



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

*“Terapia Génica no tratamento da doença  
de Parkinson”*



**Albina de Jesus Ventura Fontes**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**Faro 2011**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# *“Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson”*



**Albina de Jesus Ventura Fontes**

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**Dissertação orientada por:** Sr.<sup>a</sup> Prof.<sup>a</sup> Doutora Vera Ribeiro Marques

**Faro 2011**

## *Agradecimentos*

Gostaria de agradecer....

...à Docente Vera Ribeiro Marques que esteve disponível para me ajudar.

...ao Mário Paulo e ao Filipe Costa pela leitura da dissertação.



## Índice

Índice de Figuras .....	iv
Índice de Quadros .....	vi
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	vii
Resumo e Palavras-chave .....	viii
Abstract and Key Words.....	ix
1. Introdução.....	1
2. A história da doença de Parkinson .....	1
2.1. Epidemiologia.....	2
2.2. Definição .....	3
2.3. Estruturas anatómicas e aspectos funcionais .....	3
2.4. Etiologia e fisiopatologia.....	6
2.5. Biossíntese da dopamina .....	8
2.6. Genética molecular da doença.....	9
2.7. Sintomas e sinais .....	13
2.8. Factores de prognóstico .....	15
2.9. Avaliação clínica e critérios de diagnóstico .....	16
2.10. Exames complementares .....	18
2.11. Tratamento e suas limitações.....	18
2.11.1. Tratamento farmacológico.....	19
2.11.2. Terapêutica cirúrgica .....	20
2.11.3. Terapêutica neuroprotectora .....	22
2.11.4. Outras terapêuticas .....	23
3. A Terapia Génica.....	23
3.1. Definição e fundamentos da Terapia Génica.....	24
3.1.1. Terapia <i>in vivo e ex vivo</i> .....	25
3.2. Vectores utilizados .....	26
3.2.1. Vectores virais .....	27
3.2.2. Vectores não virais .....	28
3.3. Aplicação da Terapia Génica em várias doenças .....	29
3.4. Implicações sociais e éticas .....	30
3.5. Factores e órgãos reguladores da Terapia Génica .....	31



3.6. Aspectos actuais da Terapia Génica .....	32
4. A Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson.....	33
4.1. A actuação da Terapia Génica ao nível do Sistema nervoso central ..	33
4.2. As razões para a utilização da Terapia Génica na doença de Parkinson .....	34
4.3. Estudos desenvolvidos em modelos animais e humanos.....	34
4.3.1. Terapia Génica de reposição enzimática .....	36
4.3.2. Terapia Génica na modulação do circuito dos gânglios basais	46
4.3.3. Terapia Génica neuroprotectora .....	52
4.3.4. Terapia Génica como estratégia de libertação contínua de L - Dopa. ....	61
4.3.5. Outras estratégias .....	63
4.4. Limitações e aprovação pela “ <i>Food and Drug Administration</i> ” ou pela “ <i>European Medicines Agency</i> ” .....	66
4.5. Perspectivas futuras da Terapia Génica na doença de Parkinson.....	66
5. Conclusão .....	67
6. Referências Bibliográficas.....	69



## Índice de Figuras

Figura 1: Corte transversal do cérebro, com a identificação das zonas do sistema extrapiramidal.....	4
Figura 2: Estruturas anatómicas e aspectos funcionais do sistema extrapiramidal.....	5
Figura 3: Esquema do processo de transmissão sináptica de um neurónio normal versus um neurónio de um indivíduo com doença de Parkinson.....	6
Figura 4: Representação esquemática da via nigroestriatal.....	7
Figura 5: Resumo esquemático dos mecanismos etiopatogénicos e interações das células dopaminérgicas na substância nigra, durante a doença de Parkinson.....	7
Figura 6: Ilustração de um indivíduo, com os principais sintomas da doença de Parkinson.....	14
Figura 7: Terapia Génica <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> .....	26
Figura 8: Uso de adenovírus na Terapia Génica.....	28
Figura 9: Gráfico dos vectores mais utilizados nos ensaios clínicos da Terapia Génica, no ano 2008.....	29
Figura 10: Aplicações da Terapia Génica em ensaios clínicos, no ano 2010..	30
Figura 11: Gráficos do número de ensaios clínicos desenvolvidos entre 1989-2010 e das fases dos ensaios clínicos de Terapia Génica no ano 2010..	32
Figura 12: Mecanismo de acção do 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. .	35
Figura 13: a) Síntese e neurotransmissão da dopamina num cérebro normal; b) Síntese de dopamina mediada pela L-Dopa ou levodopa. ....	36
Figura 14: Ilustração da Terapia Génica de reposição da dopamina, utilizando o gene da enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos. ....	37
Figura 15: Escala UPDRS total e no estadio motor III dos participantes do estudo na “ <i>baseline</i> ” e seis meses depois do tratamento para os estado “ <i>ON</i> ” e “ <i>OFF</i> ” .....	38
Figura 16: Tempo dispendido nos diferentes estados “ <i>ON</i> ” ou “ <i>OFF</i> ” no terceiro e sexto mês após a intervenção, em comparação com a “ <i>baseline</i> ”..	40
Figura 17: Gráfico de consumo de FMT no <i>putamen</i> , após um mês e seis meses da intervenção e imagem PET após seis meses em comparação com a “ <i>baseline</i> ”.....	41
Figura 18: Ilustração da Terapia Génica de reposição de dopamina, utilizando um vector lentivírus com os três genes das enzimas envolvidas na síntese de dopamina.....	42
Figura 19: Resultados da injeção do lentivírus (TH-DL-AA-GTPC1) em macacos tratados com MPTP, de forma a provocar efeitos parkinsonianos. ..	43

