, nossa amostra: 8,7 *versus* Leentjens et al. 10,4; média da MDS-UPDRS III, nossa amostra: 29,4 *versus* Leentjens et al. 24,7).

Outra explicação possível para justificar a diferença de pontuação de *cut-off* de SR-PAS entre os estudos foi a questão de realizarmos um estudo monocêntrico com uma amostra mais homogênea de DP, enquanto Leentjens et al. realizou um estudo multicêntrico com diferentes amostras por instituição com variáveis demográficas e clínicas relacionadas a DP mais heterogêneas.

Outra diferença entre os dois estudos foi a taxa de prevalência de transtornos de ansiedade diagnosticada pelos critérios de DSM usado como *padrão ouro* (nosso estudo: 56% *versus* Leentjens: 27%); particularmente em nosso estudo a prevalência de TAG, fobia social e transtorno do pânico associados a outros transtornos de ansiedade foi maior do que a relatada no estudo original (Leentjens et al., 2014). A frequência de transtorno do pânico foi semelhante ao estudo italiano (Santangelo et al., 2016). Utilizando a pontuação *cut-off* SR-PAS, encontramos sintomas de ansiedade relevantes clinicamente em 60%, a qual é semelhante a valores reportados em um estudo de validação da PAS versão observador na Itália (Santangelo et al., 2016). Quanto aos aspectos de transtornos de ansiedade em DP, ansiedades persistente e episódica foram encontradas em 65% e 13% pacientes, respectivamente. Comportamentos de evitação foram reportados em 59% pacientes.

Associações significantes foram encontradas do escore total da SR-PAS e escores de ansiedades persistente, episódica com variáveis clínicas motoras (para as MDS-UPDRS III e IV) e gravidade da DP (HY), o que difere dos estudos prévios (Leentjens et al. 2014; Santangelo et al. 2016). Porém, as correlações encontradas em nosso estudo foram fracas (ρ abaixo de 0,3). Já para evitação não foram encontradas tais associações motoras e nem de gravidade da DP.

Além disso, não foram encontradas associações significativas para a duração da DP nem para a total quanto para as subescalas. Esse resultado poderia indicar que comportamentos de evitação na DP seriam mais independentes da severidade de sintomas motores. Como o comportamento de evitação é um sintoma comportamental de ansiedade, esse achado poderia ser considerado um apoio adicional à hipótese de que transtornos de ansiedade poderiam ser uma parte integrante da DP, em vez de apenas uma reação à incapacitação física. No estudo de Santangelo et al. (2016) foi relatada uma leve associação de evitação com complicações motoras, porém foram avaliados somente pacientes com estágio inicial da DP (HY=1 e 2), enquanto o nosso estudo avaliou até o estágio moderado (HY=1 a 3). Mesmo com uma frequência de 17% para HY estágio 3, esse fator poderia diferenciar os resultados encontrados nos estudos.

Por outro lado, as associações significativas observadas para ansiedade persistente e episódica poderiam levar em consideração que pacientes com sintomas motores mais severos possam estar mais propensos às características desses transtornos de ansiedade. Segundo critérios de DSM, os transtornos classificados nessas subescalas seriam o TAG (ansiedade persistente) e o transtorno do pânico que como ansiedade episódica estaria mais relacionada a situações ou contextos mais específicos a DP (Broen et al., 2018). Já o TAG estaria mais relacionado à depressão (Broen et al., 2016; Garlovsky et al., 2016; Reijnders et al., 2008), o que foi evidenciado pelos nossos resultados (30,3% de TAG associado à depressão no grupo com ansiedade).

A classificação DSM de transtornos de ansiedade não é adequada ao descrever os tipos de ansiedade relatados no contexto da DP e a PAS (observador e autorelato) seria uma medida auxiliar válida de diferentes dimensões da ansiedade em DP (Leentjens et al., 2014; Santangelo et al., 2016; Broen et al., 2018). Uma limitação adicional da utilização da MINI é que apenas diagnósticos listados no DSM podem ser feitos (Leentjens et al., 2014). Já a PAS, não é direcionada somente para sintomas persistentes, como é o caso com a HARS, ou para sintomas episódicos, como é o caso do BAI. A validade concorrente dos grupos conhecidos é boa e AUC e índice Youden da

PAS é maior que o do HARS, BAI e HADS (Leentjens et al., 2011b; 2014), o que foi confirmado na validação brasileira. Além disso, a escala é breve, contém descrição de sintomas que não se sobrepõe aos motores da DP e é fácil de administrar.

Embora não seja uma limitação do presente estudo, todas as propriedades psicométricas possíveis da SR-PAS não foram avaliadas. Por exemplo, a sensibilidade à mudança não foi avaliada, pois isso só poderia ser feito longitudinalmente em um estudo observacional ou de tratamento. Isso seria fora do escopo do presente estudo. Além disso, não foi avaliada a versão da PAS para observadores, o que exigiria o trabalho de profissionais com experiência clínica treinada para sua aplicabilidade. Porém, mesmo se fosse possível sua aplicação por observador, estudo prévio considerou que a ansiedade avaliada por um clínico apresentava viés em dois itens e que a ansiedade por ser uma experiência pessoal, o auto-relato seria preferível quando possível (Forjaz et al. 2014).

Os pesquisadores responsáveis pela formulação da PAS optaram por uma formulação dupla, incorporando frequência e severidade, porque isso faria com que as opções de resposta para todos os itens da escala ficassem mais uniformes. Para sintomas de ansiedade persistente, a gravidade seria mais relevante, como é seria o caso da frequência para a ansiedade episódica. Para comportamentos de evitação, tanto a severidade quanto a frequência poderiam ser relevantes. Os autores acreditavam que os pacientes saberiam o que é relevante para cada item. Os resultados do estudo indicaram que esta forma de formular itens não levaria a problemas no uso clínico da escala e provavelmente não afetou as propriedades clinimétricas (Leentjens et al., 2014). Porém, uma fraqueza da PAS é a segmentação modesta da escala, que poderia ser melhorada com a inclusão de mais itens que medem níveis mais baixos de ansiedade (Forjaz et al., 2014).

Além disso, como uma limitação do presente estudo teríamos a dificuldade de leitura e compreensão de itens em pacientes com baixa escolaridade, dependendo de algum profissional da saúde para ler e/ou explicar. Não seria recomendável a leitura da escala pelo acompanhante por se tratar de perguntas que podem causar desconforto e consequentemente retrair

algumas e respostas genuínas do paciente. Além disso, alguns sintomas de depressão poderiam se sobrepor aos de ansiedade, como relatado previamente. Assim, uma escala específica que auxiliasse com medidas de depressão em DP também poderia ser formulada ou validada.

Outro fator seria que participantes com ansiedade relacionada ao *wearing off* podem avaliar como mais baixo o nível de ansiedade durante o estado *on*, mesmo que o período de recordação seja de 4 semanas. Como resultado, mais associações sutis, especialmente as com ansiedade episódica, são prejudicadas (Broen et al., 2018).

Para estudos futuros, também sugerimos uma avaliação da PAS versão brasileira em sua versão observacional e classificação de transtornos de ansiedade em um estado *on* e *off* para detectar associações entre certos subtipos de ansiedade e flutuações motoras.

5.2 ETAPA II: ASSOCIAÇÃO ENTRE TRANSTORNOS DE ANSIEDADE NA DOENÇA DE PARKINSON COM ENDOCANABINÓIDES E CORTISOL SALIVAR

Estudos prévios demonstraram a associação entre o sistema eCB e transtornos de ansiedade, principalmente em modelos animais (Lisboa et al., 2017). Um embasamento para uma relação entre a sinalização de eCBs e transtornos de ansiedade em humanos provém de um estudo de eCBs séricos em mulheres com depressão (Hill et al., 2008). Neste estudo, a gravidade da ansiedade experimentada por mulheres com depressão maior foi inversamente correlacionada com o conteúdo sérico basal da AEA. Embora muito pouco seja conhecido sobre a fonte ou potencial alvo dos eCBs circulantes, esses dados sugerem que algumas das manifestações somáticas da ansiedade podem estar relacionadas à redução da sinalização de eCBs (Hill et al., 2008; Hillard et al. 2012). Entretanto, a literatura se mantém escassa quanto à interação desse sintoma não motor da DP com o sistema eCB, ressaltando a importância de ter sido realizada a presente investigação clínica.

Entretanto, no presente estudo não foi possível observar uma diferença significativa de níveis plasmáticos de eCBs entre os grupos DP com e sem ansiedade (figura 4.3). Além disso, observamos uma falta da associação entre transtorno de ansiedade na DP com eCBs. Apenas uma associação foi constatada pela correlação negativa entre níveis plasmáticos de 2-AG e comportamentos de evitação (SR-PAS-C), porém somente no grupo sem diagnóstico de ansiedade ($p = -0,526$; $p=0,02$). Dessa forma, não poderíamos confirmar uma associação de 2-AG com comportamentos de evitação, pois o grupo com ansiedade não apresentou uma correlação significativa.

No nosso estudo, LED não estava associado a nenhum dos subtipos de ansiedade. No entanto, ainda é discutível se a medicação antiparkinsoniana é um fator de risco para a ansiedade na DP, com alguns estudos relatando uma associação (Leentjens et al., 2011a), mas outros não (Dissanayaka et al., 2010; Negre-Pages et al., 2010).

Já a duração da DP estaria associada aos comportamentos de evitação e pode refletir constrangimento e retraimento social que acompanham o

agravamento dos sintomas (Dissanayaka et al. 2016; Broen et al. 2018). Isso foi observado pela associação da medida de fobia social, SPIN, com a duração da DP (grupo com ansiedade, $p = 0,456$; $p=0,043$), porém não para SR-PAS-C. Anteriormente, na validação da SR-PAS foi relatado que não houve associação da SR-PAS e subescalas com duração de DP, confirmado pelo estudo presente.

Quanto ao estágio de HY, foi observada uma correlação moderada com ansiedade episódica (SR-PAS-B), no grupo com ansiedade. Em recente estudo, marcadores clínicos específicos de DP (como estágio de incapacidade de HY) mostraram uma maior associação com ansiedade episódica quando comparada a ansiedade persistente. Isso seria ao fato da ansiedade episódica ser mais contextual ou situacional e relacionado a períodos de *off* (sem efeito da medicação antiparkinsoniana) ou com prejuízo nas atividades diárias (Broen et al., 2018).

Quanto ao eixo HPA, em nosso estudo foi observado que houve uma desregulação do ritmo circadiano de cortisol na maioria dos pacientes, independente de estarem no grupo com ou sem ansiedade (tabela 4.9). Além disso, não encontramos uma diferença significativa em níveis de cortisol salivar (noturno, matinal e AUC, na tabela 4.8) entre os grupos com e sem ansiedade.

A cronicidade do estresse na DP facilitaria a degeneração neuronal (Kibel e Drenjančević-Perić, 2008) e poderia levar a mudanças estruturais nas regiões cerebrais responsáveis pela modulação do estresse. O estresse crônico induz o desenvolvimento de hiper-responsividade do eixo HPA a novos estímulos (Johnson et al., 2009; Shansky et al., 2009; Hill, Hillard e McEwen, 2011) e mudanças plásticas no sistema eCB são observadas (Patel e Hillard, 2008; Hill et al., 2010). O estresse repetitivo como o que ocorre na DP, provoca adaptações bioquímicas nos eCBs corticolímbicos, sinalizando que comprometia um circuito neural que subsidiava a regulação do comportamento emocional (Hill et al., 2005; Gorzalka et al., 2008; Rossi et al., 2008; Reich et al., 2009).

Outro fator importante a ser considerado é o tipo de exposição ao estresse, se um mesmo estressor (homotípico) ou diferentes estressores (heterotípico) se repetem. Reduções no nível de AEA no hipocampo e córtex

pré-frontal foram observadas em protocolo de estresse homotípico (Hill et al., 2010). Entretanto, não foram encontradas alterações desse eCB nas mesmas regiões cerebrais, no caso de estresse heterotípico (Bortolato et al., 2015). Aparentemente há um processo de habituação durante a exposição ao estressor homotípico (Herman, 2013). Além disso, alterações neuroendócrinas parecem ser mais proeminentes após exposição a estímulos heterotípicos (Duarte, Planeta e Crestani, 2015). Entretanto, seria necessário maiores esclarecimentos se na DP o tipo de estresse crônico no paciente seria predominantemente homotípico ou heterotípico para fazer inferências adicionais sobre o comportamento neuroendócrino e de eCBs.

Níveis elevados de cortisol têm sido descritos na maioria dos estudos em pacientes com DP quando comparados com controles saudáveis (Hartmann et al., 1997; Bocharov et al., 2010; Djamshidian et al., 2011; Gruden et al., 2011; Breen et al., 2014 Ibrahimagic et al., 2016). Por outro lado, a ativação de eCBs reduziria a ativação do eixo HPA em exposição ao estresse. Baixas respostas de cortisol estão associadas à fadiga, motivação reduzida e incontrolabilidade percebida (Chida e Steptoe, 2009; Tops et al. 2016), pelo fato do cortisol estar envolvido na regulação de energia para a ativação de sistemas fisiológicos e neurais para lidar ativamente com os desafios (Sapolsky et al., 2000). No entanto, estudos relacionando cortisol e DP apresentaram metodologias diversas, uma vez que o tamanho da amostra nos grupos DP variou de 7 a 239 pacientes e avaliação do cortisol através de material biológico distinto como sangue (plasma ou soro), saliva ou LCR (Soares et al., 2018). Adicionalmente, dados sugerem que pacientes submetidos a tratamento com L-Dopa podem apresentar desregulação neuroendócrina a estressores (Li et al., 2017).

Em revisão sistemática foi demonstrado que a depressão maior típica (melancólica) caracteriza-se por ativação excessiva dos sistemas fisiológicos de estresse, do sistema noradrenérgico no *locus coeruleus* e do eixo HPA (Vilela e Juruena, 2014). Ademais, a depressão está associada a uma regulação prejudicada do *feedback* negativo do eixo HPA. O *feedback* prejudicado pode permitir uma influência negativa cumulativa de glicocorticóides no crescimento e sobrevivência neuronal (Herman e Seroogy,

2006). Nossa amostra com ansiedade apresentou pacientes com depressão (25%), o que também poderia ter contribuído para o aumento de desregulação da ritmicidade circadiana de cortisol. Há algumas evidências prévias de que o tratamento crônico com antidepressivos poderiam regular níveis de cortisol e normalizar a ação do *feedback* negativo exercido por estruturas límbicas sobre a função do eixo HPA (Barden, 2004). Porém, mesmo que boa parte dos pacientes do estudo (tabela 4.5) estava em uso de antidepressivos, ainda assim foi vista uma desregulação circadiana de cortisol. Além disso, o possível recrutamento de 2-AG pelos glicocorticóides para desligar o eixo HPA após a cessação do estresse (Hill e Tasker, 2012), provavelmente também foi alterado.

Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ativação do receptor de glicocorticóide (GR) recruta a sinalização eCB não foram claramente elucidados. Enfatiza-se que os GRs também se encontram em regiões límbicas, incluindo hipocampo e amígdala (Hillard, Beatka e Sarvaideo, 2018), ou seja, locais envolvidos na ansiedade. Muitas regiões do encéfalo que são alvo de distúrbios neurológicos, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal, também são responsáveis para o controle da função HPA. Lesões da amígdala medial e central, regiões excitatórias de estresse putativo, não atenuam respostas de estresse crônico (Prewitt e Herman, 1997; Herman, 2013). Assim, danos a essas áreas cerebrais teriam o potencial para promover a liberação de glicocorticóides e contribuir para o processo neurodegenerativo (Herman e Seroogy, 2006).

Nesse sentido, os glicocorticóides possivelmente estão afetando a resposta compensatória ao sistema motor danificado na DP (Metz, 2007). Um provável mecanismo compensatório da depleção de dopamina afetado seria os níveis de AEA aumentados juntamente com mudanças na ligação e expressão de receptores CB1 (Brotchie, 2003; Maccarrone et al., 2003; Pisani et al., 2011).

Referente à AEA, especula-se a interferência do uso contínuo de L-Dopa pelos pacientes, já que em estudo prévio foi observada a restauração de níveis de AEA em pacientes em que a terapia dopaminérgica era reintroduzida, porém em LCR (Pisani et al., 2010; Pisani et al., 2011). Adicionalmente, os níveis

cerebrais normais de 2-AG é aproximadamente 170 vezes maior de que os de AEA (Stella, Schweitzer e Piomelli, 1997; Baggelaar et al. 2018).

Dados sugerem a hipótese de que a síntese de 2-AG aumenta nas células e tecidos sanguíneos em resposta a fatores desencadeantes de inflamação, o que resultaria em um aumento desses eCBs na circulação (Cote et al., 2007, Di Marzo et al., 2009; Weis et al., 2010). Dessa forma, outro aspecto a ser levado em consideração seria a característica neuroinflamatória da DP. Em recente revisão (Felger, 2018), dados demonstraram que a inflamação originária da periferia teria como alvos, estruturas cerebrais relevantes para transtornos de ansiedade, e poderia estar relacionada a efeitos de citocinas em neurotransmissores como as monoaminas (particularmente dopamina), bem como o glutamato. Porém, as relações entre 2-AG e citocinas na circulação precisam de estudos mais aprofundados de como os eCBs circulantes participam na regulação da inflamação em humanos. Isso se deve a alguns resultados contraditórios ainda presentes na literatura quanto ao mecanismo anti-inflamatório de 2-AG (Hillard et al., 2018).