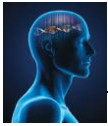


Figura 20: Análise <i>post-mortem</i> dos transgenes num cérebro normal [A, E e I], num cérebro contolo [B, F e J] e num cérebro com o vector lentivírus com os três genes (TH – [C]; DL-AA – [G]; e GTP-C1 – [K]).	44
Figura 21: Comparação das discinésias induzidas pelo tratamento com levodopa e com a Terapia Génica dos genes TH, DL-AA e GTP-C1, com o lentivírus.	45
Figura 22: Gráficos das melhorias motoras segundo a escala UPDRS para o estado “ON” e “OFF”, com tratamento total ou unilateral do núcleo subtalâmico de Luys	49
Figura 23: Mudanças na dose diária de fármacos dopaminérgicos.	51
Figura 24: Redução da actividade metabólica do tálamo após a Terapia Génica no núcleo subtalâmico.	51
Figura 25: Medições da rotação com apomorfina (A) ou amfetamina (B), em roedores com doença de Parkinson tratados com solução salina ou com lipossomas (THLs).	55
Figura 26: Actividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no lado do cérebro lesado em comparação com o não lesado, nos roedores tratados com solução salina ou lipossomas (THLs).	56
Figura 27: Relação dose – expressão de neurturina no <i>striatum</i> . Fotomicrografias da imunoreactividade de neurturina no caudado e no <i>putamen</i> .	57
Figura 28: Imunoreactividade da neurturina na substância nigra.	58
Figura 29: Imunoreactividade da enzima tirosina hidroxilase no <i>striatum</i> ...	59
Figura 30: Imunoreactividade da enzima tirosina hidroxilase na substância nigra.	60
Figura 31: Ilustração dos locais de acção, vectores e transgenes dos ensaios clínicos da Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson.	60
Figura 32: Terapia Génica de libertação contínua de L-Dopa.	61
Figura 33: Diagrama da estratégia de Terapia Génica mais adequada para o tratamento da doença de Parkinson.	63



## Índice de Quadros

Quadro 1: Resumo dos <i>locus</i> , genes, população afectada, para as formas hereditárias doença de Parkinson. ....	13
Quadro 2: Estados da doença de Parkinson, segundo Hoehn e Yahr. ....	15
Quadro 3: Critérios de diagnóstico, de exclusão e de suporte da doença de Parkinson .....	17
Quadro 4: Terapêutica sintomática oral e de libertação contínua, para o tratamento da doença de Parkinson. ....	20
Quadro 5: Possível terapêutica sintomática futura, para o tratamento da doença de Parkinson. ....	20
Quadro 6: Agentes neuroprotectores em estudo.....	23
Quadro 7: Metodologia geral da Terapia Génica. ....	25
Quadro 8: Requisitos ideais dos vectores para a Terapia Génica.....	27
Quadro 9: Resultados do ensaio segundo a escala UPDRS total e motora no estadio III, para os estados “ON” ou “OFF” dos doentes.....	39
Quadro 10: Valores do UPDRS nos estados “ON” e “OFF” .....	50



### **Lista de siglas**

- (Apaf1) factor de activação de protease apoptótica 1  
(ATP) trifosfato de adenosina  
(BDNF) “*brain derived neurotrophic factor*”  
(BH4) tetrahidrobiopterina  
(COMT) catecol-O-metil-transferase  
(CRS) “*Clinical rating scale*”  
(DL-AA) descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos  
(DNA) ácido desoxirribonucleico  
(DNAm) DNA mitocondrial  
(DOPAC) 3,4-diidroxifenilacético  
(DP) doença de Parkinson  
(DEAE) dextrano-dietilamina  
(ECP) Estimulação Cerebral Profunda  
(EMA) “*European Medicines Agency*”  
(FDA) *Food and Drug Administration*  
(FMT) [<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tirosina  
(GABA) ácido- $\gamma$ -aminobutírico  
(GAD) descarboxilase do ácido glutâmico  
(GDNF) “*glia cell line-derived neurotrophic factor*”  
(GTP-C1) guanosina trifosfato ciclohidrolase1  
(HVA) ácido 3 metoxi-4hidroxifenilacético  
(L-Dopa) L-dihidroxifenilalanina  
(LRRK2) “*leucine rich repeat kinase 2*”  
(MAO-B) monoaminaoxidase B  
(MAPT) “*microtubule associated protein Tau*”  
(MDS-UPDRS) “*Movement Disorder Society-sponsored UPDRS*”  
(MPDP<sup>+</sup>) 1-metil-2-fenil-2,3-dihidropiridinium  
(MPP<sup>+</sup>) 1-metil-4-fenilpiridinium  
(MPTP) 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
(NIH) “*National Institutes of Health*”  
(NTN) neurturina  
(6-OHDA) 6-hidroxidopamina  
(PET) Tomografia por emissão de positrões  
(PINK 1) “*PTEN-induced putative kinase 1*”  
(RM) Ressonância magnética  
(RNA) ácido ribonucleico  
(SCID-X1) “*Severe Combined Immune Deficiency*”  
(SN) substância nigra  
(S.N.C.) Sistema nervoso central  
(SPECT) Tomografia por emissão de fotão único  
(TC) Tomografia computadorizada  
(TG) Terapia Génica  
(TGF $\beta$ ) “*transforming growth factor  $\beta$* ”  
(TGG) Terapia Génica germinal  
(TGS) Terapia Génica somática  
(TH) tirosina hidroxilase  
(THLs) “*Trojan horse*” lipossomas  
(TVMA2) transportador vesicular de monoamina 2  
(UCH-L1) “*ubiquitin C-terminal hydrolase-1*”  
(UPDRS) “*Unified Parkinson’s Disease Rating Scale*”  
(AAV) vírus adeno-associados  
(EAIV) vírus equino baseado na anemia infecciosa  
(vg) vector-genoma

### **Lista de abreviaturas**

Fig. (Figura)

L-Dopa = levodopa



### **Resumo**

A presente dissertação aborda o tratamento da doença de Parkinson através da Terapia Génica.

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que manifesta-se principalmente na idade adulta.

Actualmente o tratamento convencional é farmacológico e sintomático ou por estimulação cerebral, no caso de perda de eficácia dos fármacos.

Os fármacos utilizados não curam, tem alguns efeitos adversos e acção terapêutica limitada. Como tal, é necessário investir em outras terapêuticas que evitem a progressão da doença ou mesmo possibilitem a cura.

A Terapia Génica foi considerada uma possível alternativa ao tratamento convencional, tendo sido estudada em modelos animais e muito recentemente foram realizados ensaios clínicos em seres humanos.

No entanto, nenhuma das estratégias e avanços desenvolvidos foram efectivos para o tratamento em seres humanos, pois apresentam várias limitações havendo a necessidade de estudos mais aprofundados.

A aplicação da Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson ainda não é possível mas pensa-se ser uma questão de tempo até os conhecimentos e métodos actuais evoluírem, para esta promissora terapia tornar-se uma realidade.

O Farmacêutico poderá ter de esclarecer dúvidas relativas a este tipo de abordagem num futuro próximo.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, Terapia Génica, Farmacologia, Ensaio clínicos, Fármacos, Novas terapêuticas



***Abstract***

This dissertation addresses the treatment of Parkinson's disease through gene therapy.

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disease that manifests itself mainly in adulthood.

Currently the standard treatment is symptomatic and pharmacological or through brain stimulation, in case of loss of drug efficacy.

The drugs normally used, do not cure, having some adverse effects and limited therapeutic action. As such, it is necessary to invest in other therapies that prevent disease progression or even cure the disease.

Gene therapy has been considered a possible alternative to conventional treatment, has been studied in animal models and recently trials have been performed on patients.

However, none of the strategies developed and advances were effective for the treatment in humans, since they have several limitations, with the need for further study.

Application of Gene Therapy in the treatment of Parkinson's disease is not yet possible but it is thought to be a matter of time before the current knowledge and methods, allow this promising therapy to become a reality.

The pharmacist may have to answer patients' questions related to this kind of approach in the near future.

***Key Words:*** Parkinson's disease, Gene Therapy, Pharmacology, Clinical trials, Drugs, New therapeutic



## **1. Introdução**

No âmbito da tese do mestrado, inserida no 5º ano curricular do curso Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, leccionado na Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade do Algarve, desenvolveu-se o seguinte tema: Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson.

A Terapia Génica (TG) é um tipo de tratamento inovador e actualmente sob investigação para a DP. Com este tema pretendeu-se abordar de modo geral e sumário, a utilização da TG no tratamento da doença de Parkinson (DP), caracterizando os seus mecanismos de acção, factores envolvidos, bem como a sua potencialidade futura.