Outro fator a se considerar seria a dosagem de eCBs pelo plasma, uma forma menos invasiva de coleta, mas com características a serem ressaltadas. Os eCBs também são gerados no sangue, mas não no plasma, sugerindo que as células sanguíneas sintetizam e liberam eCBs (Schmidt et al., 2006, Vogeser et al., 2006). Em particular, monócitos (precursores de macrófagos), macrófagos (Varga et al., 1998; Chouker et al., 2010) e plaquetas (Varga et al., 1998) liberam eCBs quando ativados *ex vivo* por endotoxinas e citocinas (Schmidt et al., 2006). Além do SNC e dos órgãos reprodutivos, quantidades significativas de eCBs podem entrar na circulação a partir dos tecidos adiposos (Matias et al. 2006; Spoto et al. 2006).

O desequilíbrio do eixo HPA em pacientes com DP, também prejudicaria o papel dos glicocorticóides na regulação da vasculatura do cérebro, bem como a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Então, qualquer disfunção nessas ações pode influenciar a infiltração de moléculas citotóxicas resultando em aumento da vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos (Herrero et al. 2015). À medida que a barreira hematoencefálica se torna disfuncional durante a progressão da DP, eCBs produzidos por neurônios e outras células do SNC

podem ser transportados para o sangue e contribuir para os níveis plasmáticos (Kortekaas et al., 2005; Maccarrone et al., 2006; Garfias et al., 2019). Dados suportam a noção de que as concentrações circulantes de eCBs estão em equilíbrio com as concentrações nos tecidos. Por exemplo, as concentrações de AEA e 2-AG em microdialisados cerebrais, que aproximam suas concentrações no espaço extracelular do cérebro, são aproximadamente 2 e 5 nM, respectivamente. Estas concentrações estão no intervalo das concentrações de AEA e 2-AG no soro e plasma humanos (Caille et al., 2007; Hillard et al., 2012).

A proposta de que os eCBs circulantes estejam relacionados às suas concentrações no cérebro os tornam atraentes biomarcadores do tônus endocanabinóide do SNC. No entanto, esta noção é complicada pelo fato de que outros tecidos também doam os eCBs à circulação, de modo que uma função biomarcadora do SNC pudesse ser mascarada pelas mudanças na homeostase de eCBs em outros tecidos ou no sistema imunológico. Apesar dessas ressalvas, os dados atualmente disponíveis indicam que medidas eCBs circulantes, particularmente durante experiências estressantes, poderiam servir como um biomarcador para vários aspectos da vulnerabilidade a sequelas induzidas pelo estresse (Hillard et al., 2012). Porém em nosso estudo, a desregulação da ritmicidade circadiana observada pela análise de cortisol salivar poderia ter influenciado na dosagem plasmática de eCBs.

Como limitações do presente estudo podemos destacar a ausência de um grupo controle saudável, apesar do escopo ter sido verificar as associações de transtornos de ansiedade em grupos com DP. Além disso, sugerimos futuras dosagens de eCBs. Apesar de como foi descrito, de que a quantificação plasmática aparentemente reflete um bom panorama bioquímico das alterações no SNC, seria interessante essa comparação de materiais biológicos, principalmente com o LCR. Outro fator a ser considerado seria a avaliação desses pacientes com DP em seu estado *off*. Dessa forma, poderíamos detectar associações entre certos subtipos de ansiedade e flutuações motoras. Um maior número de voluntários para abranger um maior grupo com transtornos de ansiedade sem depressão seria interessante para melhor

investigação da influência dessa comorbidade nas quantificações de eCBs e cortisol.

6 CONCLUSÕES

- A versão em português do Brasil da SR-PAS mostrou características que demonstram sua validade para avaliar sintomas de transtornos de ansiedade em pacientes brasileiros com DP.

- Não houve alterações ou associações dos níveis plasmáticos de AEA e 2-AG em pacientes com DP em relação à presença ou gravidade dos sintomas de ansiedade. Não encontramos associações entre os níveis plasmáticos desses eCBs com outros parâmetros clínicos da DP, com relação à todos os pacientes.

- Não foi encontrada diferença ou associações entre níveis de cortisol salivar noturno ou diurno entre os grupos com e sem ansiedade. Além disso, a maioria dos pacientes apresentou desregulação do eixo HPA medida pela perda de ritmo circadiano de cortisol salivar.

- Houve uma associação entre transtornos de ansiedade e aspectos clínicos da DP no grupo com ansiedade. Para duração e gravidade da DP, observamos associações com fobia social (SPIN) e ansiedade episódica (SR-PAS-B), respectivamente. Não foi encontrada associação entre LED com os transtornos de ansiedade.

Resumidamente concluímos que os dados apresentados evidenciam que determinados parâmetros clínicos da DP se associam a transtornos de ansiedade como fobia social e ansiedade episódica. Além disso, a dosagem plasmática de eCBs não foi alterada ou associada com os transtornos de ansiedade na DP. Entretanto, a maioria dos pacientes apresentou uma desregulação no ritmo circadiano do cortisol. Assim, é necessário uma investigação mais aprofundada quanto ao papel da disfunção circadiana em relação ao sistema eCB.

REFERÊNCIAS

Adermark, L.; Talani, G.; Lovinger, DM. Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the eCB changes in PD. *Eur J Neurosci*, v.29, p. 32–41, 2009.

Aguiar, D.C. et al. Modulation of defensive behavior by transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channels. *Neurosci Biobehav Rev.*, v.46, p. 418–28, 2014.

Ahn K, McKinney M.K., Cravatt B.F. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev*, v.108, p. 1687–1707, 2008.

Almeida, C.M.O. de; Pachito, D.V.; Sobreira-Neto, M.A.; Tumas, V.; Eckeli, A.L. Pharmacological treatment for REM sleep behavior disorder in Parkinson disease and related conditions: A scoping review. *J Neurol Sci.* v.15, n.393, p.63-68, 2018.

Amorim P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev Brasileira de Psiquiatria.* 22(3); 106-15, 2000.

Baggelaara, M.P.;Maccarrone M.; van der Stelt M. 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Progress in Lipid Research*, v. 71, p. 1–17, 2018.

Batista, L.A.; Bastos, J.R.; Moreira, F. A. Role of endocannabinoid signalling in the dorsolateral periaqueductal grey in the modulation of distinct panic-like responses. *Journal of Psychopharmacology*, p. 1–9, 2015.

Beaton, D.E.; Bombardier, C; Guillemin, F; Ferraz, M.B. Guidelines for the Process of Cross-Cultural Adaptation of Self-Report Measures. *Spine (Phila Pa 1976)*, v.25, n.24. p.3186–91,2000.

Beck, A.T. et al. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4- p. 561-571, 1961.

Beck, A.T.; Steer, R.A.; Brown, G.K. BDI-II: Beck Depression Inventory Manual. *Psychological Corporation.* 1996.

Beck, A.T., Epstein, N., Brown, G., & Steer, R. A. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 56(6), p.893-897, 1988.

Barden, N. Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci.*, v. 29, n.3, p. 185–193, 2004.

Bergamaschi, M. M. et al. Rimonabant effects on anxiety induced by simulated public speaking in healthy humans: A preliminary report. *Human Psychopharmacology*, 29(1), p. 94–99, 2014.

Blankman J.L.; Simon G.M.; Cravatt B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol.*, v. 14, p.1347–1356, 2007.

Bloom, A.S; Kiernan, C.J. Interaction of ambient temperature with the effects of Δ^9 - tetrahydrocannabinol on brain catecholamine synthesis and plasma corticosterone levels. *Psychopharmacol.*; v. 67, p. 215–219, 1980.

Bocharov, E.V.; Ivanova-Smolenskaya, I.A.; Poleshchuk, V.V.; Kucheryanu, V.G.; Il'enko. V.A, Bocharova, O.A. Therapeutic efficacy of the neuroprotective plant adaptogen in neurodegenerative disease (Parkinson's disease as an example). *Bull Exp Biol Med*, 149(6), p.682–684, 2010.

Boesveldt, S. et al. A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 23, p. 1984–1990, 2008.

Bortolato, M. et al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry.*, v. 62, n.10, p.1103-10, 2007.

Bosaipo, N. B. (2016). Do estresse precoce à depressão: avaliação da atividade do eixo HPA e da função cognitiva. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Bovolenta, T.M.; Felicio, A.C. How do demographic transitions and public health policies affect patients with Parkinson's disease in Brazil? *Clin Interv Aging*. 12, p.197-205, 2017.