O tema proposto é relevante na medida em que o número de pessoas com DP é elevado. A TG tem reunido vários esforços para prevenir ou mesmo encontrar a cura da doença.<sup>1,2,3</sup>

Os fármacos actualmente utilizados, para além de não curar a DP, tem vários efeitos adversos e uma acção terapêutica limitada. Deste modo, torna-se essencial investir noutras terapêuticas que possibilitem, não só, reduzir tais efeitos como melhorar a acção terapêutica e principalmente, que possam evitar a progressão da doença ou mesmo curá-la.<sup>1,4</sup>

A TG oferece perspectivas bastante promissoras quanto à sua aplicabilidade no tratamento da DP, embora com algumas dificuldades a superar, de modo a que possam ser implementadas de um modo seguro e eficaz. Existem várias questões legais, éticas e sociais associadas a esta terapia, sendo que para cada nova aplicação há que ponderar os benefícios e os riscos da mesma.<sup>5</sup>

O presente trabalho encontra-se organizado em sub-capítulos introdutórios de forma a caracterizar a DP e a TG. Apresenta posteriormente um capítulo de desenvolvimento, onde se aborda de forma específica a aplicação recente e as perspectivas da TG no tratamento da DP.

## **2. A história da doença de Parkinson**

A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, num estudo cujo nome se designou de “*An Essay on the Shaking Palsy*”, onde foram identificados os sintomas clínicos da doença. Quatro décadas após este estudo ter sido publicado, Jean-Martin Charcot referiu que a lista de sintomas descrita foi uma excelente caracterização da doença e assim designou o síndrome com o nome de doença de Parkinson. No entanto, Charcot



reconheceu formas não trémulas de DP e como tal, os termos movimentos fracos ou fraqueza muscular, descritos por James Parkinson, foram substituídos por movimentos lentos.<sup>1,6,7</sup>

Em 1919, verificou-se que nos indivíduos com DP manifestava-se uma perda celular ao nível da área do cérebro designada de substância nigra (SN). Mais tarde em 1957, foi descoberta a dopamina e a sua potencialidade como neurotransmissor, por Carlsson. Em 1960, Ehringer e Hornykiewicz, descobrem que a concentração de dopamina na região designada de *striatum* (área do cérebro que controla o movimento), se encontra diminuída nos indivíduos com DP.<sup>7</sup>

No ano 2000, Carlsson recebe o Prémio Nobel da Medicina, devido ao desenvolvimento do primeiro estudo acerca da potencialidade da levodopa em pessoas com de DP.<sup>7</sup>

## 2.1. Epidemiologia

A epidemiologia, associada aos parâmetros de incidência\* e prevalência†, tem desempenhado um importante papel tanto no planeamento dos cuidados de saúde como no estudo da etiologia das doenças.<sup>8</sup>

A maioria dos estudos epidemiológicos da DP expressa a sua ocorrência em termos de prevalência. Contudo, os valores de incidência são mais úteis para o estudo da etiologia da doença, uma vez que os dados de prevalência estão mais susceptíveis a enviesamentos na sua determinação por serem influenciados pela duração da própria doença.<sup>8</sup>

A incidência da DP por 100.000 habitantes é de 17.4 em idades compreendidas entre 50 e 59 anos. Por outro lado, entre os 70 e 79 anos de idade, a incidência sobe para 93.1 por 100.000 habitantes, com um risco de desenvolvimento de 1.5%.<sup>9</sup>

Mundialmente foi estimado que a prevalência da população com DP é de 6.3 milhões de habitantes, afectando todas as raças e culturas. Os dados disponíveis revelaram que 1.2 milhões de habitantes possuem DP na Europa, sendo que aproximadamente 260.000 na Alemanha, 200.000 em Itália, 150.000 em Espanha, 120.000 no Reino Unido e 117.000 em França. Na Europa ocidental a prevalência da doença estimou-se ser de 160 por 100.000 habitantes, correspondendo aproximadamente a 4% da população acima dos 80 anos de idade.<sup>3,10</sup>

---

\* **Incidência:** número de novos casos de uma doença diagnosticados num determinado intervalo de tempo e numa população de risco pré-definida.

† **Prevalência:** número de casos de doença diagnosticados num determinado momento e numa população pré-definida.



A DP afecta aproximadamente 1% da população mundial com idade superior a 65 anos, incluindo-se assim claramente no grupo de doenças associadas à idade. Dados de um outro estudo indicam que a prevalência aumenta 1% após os 65 anos e 4-5% após os 85 anos de idade. Assim, o envelhecimento da população foi reconhecido como um factor de risco para a DP.<sup>1,8</sup>

Não existe evidência científica significativa que demonstre que a doença esteja relacionada com a diferença de géneros (embora haja uma maior tendência no sexo masculino), raça ou etnia. No entanto, existe um consenso em que os valores de prevalência nas populações Caucásicas da Europa, América do Norte, Austrália e África são relativamente próximos e superiores aos verificados em populações negras africanas e populações asiáticas, sugerindo-se assim, que a população Caucásica corre um risco maior de sofrer DP.<sup>8,9</sup>

## 2.2. Definição

A DP pertence ao grupo de condições neurológicas designado por desordens do sistema motor. Trata-se de uma doença neurológica progressiva e degenerativa que afecta o Sistema nervoso central (S.N.C.) e causa perda do controlo dos movimentos.<sup>11,12,13</sup>

A doença é a forma mais comum de parkinsonismo, sendo este último termo definido como grupo de doenças que apresentam em comum os sintomas, característicos da doença, em combinações variáveis, associadas ou não a outras manifestações neurológicas. O parkinsonismo pode ser causado por outras doenças ou por factores externos como alguns fármacos (ex. neurolépticos e antipsicóticos). A DP é também conhecida como parkinsonismo primário ou doença de Parkinson idiopática.<sup>11,12</sup>

A DP pode-se dividir em três grupos, nomeadamente: a DP em adultos, considerada a forma mais comum, a partir dos 60 anos de idade; a DP em adultos jovens, atingindo as idades dos 21 aos 40 anos; e a DP juvenil, que é rara e surge antes dos 21 anos.<sup>2</sup>

## 2.3. Estruturas anatómicas e aspectos funcionais

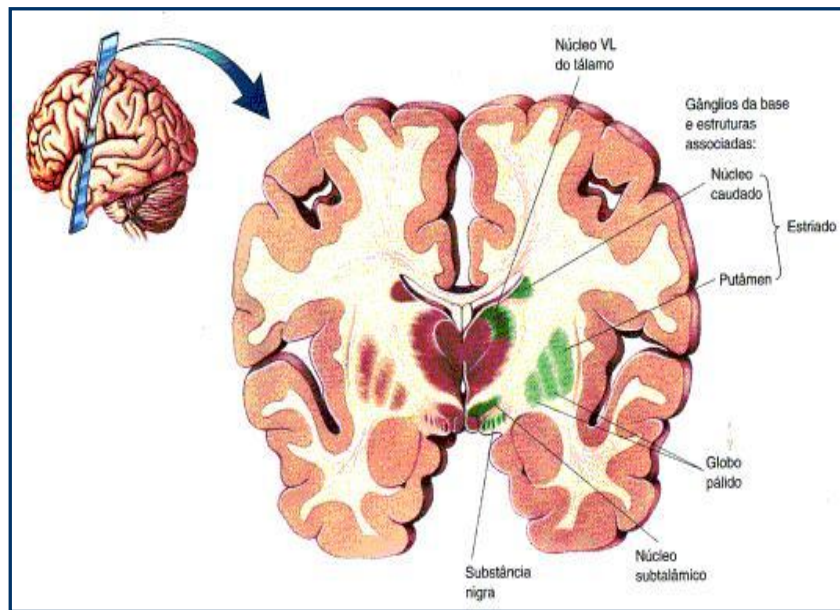
Os distúrbios de movimento, como o parkinsonismo, são englobados nos “síndromes extrapiramidais”.<sup>12</sup>

As principais estruturas anatómicas relacionadas ao sistema extrapiramidal são os gânglios da base, nomeadamente: núcleo lentiforme (*putamen e globo pálido*), núcleo caudado, SN



(*pars compacta* e *pars reticulata*) situada no mesencéfalo, e núcleo subtalâmico de Luys, como se pode observar na Fig. 1.

O *putamen* e o núcleo caudado podem ser incluídos numa unidade funcional denominada de neostriado ou *striatum*. O *globo*



**Figura 1:** Corte transversal do cérebro, com a identificação das zonas do sistema extrapiramidal. Fonte: (14).

*pálido* divide-se em dois segmentos: interno e externo. O conjunto destas estruturas forma um sistema que actua em simultâneo com o córtex cerebral, principalmente com as áreas motoras corticais.<sup>12,13</sup>

A principal via de entrada do sistema extrapiramidal é o *striatum*, onde se projectam as aferências provenientes do neocórtex (sobretudo o córtex motor e áreas associativas). As aferências corticais têm acção excitatória sobre o *striatum* e utilizam como neurotransmissor o glutamato.<sup>12,13</sup>

No *striatum* existe uma diferenciação acerca das conexões recebidas do núcleo caudado e do *putamen*, nomeadamente o primeiro recebe informação do córtex pré-frontal e áreas parietais e o segundo recebe maior informação do córtex sensório-motor. Assim, o núcleo caudado está envolvido em funções cognitivas enquanto que o *putamen* está envolvido exclusivamente com funções motoras.<sup>12,13</sup>