Braak, H.; Ghebremedhin, E.; Rüb, U.; Bratzke, H.; Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology, *Cell Tissue Res*. 318: p. 121-134, 2004.

Breen, D.P. et al. Sleep and circadian rhythm regulation in early Parkinson disease. *JAMA Neurol*, v. 7, n.5, p. 589–595, 2014.

Bremmer, M.A. et al. Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *Biol Psychiatry*, v.62, n.5, 479–486, 2007.

Broen, M.P.G.; Narayen, N.E.; Kuijf, M.L.; Dissanayaka, N.N.W.; Leentjens, A.F.G. Prevalence of Anxiety in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov Disord.*, v. 31, n.8, p. 1125-1133, 2016.

Broen, M.P.G. et al. Clinical Markers of Anxiety Subtypes in Parkinson Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, v. 31, n.2, p. 55-62, 2018.

Brotchie, JM. CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol.*, n.3, p. 54–61, 2003.

Caille, S; Alvarez-Jaimes, L; Polis, I.; Stouffer, D.G.; Parsons L.H. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self administration. *J Neurosci*, v. 27, p.3695–3702, 2007.

Castro, M., Elias, P.C., Quidute, A.R., Halah, F.P.; Moreira, A.C. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, v. 84, p.878–882, 1999.

Castro, M., et al. Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz J Med Biol Res*, v.33, p.1171-1175, 2000.

Castro, M. Moreira, A.C. Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, v.51, p. 1191–1198, 2007.

Centonze, D.; Battistini, L.; Maccarrone, M. The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des*; v. 14, n.23, p. 2370-42, 2008.

Chida, Y.; Steptoe, A. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. *Biol. Psychol.*, v. 80, p. 265–278, 2009.

Cravatt, B.F., et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, v. 384, p. 83–87, 1996.

Christensen, R., et al. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a metaanalysis of randomised trials. *Lancet.*, 370, p. 1706—1713, 2007.

Cohen, M.J., Swanson, G.A., Naliboff, B.D., Schandler, S.L., McArthur, D.L., 1986. Comparison of electromyographic response patterns during posture and stress tasks in chronic low back pain patterns and control. *J. Psychosom. Res.* 30, 135-141.

Copinschi, G.; Turek, F.W.; Van Cauter, E. Endocrine rhythms, the sleep-wake cycle and biological clocks. In: Jameson LJ, DeGroot LJ, eds. *Endocrinology. 6th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders*; p. 199 –22, 2010.

Cote, M. et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)*, 31,p.692–699, 2007.

Cunha, J. A. Manual da versão em português das Escalas Beck. *São Paulo: Casa do Psicólogo*, 2001.

Devane, W. A., et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, n. 5090, p.1946–1949, 1992.

Di, S.; Malcher-Lopes, R.; Halmos, K.C.; Tasker, J.G. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.*, v.23, n. 12, 4850–4857, 2003.

DiMarzo, V. and Matias, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 585-589, 2005.

Dissanayaka, N.N.N.W. et al. Anxiety Disorders in Parkinson's Disease: Prevalence and Risk Factors. *Mov Disord*, v. 25, n. 7, p. 838-845, 2010.

Dissanayaka, N.N.N.W., et al. The Clinical Spectrum of Anxiety in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, v.29, n 8, p. 967-975, 2014.

Dissanayaka, N.N.N.W., et al. Disease specific anxiety symptomatology in Parkinson's disease. *Int Psychogeriatr.*; v.28, n.7, p.1153-1163, 2016.

Djamshidian, A., et al. Salivary cortisol levels in Parkinson's disease and its correlation to risk behaviour. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v.82, n. 10, p.1107–1111, 2011.

Djamshidian, A; Lees, A.J. Can stress trigger Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v.85, p.878–881, 2014.

Du, H.; Chen, X.; Zhang, J.; Chen, C. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2- arachidonoylglycerol is mediated via PPAR-gamma. *Br J Pharmacol* , v. 163, n.7, p.1533-49, 2011.

Duarte, J.O.; Planeta, C.S.; Crestani, C.C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.40, p.52-59, 2014.

Duglos, A.; Childs, E.; Stuhr, K.L.; Hillard, C.J.; Wit, H. Acute stress increases circulating anandamide and other N-acylethanolamines in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, p.2416–2427, 2012.

Dunlap, J.C., et al. Chronobiology biological timekeeping. Sunderland, MA, USA: Sinauer associates, Inc publishers, 405p, 2004.

Euroqol –a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy*, v. 16, n. 3, p.199-208, 1990.

Felger, J.C. Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. *Current Neuropsychopharmacology*, v.16, p.533-558, 2018.

Fernandez -Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol*;v.156, p.1029–1040, 2009.

Ferre, MS; Valenzuela, J.G.; Farfan, C.T. Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth defects research (part C)*, v.81, p. 204-214, 2007.

Ferre, S., et al. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology*, v. 56, p. 226–234, 2009.

Fowler, C.J. The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs - A practical view. *Eur Neuropsychopharmacol.*, v. 25, n. 6, p. 749-762, 2015.

Forjaz, M.J., et al. Rasch analysis of anxiety scales in Parkinson's disease. *J Psychosom Res*; v. 74, p.414-419, 2013.

Forjaz, MJ, et al. Is the Parkinson Anxiety Scale Comparable Across Raters? *Mov Disord*; Vol. 00, No. 00, p. 1-7, 2014.

Fullard, M.E.; Morley, J.F.; Duda, J.E. Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neurosci Bull.* , v. 33, n.5,515-525, 2017.

Garcia-Arencibia, M. et al. Cannabinoid CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. *J Neural Transm Suppl.*, v.73; p. 269–275, 2009.

García, M.C., et al. Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*; v. 587, p.1–4, 2015.

Garfias, S., et al. Fenotipos de linfocitos periféricos en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. *Neurología*. 2019.

Garlovsky, J.K.; Overton, P.G.; Simpson, J. Psychological predictors of anxiety and depression in Parkinson's disease: a systematic review. *J Clin Psychol.*, v.72, n.10, p. 979-998, 2016.

Gerdeman, G.; Lovinger, D.M. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol.*, v.85, p.468–471, 2001.

Glaser, S.T.; Gatley, S.J.; Gifford, A.N. Ex vivo imaging of fatty acid amide hydrolase activity and its inhibition in the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* v.316, p. 1088–1097, 2006.

Glass, M; Dragunow, M; Faull, R.L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience.*, v.77, p.299–318, 1997.

Goetz et al. MDS-UPDRS – versão em português. Grupo de Trabalho para Escalas de Avaliação em Doença de Parkinson, *Mov Disord*;18:738-750, 2003. Disponível em: <https://www.movementdisorders.org/MDS->

Files1/Education/RatingScales/MDSUPDRS_Portuguese_Official_Translation_FINAL.pdf

Goldstein, D. S. Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol.* v. 30, p. 1433–1440, 2010.

Gorzalka, B.B., Hill, M.N., Hillard, C.J. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev.*, v.32,p.1152—1160, 2008.

Gray, J.M., et al. Corticotropin-Releasing Hormone Drives Anandamide Hydrolysis in the Amygdala to Promote Anxiety. *The Journal of Neuroscience*,v. 35, n.9, p.3879 –3892, 2015.

Gruden, M.A., et al. Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J Neuroimmunol*, v. 233, n.(1–2), p.221–227, 2011.

Gubellini, P., et al. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: Implications for striatal glutamatergic transmission. *Journal of Neuroscience*, v.22, n.16, p. 6900-6907, 2002.

Gunduz-Cinar, O., et al. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol Psychiatry*, v.18, p.813–823, 2013.

Guindon, J.; Hohmann, A.G. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol* v.153, n.7, p. 1341-3, 2008.

Gusi, N.; Olivares, P. R.; Rajendram, R. The EQ-5D health-related quality of life questionnaire." *Handbook of Disease Burdens and Quality of Life Measures. Springer. New York*, p. 87-99, 2010..

Halliday, G. An evidence base for noradrenergic deficits in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, v. 27, p.1589-1591, 2012.

Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol*, v. 32, p.50–55, 1959.

Hanlon,E.C., et al. Circadian Rhythm of Circulating Levels of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *J Clin Endocrinol Metab.*, v. 100,n.1, p.220-6, 2015.

Hartmann, A., et al. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging*,v.18, p.285-289, 1997.

Hemmerle, A.M., Herman, J.P., Seroogy, K.B. Stress, depression and Parkinson's disease. *Exp Neurol.*; v.233, p.79-86, 2012..

Herkenham, M., et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat-brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.*, v. 11, p. 563–583, 1991.

Herkenham, M., et al. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, p 932–1936, 1990.

Herman, J.P., et al. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.*, v. 24, p.151–180, 2003.