O *striatum* recebe também aferências da SN *pars compacta*, tendo como neurotransmissor a dopamina. Estas aferências têm efeitos diversos em diferentes subpopulações de neurónios estriatais. Desta forma, ao actuarem sobre os receptores dopaminérgicos D2 têm um efeito inibitório, pelo contrário se actuarem sobre os receptores dopaminérgicos D1 têm um efeito excitatório.<sup>12,13</sup>

Nas conexões intra-estriatais a acetilcolina é o neurotransmissor com papel relevante. A diminuição da produção de dopamina provoca um desequilíbrio entre esta e outros neurotransmissores, como a acetilcolina. Deste modo, na presença de baixas quantidades

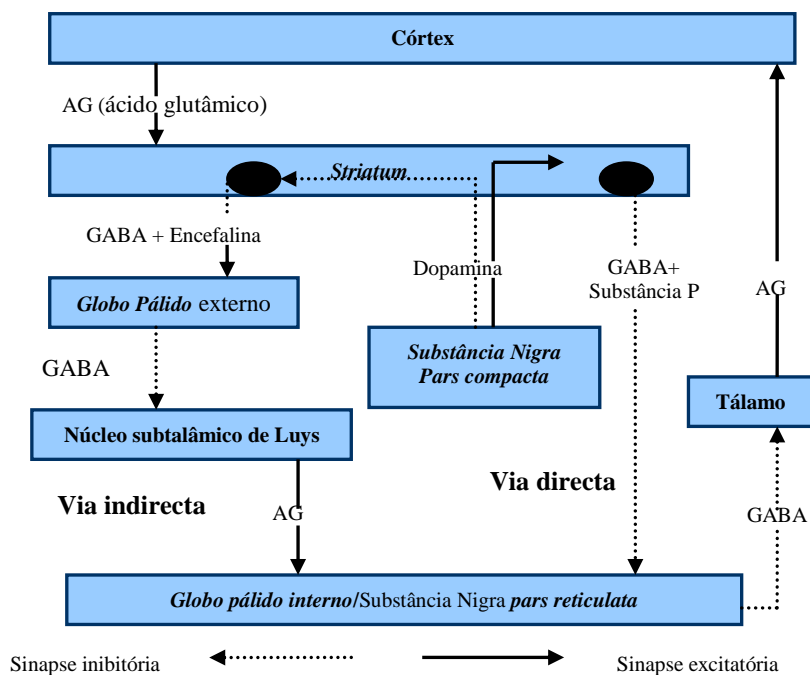


de dopamina, existe um estímulo de produção de acetilcolina e vice-versa. No entanto, o neurotransmissor ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que possui um efeito inibitório, tem um papel relevante nas aferências estriatais. Estas aferências destinam-se, na sua maior parte, ao *globo pálido* e em menor proporção à *SN pars reticulata*. Os neurónios estriatais gabaminérgicos que se projectam para o *globo pálido* externo utilizam também um neuropéptido, a encefalina, que actua como neuromodulador na transmissão sináptica. Por outro lado, os neurónios estriatais gabaminérgicos que se projectam para o *globo pálido* interno e a própria *SN pars reticulata* têm como neuromodulador a substância P.<sup>12,13</sup>

Se o *striatum* é o ponto-chave como via de entrada no circuito dos gânglios da base, o segmento interno do *globo pálido*, juntamente com a *SN pars reticulata*, constituem a via de saída do mesmo circuito. Entre a via de entrada e a via de saída existem duas vias de comunicação: a via directa e a via indirecta. Na via directa não existem conexões intermédias, no entanto, na via indirecta existem conexões ao nível do *globo pálido* externo e no núcleo subtalâmico de Luys, antes de atingir a via da saída.<sup>12,13</sup>

Na via indirecta as eferências inibitórias do segmento externo do *globo pálido* são mediadas pelo GABA e destinam-se ao núcleo subtalâmico de Luys, o qual envia mensagens excitatórias glutaminérgicas para o segmento interno do *globo pálido* e *SN pars reticulata*.<sup>12,13</sup>

A maior parte da informação proveniente da via de saída destina-se aos núcleos talâmicos ventral lateral e ventral anterior, dos quais as fibras partem com destino ao córtex pré-motor, área motora suplementar e córtex motor primário. As projecções que partem do *globo pálido* interno ou da *SN pars*



**Figura 2:** Estruturas anatómicas e aspectos funcionais do sistema extrapiramidal. Fonte: adaptado de (12).



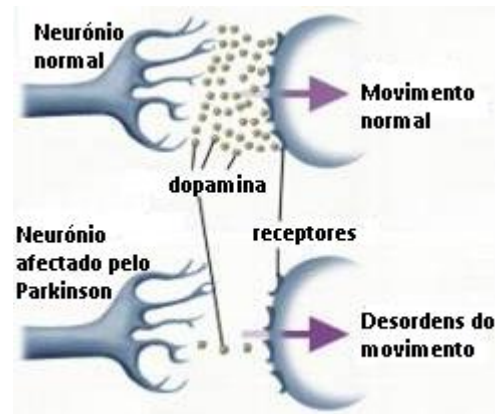
*reticulata*, que se destinam ao tálamo, são inibitórias e mediadas pelo GABA. Por outro lado, a via tálamo-cortical é excitatória, tendo como neurotransmissor o glutamato ou ácido glutâmico (Fig. 2).<sup>12</sup>

#### 2.4. Etiologia e fisiopatologia

A DP ocorre quando os neurónios na área do cérebro designada de mesencéfalo, mais precisamente na SN *pars compacta*, tornam-se deficientes ou morrem. Estes neurónios são responsáveis pela produção de uma substância química designada de dopamina, isto é, um neurotransmissor que envia sinais para as áreas do cérebro que controlam o movimento e a coordenação (tálamo, gânglios da base e córtex cerebral), como já referido anteriormente.<sup>1,10,11,13,15,16,17,18</sup>

Pensa-se que a progressão patofisiológica começa no núcleo dorsal do nervo vago e na região reticular da medula, atingindo no estadio mais avançado o S.N.C., na zona frontal, SN, mesocórtex e neocórtex.<sup>1,10,19</sup>

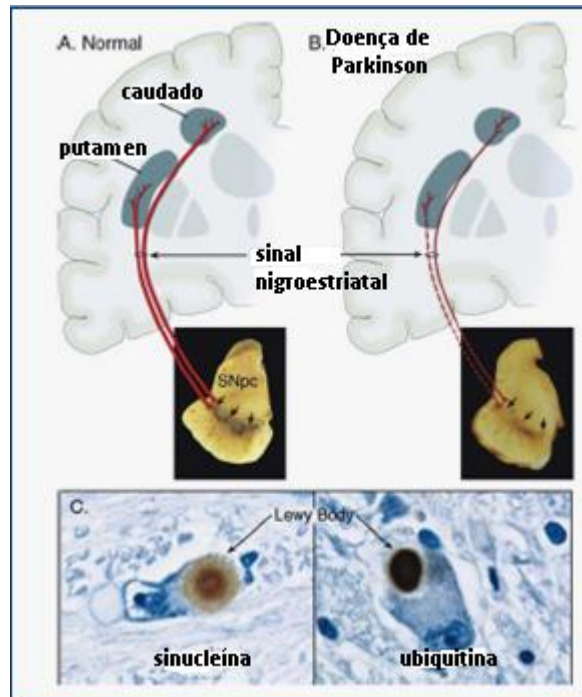
A deficiência em dopamina leva a que a transmissão de mensagens no cérebro, que indicam quando e como o corpo se movimenta, seja mais lenta, o que tem como consequência a perda da função muscular e a capacidade de controlar os movimentos, como se pode ver na Fig.3.<sup>13,18</sup>



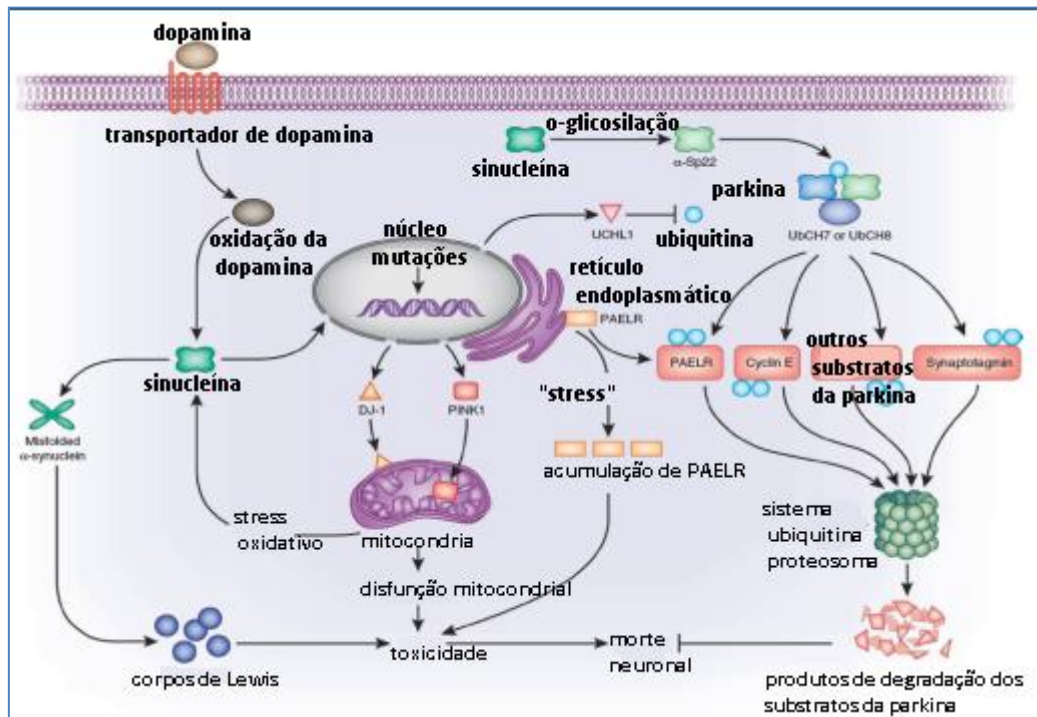
**Figura 3:** Esquema do processo de transmissão sináptica de um neurónio normal versus um neurónio de um indivíduo com doença de Parkinson. Fonte: adaptado de (20).