Herman, J.P.; Seroogy, K. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Glucocorticoids, and Neurologic Disease. *Neurol Clin*, v. 24, p.461–481, 2006.

Herman, J.P. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci.* v.8, n.7, p.61, 2013.

Herrero, MT; Estrada, C; Maatouk, L.; Vyas, S. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. *Front Neuroanat.*; v.9, n. 32, 2015.

Hill, M.N., et al. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology.*, v.30, p. 508—515, 2005.

Hill, M.N.; Miller, G.E.; Ho, W.S.; Gorzalka, B.B.; Hillard, C.J. Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry*, v.4.1, p. 48–53, 2008.

Hill, M.N.; Gorzalka, B.B. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA*, v.301, p.1165—1166, 2009.

Hill, M.N., et al. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*, v.34, p.2733–2745, 2009.

Hill, M.N., et al. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci*, v. 30, p.14980–14986, 2010.

Hill, M.N., Hillard, C.J. and McEwen, B.S. Alterations in Corticolimbic Dendritic Morphology and Emotional Behavior in Cannabinoid CB1 Receptor--Deficient Mice Parallel the Effects of Chronic Stress. *Cerebral Cortex*, v.21, p.2056—2064, 2011.

Hill, M.N.;Tasker, J.G. Endocannabinoid Signaling, Glucocorticoid-Mediated Negative Feedback and Regulation of the HPA Axis. *Neuroscience*, v. 204: , p.5–16, 2012.

Hill, M.N., et al. Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with post-traumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks. *Psychoneuroendocrinology*, v.38, n.12, p. 2952–2961, 2013.

Hillard, C.J.; Weinlander, K.M.; Stuhr, K.L. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience*, 204: p. 207–299, 2012.

Hillard, C.J.; Beatka, M; Sarvaideo, J. Endocannabinoid Signaling and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Compr Physiol.* ; 7(1): 1–15, 2018.

Hillard, C.J., et al. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, v.43, p.155–172, 2018.

Hughes, A. J.; Daniel, S. E.; Kilford, L.; Lees, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v.55, n.3, p.181–184, 1992.

Hu,S.S.; Bradshaw, H.B; Chen, J.S.; Tan, B.; Walker, J.M. Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFkappaB activity. *Br J Pharmacol*, v. 153, n.7, p.1538-49, 2008.

Iranzo, A., et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *The Lancet Neurology*, v.5,n.7,p.572-7, 2006.

Jenkinson, C., et al. The PDQ-8: Development and validation of a short-form Parkinson's disease questionnaire. *Psychology and Health*, 12:6, 805-814, 1997.

Joëls, M.; Baram, T.Z. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, n.6, p.459–66, 2009.

Johnson, S.A.; Wang, J.F.; Sun, X.; McEwen, B.S.; Chattarji, S; Young, L.T. Lithium treatment prevents stress-induced dendritic remodeling in the rodent amygdala. *Neuroscience*. v.163, p. 34—39, 2009.

Kabia, FM, et al. The predictive value of cortisol levels on 2-year course of depression in older persons. *Psychoneuroendocrinology*, v.63, p.320–326, 2016.

Kano, M., et al. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, v.89, n.1, p. 309–380, 2009.

Kano O, et al. Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. *Parkinson's Dis.*, v.2011, 2011.

Keefe, K.A; Stricker, E.M.; Zigmond MJ, Abercrombie, E.D. Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: in vivo microdialysis studies. *Brain Res.*, v. 527, p. 350–353, 1990.

Kempster, P. A.; O'Sullivan, S. S.; Holton, J. L.; Revesz, T.; Lees, A. J. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain*, v. 133, p.1755–1762, 2010.

Kibel, A; Drenjančević-Perić, I. Impact of glucocorticoids and chronic stress on progression of Parkinson's disease. *Med Hypotheses*, v. 71, n. 6, p. 952–956, 2008.

Kish, S.J., et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease, *Brain*, v. 131, p. 120-131, 2008.

Kortekaas, R., et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of Neurology*, v.57, n.2, p. 176-9, 2005.

Kozak, K.R, et al. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, p. 33744– 33749, 2000.

Kummer, A., et al. Generalized anxiety disorder and the Hamilton Anxiety Rating Scale in Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr.*; v.68,n.4, p.495-501, 2010.

Lang, A.E., Espay, A.J. Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. *Mov Disord.* 00, p.1-18, 2018.

Lastres-Becker, I., et al. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci.*, v.14, p.1827–1832, 2001.

Lau, L.M.L.; Breteler, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, v. 5:, p. 525–535, 2006.

Leentjens, A.F., et al. Symptomatology and markers of anxiety disorders in Parkinson's disease: a cross-sectional study. *Mov Disord.*, v.26, n.3, p. 484-492, 2011a.

Leentjens, A.F.G., et al. Anxiety Rating Scales in Parkinson's Disease: A Validation Study of the Hamilton Anxiety Rating Scale, the Beck Anxiety

Inventory, and the Hospital Anxiety and Depression Scale. *Mov Disord* , v. 26, n. 3, 2011b.

Leentjens AFG et al. The Parkinson Anxiety Scale (PAS): Development and Validation of a New Anxiety Scale. *Mov Disord*, v.29, n.8,p. 1035-1043, 2014.

Leleu-Chavain, N; Desreumaux, P.; Chavatte, P; Millet, R. Therapeutical potential of CB(2) receptors in immune-related diseases. *Curr Mol Pharmacol*, v. 6,p.183–203, 2013.

Li, S.Y., et al. Long-term levodopa treatment accelerates the circadian rhythm dysfunction in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Chin Med J* , v.130, n.9, p.1085–1092, 2017.

Lisboa, S.F., et al. The Endocannabinoid System and Anxiety. *Vitam Horm.*, v.103, p.193-279, 2017.

Long, J.Z., et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *PNAS*, v. 106, n.48 p. 20270-20275, 2009.

Lupien, SJ. How to measure stress in humans. *Centre for Studies on Human Stress*. Fernand Seguin Research Centre of Louis-H. Lafontaine Hospital Quebec, Canada. 28 p, 2013.

Maccarrone, M., et al. Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *Journal of Neurochemistry*, v.85,n.4, p. 1018–1025, 2003.

Maccarrone, M., et al. Regulation by cannabinoid receptors of anandamide transport across the blood–brain barrier and through other endothelial cells. *Thromb Haemost*, v.95, p. 117–27, 2006.

Marakaki, C., et al. L-Dopa stimulates cortisol secretion through adrenocorticotrophic hormone release in short children. *Horm Res Paediatr*, v.84, n.5, p.319–322, 2015.

Marchioni, C., et al. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.409,n.14, p. 3587–3596, 2017.

Marchioni, C., et al. Recent advances in LC-MS/MS methods to determine endocannabinoids in biological samples: Application in neurodegenerative diseases. *Analytica Chimica Acta*, 2018.

Maresz, K., et al. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med*, v.13,p.492–497, 2007.

Marsicano, G., et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, v. 418, p.530–534, 2002.

Matias, I., et al. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.*; v.9, p.3171–3180, 2006.

Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature*, v. 346, p.561–564, 1990.

McEwen, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.*, v. 87, p.873–904, 2007.

McGeer, P.L.; Itagaki, S.; Boyes, B.E.; McGeer, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, v.38, p. 1285-91, 1988.

Mechoulam, R., et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90, 1995.

Meschler, J.P.; Howlett, A.C.; Madras, B.K. Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates. *Psychopharmacology (Berl)*. v.156,p.79–85, 2001.

Metz, G.A. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev Neurosci.*; v.18, p.209–222, 2007.

Mezey, E., et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci.*, v.97,p.3655–3660, 2000.

Moreira, F. A.; Crippa, J. A. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.31, n.2, p. 145–153, 2009.

Moreira, F.A. et al. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology*; v.54, p.141–150, 2008.

Morgan A, et al. Detection of cyclooxygenase-2-derived oxygenation products of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol in mouse brain. *ACS Chem Neurosci.*, v.9, n.7, p.1552–1559, 2018.

Mounsey, R.B., et al. Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 273, p. 36–44, 2015.

Müller, T.; Muhlack, S. Acute levodopa intake and associated cortisol decrease in patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol*, v.30, p.101–106, 2007.

Navab, et al. The oxidation hypothesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.*, v. 45, p.993-1007, 2004.

Negre-Pages, L., et al. Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectional DoPaMiP study. *Mov Disord.*, v. 25, n.2, p.157-166, 2010.

Nissen, S.E., et al. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*, v. 299, p.1547—1560, 2008.

Nussbaum, R.L.; Ellis, C.E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*, v. 348, p. 1356–1364, 2003.

Nuti, A., et al. Psychiatric comorbidity in a population of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol*, v.11, p.315-320, 2004.

Osório, F.L., et al. Inventário de Fobia Social (SPIN): validação para o Brasil. *Rev Bras Psiquiatr.*;26 Supl 2: S6, 2004.

Osório, F. L., Crippa, J. A.; Loureiro, S. R. Cross-cultural validation of the Brazilian Portuguese version of the Social Phobia Inventory (SPIN): Study of the items and internal consistency. *Rev Bras de Psiquiatr*, v.31, n.1, p.25-29, 2009.

Osório, F. L., Crippa, J. A., & Loureiro, S. R. Further psychometric study of the Beck Anxiety Inventory including factorial analysis and social anxiety disorder screening. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, v. 15, n.4, p.255-262, 2011.

Vilete, L., Coutinho, E.; Figueira, I. Confiabilidade da versão em Português do Inventário de Fobia Social (SPIN) entre adolescentes estudantes do Município do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n.1, p.89-99, 2004.

Pachana, N.A., et al. Clinical issues in the treatment of anxiety and depression in older adults with Parkinson's disease, *Mov Disord.*, v.28, p. 1930-1934, 2013.

Pagotto, U., et al. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids:

first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 86, p.2687-2696, 2001.

Pani, L.; Porcella, A.; Gessa, G.L. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Mol Psychiatry*, v.5,p.14–.21, 2000.

Panikashvili, D., et al. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, v. 413, n. 6855, p. 527–531, 2001.

Panikashvili, D., et al. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis.*, v.22,n.2, p.257-64, 2006.

Patel, S.; Hillard, C.J. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* 27: 2821–2829, 2008.

Patel, S., et al. Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, v.34, n.13, p. 2699–2709, 2009.

Patsenker, E, et al. Elevated levels of endocannabinoids in chronic hepatitis C may modulate cellular immune response and hepatic stellate cell activation. *Int J Mol Sci*, n. 16, p.7057–7076, 2015.

Pertwee, R.G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63:569 – 611, 2001.

Pisani, V. et al. Dynamic Changes of Anandamide in the Cerebrospinal Fluid of Parkinson's Disease Patients. *Mov Disord*, v. 25, n. 7, 2010.

Pisani, V., et al. Homeostatic Changes of the Endocannabinoid System in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, v. 26, n. 2, p. 216-222, 2011.

Prediger, R.D.S., et al. Anxiety in Parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies, *Neuropharmacology*, v.62, n.1, p.115 – 124, 2012.

Prewitt, C.M; Herman, J.P. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical regulation following lesions of the central nucleus of the amygdala. *Stress*, v.1, p.263, 1997.

Quarta,C., et al. Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels. *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, n. 9, p.518-526, 2011.

Rademacher, D.J., et al. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*, v. 54, n.1, p. 108–116, 2008.

Rasheed, N., et al. Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. *Neurochem Res.*, v. 35, p. 22–32, 2010.

Recalde D., et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerosis effects of chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* v. 24, p.756-761,2004.

Reich, C.G; Taylor, M.E.; McCarthy, M.M. Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. *Behav Brain Res.*, v.203, p.264—269, 2009.

Reijnders, J.S., et al. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, v 23, n.2, p.183-189, 2008.

Romero, E.M., et al. Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. *Brain Res Dev Brain Res.*; v.136, p. 85–92, 2002.

Ros-Bernal, F., et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, p.6632–6637, 2011.

Rossi, S., et al. Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci.*, v. 28, p. 7284—7292, 2008.

Rouzer, C. A., and Marnett, L. J. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem. Rev.* v. 111, p.5899– 5921, 2011.

Santangelo G et al. Anxiety in early Parkinson's disease: Validation of the Italian observer-rated version of the Parkinson Anxiety Scale (OR-PAS). *J Neurol Sci.*, v. 15, n.367, p. 158-161, 2016.

Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

Schapira, A.H.V; Chaudhuri, K.R, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* , v.18, n.7, p.435-450, 2017.

Schmidt A, Brune K, Hinz B. Determination of the endocannabinoid anandamide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, v.20, p.336–342, 2006.

Seifried, C., et al. Diurnal variation of hypothalamic function and chronic subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Neuroendocrinology* 97:283–290, 2013.

Shansky RM, Hamo C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. Stress induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. *Cereb Corte*, v.19, p.2479—2484, 2009.

Sheehan D, et al. The Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): The Development and Validation of a Structured Diagnostic Psychiatric Interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*, v. 59(suppl 20), p.22-33, 1998.

Signorello, M.G., et al. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol: role of PKC in NO/ cGMP pathway modulation. *Curr Neurovasc Res*, v.8, p.200–209, 2011.

Sinor, A.D.; Irvin, S.M.; Greenberg, DA. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, v.278, p.157-160 2000.

Soares, N.M., et al. Cortisol levels, motor, cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease: a systematic review. *Journal of Neural Transmission*, 14 p, 2018.

Soethoudt ,M., et al. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. *Nat Commun* 8: 13958, 2017.

Spoto, B; et al. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2- arachidonoylglycerol. *Biochimie*. 2006.

Starkstein, S.E., et al. Anxiety has specific syndromal profiles in parkinson disease: a data-driven approach. *Am J Geriatr Psychiatry*, v.22, n.12, p.1410-1417, 2014.

Starowicz, K; Nigam, S; Di Marzo, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther.*, v, 114,p.13–33, 2007.

Stella,N.; Schweitzer,P.; Piomelli,D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation, *Nature*, v.388, n.6644, p.773-778, 1997.

Storch, A. et al. Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications. *Neurology*, v. 80, p. 800–809, 2013.

Sugiura, T., et al. 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 215, p. 89–97, 1995.

Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. Version 3.5.2., 2013.

Tops, M., Montero Marín, J., Quirin, M. Setting limits to motivation: neural mechanisms of protective inhibition of motivation. In: Kim, S., Reeve, J., Bong, M. (Eds.), *Advances in Motivation and Achievement: Recent Developments in Neuroscience Research on Human Motivation*. Emerald Group Publishing, p. 263–299, 2016.

Varga, K; Wagner, JA; Bridgen, DT; Kunos, G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *Faseb J.* , v.12:p.1035–1044, 1998.

Videnovic, A.; Willis, G.L. Circadian system – a novel diagnostic and therapeutic target in Parkinson's disease? *Mov. Disord.*, v. 31, n. 3, p.260-269, 2016.

Vilela, L.H.M; Juruena, M.F. Avaliação do funcionamento do eixo HPA em deprimidos por meio de medidas basais: revisão sistemática da literatura e análise das metodologias utilizadas. *J Bras Psiquiatr.*, v.63, n.3, p.232-41, 2014.

Vreeburg, S.A., et al. Salivary cortisol levels in persons with and without different anxiety disorders. *Psychosom Med*, v.72, p.340-347, 2010.

Weis, F., et al. Substantially altered expression pattern of cannabinoid receptor 2 and activated endocannabinoid system in patients with severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 48, p.1187–1193, 2010.

Willoughby, KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* , v.282, p. 243–247, 1997.

World Health Organization (WHO) (2006) Neurological disorders: public health challenges. WHO Press, Geneva.

Yamanishi, T., et al. Anxiety and depression in patients with Parkinson's disease. *Intern Med*, v.52. p.539-545, 2013.

Ziegler, C.G., et al. Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Horm. Metab. Res.*, v.42, p.88-92, 2010.

Zigmond, A.S; Snaith, R.P. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*, v.67, p.361–370, 1983.

Zhang, J.; Chen, C. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation, *Journal of Biological Chemistry*, v.283, n.33, p. 22601-11, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA A GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

CARO PARTICIPANTE,

Vamos realizar um estudo para **validar uma escala de ansiedade e associar a ansiedade na doença de Parkinson com potenciais biomarcadores**. Este documento irá descrever o estudo. Por favor, leia com atenção. No final, o (a) pesquisador (a) irá perguntar se aceita participar. Se não se sentir totalmente esclarecido (a), sinta-se à vontade para tirar dúvidas com o pesquisador (a) presente. Se surgirem novas questões após a entrevista, poderá esclarecê-las entrando em contato com o (a) pesquisador (a) através dos contatos disponibilizados no final deste documento.

1. Qual é o objetivo do estudo?

O **objetivo do estudo** é a análise de endocanabinóides e cortisol para melhor compreendermos a relação dessas substâncias com a ansiedade e depressão na doença de Parkinson. Além disso, é necessário um avanço na maneira de se avaliar esses transtornos na DP, portanto iremos aplicar uma nova escala para ansiedade. O estudo tem a importância de ajudar o diagnóstico e possíveis tratamentos de sintomas não motores da doença de Parkinson e assim auxiliar na melhora da qualidade de vida.

2. Porque fui selecionado(a) para este estudo?

Foi selecionado(a) por ter diagnóstico de doença de Parkinson e não preencher os critérios de exclusão.

3. O que acontecerá neste estudo e o que me será pedido se participar? Será

realizada uma avaliação clínica onde será aplicada 7 escalas de avaliação clínica da doença de Parkinson de rápida aplicação (Unificada para Avaliação da DP (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale* - UPRDS) , escala de Hoehn & Yahr (H&Y), Questionário de Saúde EQ-5D, Escala de qualidade de vida no Parkinson (PDQ8), *Parkinson Anxiety Scale* (PAS – processo de validação), Inventários de Ansiedade e o de Depressão de Beck. Além disso, será solicitado ao paciente uma coleta de sangue (punção periférica) matinal em jejum de 8 horas e após desjejum (12h) e/ou coleta de

saliva por 2 dias consecutivos (3 coletas). As escalas e as coletas de sangue (em torno de 10 mL) serão realizadas em sala presente no ambulatório da Neurologia, 2º andar do Hospital das Clínicas da FMRP. Se consentir, as coletas de saliva iniciarão na sua residência e continuarão no HC (Informativo será entregue caso participe dessa coleta) e as amostras juntamente com a última coleta será entregue aos responsáveis no HC (Informado no anexo, nomes e contatos). Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório BIOMARCADORES ANSIEDADE PARKINSON criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de sangue (soro/plasma) e saliva para análise de levodopa, metabólitos e proteínas nestas amostras. Tanto o sangue quanto a saliva se coletados, serão guardados em freezer dos laboratórios participantes para análise de endocanabinóides e cortisol (saliva) até a análise e posterior descarte. Porém, se aceito, esse material biológico coletado ficará armazenado em biorrepositório, em freezer a -80°C no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (contato (16) 3315-3312). Poderá aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento. Solicitamos também os dados de contato do (a) Sr (a) para que seja possível encontrá-lo (a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo do seu material biológico. Também solicitaremos a sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado, como na ocorrência de problemas críticos no armazenamento das amostras ou perda de utilidade das mesmas.

Ao final, assinale qual opção gostaria de participar (estudo completo ou estudo parcial (apenas com a coleta de sangue ou saliva)).

4. Qual é a duração deste estudo?

Este estudo decorrerá durante aproximadamente 20 meses, embora Sr(a) só tenha de participar no estudo por no máximo dois dias (será 1 dia se apenas consentir com a coleta de sangue ou a validação da PAS sem participar da etapa de confiabilidade temporal)/ TCLE controle: (um segundo dia se participar da coleta de saliva). A sua avaliação terá a duração aproximada de 1 hora.

5. Quais são as vantagens em participar?

Ao participar neste estudo, estará contribuindo com dados que possam ajudar a esclarecer um assunto de importância clínica e científica. As substâncias a serem

quantificadas possuem um potencial a se tornarem biomarcadores de sintomas não motores da doença de Parkinson. Com um melhor conhecimento da ansiedade e depressão, tratamentos podem ser melhorados.

6. Quais são os desconfortos e riscos possíveis dessa pesquisa?

Certas escalas apresentam algumas perguntas que podem trazer determinados desconfortos, porém o (a) pesquisador (a) está habilitado (a) para perguntar de forma que minimize essa possível sensação. Além disso, algumas escalas serão apenas lidas (quando possível) pelo Sr (a) para evitar possíveis constrangimentos em relação a outras pessoas presentes (pesquisador (a) ou se for o caso, acompanhante que o Sr (a) gostaria da presença). Os riscos associados a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Já para a coleta de saliva, os desconfortos seriam relacionados ao leve desconforto da coleta, privação de alimentos e atividades (ex. fumo) para não interferir nas amostras.

7. Existe algum custo ou ressarcimento na minha participação?

A sua participação envolve o encargo financeiro de transporte até o hospital e não haverá formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa.

8. Como serão usados os meus dados?

A informação recolhida é estritamente confidencial, sendo o seu acesso restrito à equipe de investigação, será codificada e utilizada apenas neste estudo. A futura apresentação dos resultados do estudo respeitará a confidencialidade dos seus dados.

9. O que acontece se eu escolher não participar?

Se decidir não participar no estudo em nada será prejudicado em seu atendimento no hospital. Também pode desistir de participar no estudo a qualquer momento, antes, durante ou após a avaliação. Para tal, basta comunicar-nos a sua decisão (pessoalmente ou através do contato abaixo) e todos os seus dados pessoais e informação recolhida serão apagados.

10. Quem posso entrar em contato, caso queira esclarecer alguma dúvida?

Poderá contatar o coordenador do estudo, o Dr Vitor Tumas pelo telefone: (16) 36022548, (16)991357188 ou a doutoranda responsável, Jeane Vieira, pelo e-mail jeanevieira@usp.br. Também é possível esclarecer qualquer dúvida ética fazendo contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão

Preto através do telefone (16)3602-2228 ou pelo e-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br. Esse Comitê localiza-se no próprio Hospital no Campus Universitário, Ribeirão Preto (SP).

Outras informações relevantes

O estudo intitula-se “**TRADUÇÃO E VALIDAÇÃO DA ESCALA DE ANSIEDADE NO PARKINSON (*Parkinson Anxiety Scale* - PAS) PARA A LÍNGUA PORTUGUESA E ASSOCIAÇÃO DA ANSIEDADE NA DOENÇA DE PARKINSON COM POTENCIAIS BIOMARCADORES**” e foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da USP. Esse Comitê analisa o projeto e autoriza para que a pesquisa seja realizada. Além disso, acompanham a realização do estudo.

Direitos: -Direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios pelo tempo que for necessário, garantido pelo pesquisador responsável ainda que os riscos sejam considerados mínimos. (Itens II.3.1 e II.3.2, da Resolução CNS nº 466 de 2012)

- Garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, ainda que os riscos sejam considerados mínimos. (Item IV.3.h, da Resolução CNS nº 466 de 2012)

- Compromisso de receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar sua vontade de continuar participando.

- Compromisso de que será devidamente acompanhado e assistido durante todo o período do projeto. Também será garantido conhecer os resultados finais da pesquisa.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa o (a) Sr (a) será contatado para a utilização de seu material biológico armazenado nesse biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Todas as páginas desse termo deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal: Uma via para o Sr (a) participante e outra via para o pesquisador (a).

Agradecemos desde já a sua colaboração.

Recebido as informações acima e ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar.

Nome do (a) participante: _____

Assinatura do participante ou responsável: _____

Assinale qual opção gostaria de participar:

() AUTORIZO A GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (SANGUE/SALIVA)/

() NÃO AUTORIZO A GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (SANGUE/SALIVA)

() ESTUDO SEM COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

() ESTUDO COMPLETO (sangue + saliva) // () ESTUDO PARCIAL (sangue ()
ou saliva ()

Data: ____/____/ 201____

Nome do pesquisador (a) : _____

Assinatura do pesquisador (a) : _____ Data: ____/____/ 201____

ANEXO B - Autorização do autor da PAS original, Leentjens (Universidade de Maastricht).

PAS COPYRIGHT LICENSE AGREEMENT

This copyright license agreement ("Agreement") by and between the University of Maastricht ("Licensor") and the University of Sao Paulo ("Licensee") shall be effective upon full execution of this Agreement (the "Effective Date"). Licensor and Licensee are collectively hereinafter defined as (the "Parties" or individually as, a "Party").

WHEREAS, Licensor own all copyrights in the Parkinson's Disease Anxiety Scale (the "PAS");

WHEREAS, Licensee wishes to license certain of those rights in the PAS from Licensor and Licensor agrees to license such rights in the PAS to Licensee under the terms and conditions herein contained.

NOW THEREFORE, in consideration of the premises and mutual promises, terms and conditions set forth in this Agreement, and for other good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which the Parties acknowledge, Licensor and Licensee agree as follows:

1. License Grant and Scope. Subject to the restrictions set forth in this Agreement, Licensor hereby grants to Licensee a non-exclusive, worldwide, irrevocable right, privilege and license to use, reproduce, distribute and to make derivatives works of the PAS (the "License"). The derivative works permitted under this Agreement include, without limitation, the following translations: Portuguese (Brazilian). The copyright of such derivatives shall be the property of Licensor. The Parties agree that all results and data resulting from Licensee's administration and use of the PAS and any derivative works thereof pursuant to this License shall be the sole property of Licensee.
2. Representations and Warranties. Licensor represents and warrants that: (a) the terms of this Agreement are valid and binding obligations of Licensor, and are not inconsistent with any (i) any other contractual or legal obligation it may have; or (ii) the policies and procedures or the policies and procedures of any institution or company with which Licensor is associated; (b) Licensor is the copyright owner of the PAS and has the full right, power and authority to enter into this Agreement and grant the License to Licensee hereunder; (c) the PAS will not – to the best of its knowledge - contain libelous or unlawful statements, will not violate the rights or privacy or publicity of others, and will not contain material or instructions that might cause harm or injury to; (d) – to the best of its knowledge - will not violate or infringe upon any patent, copyright, trademark, trade secret, or any other intellectual property right of any third party; and (e) is licensed free from any security interest or other lien or encumbrance.
3. License Fee. Licensor advises that there is no charge to Licensee for the License granted hereunder. Licensor represents and warrants that the License granted hereunder is not in exchange for any explicit or implicit agreement or understanding for any good or services.
4. Copyright Notice. Licensee may use the PAS and any derivative works thereof and results in scientific presentations, posters, abstracts and publications, including the use of the PAS and derivatives in the Study, and for regulatory submission purposes. Licensee shall provide acknowledgement of this License in any Licensee managed publication (including posters, abstracts, and manuscripts and uses of the PAS and/or derivatives in the Study) that references the copyright as follows: "Leentjens AFG, Dujardin D, Pontone GM, Starkstein SE, Weintraub D, Martinez-Martin P. The Parkinson Anxiety Scale (PAS): development and validation of a new anxiety scale *Mov. Disord* 2014;29:1035-43. doi: 10.1002/mds.25919."
5. Assignment. Neither Party may assign this Agreement to any third party without prior written consent of the other Party, which consent shall not be unreasonably withheld, conditioned or delayed; provided, however, that upon prior written notice to Licensor, Licensee may assign this Agreement to

one of its wholly-owned subsidiaries or to any successor by merger, de-merger or sale of substantially all of the assets to which this Agreement relates without obtaining such consent.

6. Governing Law; Disputes. This Agreement will be construed, governed, and interpreted in accordance with Dutch law and any disputes regarding this Agreement will be settled under Dutch law.
7. Entire Agreement. This Agreement constitutes the entire understanding between the Parties of the subject matter covered by this Agreement. No modification or amendment of this Agreement shall be effective unless in writing and signed by duly authorized representatives of both Parties.

IN WITNESS WHEREOF, each of the parties has caused this Agreement to be executed by its authorized representative in its name and on its behalf.

The University of Sao Paulo.

The University of Maastricht

By:	Group leader	By:	The director of the School of Mental Health a Neurosciences
Name:	<u>Vitor Tumas</u>	Name:	<u>H. Steinbusch</u>
Title:	<u>Prof. Dr.</u>	Title:	<u>Prof. Dr.</u>
Date:	<u>30 September 2015</u>	Date:	<u>23 September 2015</u>

Leentjens A (NP) <a.leentjens@maastrichtuniversity.nl>
para eu ▾

15 de set de 2015 04:52 ☆ ↶ ⋮

🌐 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês ×

Dear Ms. Vieira, dear colleague,

Thank you for your interest in the PAS.

The copyright of the PAS is held by the authors. We generally do allow translation and use of the PAS in any language without any special conditions or charge. However, we do ask the other parties to sign a user agreement that regulates copyright and valorisation issues (to be signed by a representative of your institution). These include:

- a statement that the copyright of the translated version of the PAS will be held by the authors of the original PAS
 - a statement that the user may not charge third parties for use of the PAS
 - a statement that with every output (paper, poster, etc) there will be a reference to the original version of the PAS
- and some other formal statements. I will have our office adjust the user agreement to your request and send it to you. Once signed, you can proceed.

With best wishes,

Albert Leentjens

ANEXO C – Escala *Parkinson Anxiety Scale* versão brasileira.
Identificação do paciente: _____

Escala de Ansiedade na doença de Parkinson; versão em língua portuguesa falada no Brasil

A. Ansiedade persistente

Por favor, escolha uma resposta para cada item abaixo (colocando um “X” no espaço correspondente).

No último mês, até que ponto você sentiu os seguintes sintomas?

	Nem um pouco OU nunca	Muito pouco OU raramente	Pouco OU algumas vezes	Moderado OU frequentemente	Muito OU (praticamente) sempre
A.1. Sentiu-se ansioso ou nervoso					
A.2. Sentiu-se tenso ou estressado					
A.3. Sentiu-se incapaz de relaxar					
A.4. Sentiu-se muito preocupado com os problemas do dia-a-dia					
A.5. Sentiu-se com medo que algo ruim, ou mesmo o pior, fosse acontecer					

(CONTINUAÇÃO DO ANEXO C)**B. Crises de ansiedade**

Por favor, escolha uma resposta para cada item abaixo (colocando um “X” no espaço correspondente).

No último mês, você teve algum momento em que sentiu esses sintomas?

	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Praticamente sempre
B.1. Pânico ou medo intenso					
B.2. Falta de ar (respiração curta)					
B.3. Sensação de que o coração batia muito rápido (sem que você estivesse se exercitando ou fazendo alguma outra atividade física)					
B.4. Medo de perder o controle					

(CONCLUSÃO DO ANEXO C)**C. Comportamento de evitação**

Por favor, escolha uma resposta para cada item abaixo (colocando um “X” no espaço correspondente).

No último mês, até que ponto você sentiu medo das seguintes situações (ou evitou as seguintes situações)?

	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Praticamente sempre
C.1. Situações sociais (situações em que poderia ser observado ou avaliado por outras pessoas, como por exemplo, falar em público ou falar com uma pessoa desconhecida)					
C.2. Situações públicas (situações em que pode ser difícil para você escapar: estar numa fila, caminhar num chão que tenha linhas, estar num grupo de pessoas ou numa multidão, andar por uma ponte ou passarela, usar o transporte público)					
C.3. Objetos ou situações específicas (como voar de avião, estar em alturas, estar diante de aranhas ou outros animais que não goste, agulhas, sangue)					

ANEXO D – Instruções para coleta de saliva e folha de registro

INSTRUÇÕES PARA COLETA COM SALIVETTES

Como coletar as amostras de saliva:

1) Pegue o tubo salivette com o número apropriado e remova a tampa.

2) Insira o algodão na tampa do salivette conforme representado a seguir, e então, use o conjunto para posicionar o algodão em sua boca. **Não toque o algodão com suas mãos.**

Mastigue gentilmente o algodão, movendo-o por toda a boca, **durante 2 (dois) minutos**. Pode parecer muito tempo, mas é o necessário para o laboratório.

3) Remova o algodão da sua boca com a ajuda da tampa do salivette, sem tocar o algodão com os dedos. Pode ser mais fácil se você estiver se olhando em um espelho. A seguir, coloque o algodão no interior do tubo (conforme representado acima), sem tocá-lo com os dedos.

4) Posicione firmemente a tampa no salivette.

5) Guarde o tubo salivette na geladeira.

Instruções para a coleta de amostras de saliva

Por favor, no jantar não ingerir bebidas alcóolicas nem proteínas em excesso (ex.: churrasco). Evite exercícios físicos e situações de estresse durante o período das coletas.

1. Às 22h (dez da noite).

Caso faça uso de medicações, mantenha a sua rotina.

Em seguida, faça a coleta da saliva no tubo de Salivette marcado com o número 1.

Anote a hora exata da coleta na FOLHA DE REGISTRO fornecida pela pesquisadora.

**** Consulte a Folha “Instruções para Coleta com Salivettes” para obter detalhes de como realizar a coleta de saliva. ****

2. Ao chegar ao Hospital das Clínicas. Tubo Salivette número 2 (manhã). Esta amostra será coleta no hospital.

HORÁRIO: 7:30 h. DATA: a ser combinada.

LOCAL: Aguardar ser chamado (a) no BALCÃO 3 (amarelo) – ambulatório de Neurologia.

Você pode entregar esses materiais às seguintes pessoas do balcão 3:

Nayanne B. Bosaipo Psicóloga	Jeane Cristina F. Vieira Farmacêutica, pesquisadora	Ângela Pimentel Enfermeira
--	--	--------------------------------------

Se você tiver qualquer dúvida sobre essas instruções, por favor telefone à pesquisadora Jeane no celular fornecido (16) 98203-9449. **Obrigada pela sua participação.**

(CONCLUSÃO ANEXO D)

Nome: _____ Data: _____

FOLHA DE REGISTRO – COLETA DE SALIVA

Por favor, preencha a tabela abaixo com as informações referentes a cada amostra de saliva coletada.

Número do tubo	Amostra	Hora exata (coleta da amostra)	Se acidentalmente você vivenciou ou passou por alguma situação diferente do protocolo estabelecido, favor anotar abaixo.
<i>EXEMPLO1</i>	<i>Ex.: ao acordar</i>	6 h	Tomei café e fumei.
<i>EXEMPLO2</i>	<i>Ex.22 horas</i>	22h15	Briguei com meu esposo.
1	22 horas		
2	8 horas		