A perda dos neurónios é acompanhada pelo aparecimento de depósitos de proteína no citoplasma dos neurónios (corpos *Lewy* – corpos de inclusão, com carácter eosinofílico). Assim, os principais marcadores da doença são: a perda de dopamina ao nível da SN *pars compacta* e a presença destes corpos de inclusão citoplasmáticos, contendo da *α-sinucleína* e *ubiquitina* (Fig. 4).<sup>1,10,11,13,15,16</sup>

O sistema *ubiquitina-proteasoma* tem sido alvo de estudo devido ao seu papel na degradação proteica intracelular e no desencadear da morte neuronal. Alterações neste sistema podem levar à agregação de proteínas com alterações conformacionais, podendo potenciar a formação de corpos de *Lewy* (Fig. 5).<sup>17</sup>



**Figura 4:** Representação esquemática da via nigroestriatal (A) normal; (B) na doença de Parkinson; e (C) representação imunohistoquímica das inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) nos neurónios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta*. Fonte: adaptado de (17).



**Figura 5:** Resumo esquemático dos mecanismos etiopatogénicos e interações das células dopaminérgicas na substância nigra, durante a doença de Parkinson. **Abreviaturas:**  $\alpha$ -Sp22 – “22-kilodalton glycosylated form of  $\alpha$ -synuclein”; PAELR – “parkin-associated endothelin receptor-like receptor”; PINK-1 – “PTEN – induced putative kinase 1”; UbCH7 – “ubiquitin-conjugating enzyme 7”; UbCH8 – “ubiquitin-conjugating enzyme 8”; UCHL1 – “ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1”. Fonte: adaptado de (21).



Apesar da intensa investigação ao longo das últimas décadas, os mecanismos que levam à morte dos neurónios dopaminérgicos na SN dos doentes, não estão completamente esclarecidos, nem a causa da DP está perfeitamente esclarecida.<sup>1,8,11,16</sup>

Vários factores ambientais e genéticos têm sido associados a um aumento do risco para o desenvolvimento da doença, embora alguns ainda de uma forma não clara.<sup>1,8,11,16</sup>

A DP foi associada à exposição a agentes ambientais, incluindo toxinas, pesticidas (ex. rotenona), herbicidas (ex. paraquat) ou metais, não sendo, os resultados desses estudos considerados significativos.<sup>1,8,11,16</sup>

Ao nível celular, existem as hipóteses de uma diminuição da função mitocondrial, aumento do *stress* oxidativo, apoptose, excitotoxicidade e neuroinflamação.<sup>1,8,11,13,15</sup>

Alterações no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial podem contribuir para a degeneração celular neuronal, com o declínio na síntese de trifosfato de adenosina (ATP).<sup>11,13,17</sup>

A toxina mais conhecida associada à DP é a 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). A MPTP é capaz de induzir todos os sintomas motores da DP, permitindo assim criar o mais perfeito modelo experimental para a doença, através da inibição do complexo mitocondrial I.<sup>1,8,11,16</sup>

A teoria do *stress* oxidativo, processo bioquímico nocivo para os componentes da célula, surgiu devido ao facto do processo de síntese de dopamina conduzir a *stress* oxidativo nos neurónios presentes na SN e, conseqüentemente, desencadear o processo degenerativo.<sup>13</sup>

A teoria da excitotoxicidade defende que o aumento da actividade de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, devido à falta de dopamina, pode provocar um aumento da quantidade de cálcio dentro da célula o que pode desencadear processos bioquímicos que levam à morte celular.<sup>13</sup>

Desta forma, não só o fenótipo como a etiologia da DP é variável entre os doentes. Vários eventos celulares, como, a agregação de proteínas, a disfunção do sistema ubiquitina-proteasoma, a alteração mitocondrial ou o *stress* oxidativo, podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença.<sup>22</sup>

## 2.5. Biossíntese da dopamina

A dopamina é uma catecolamina sintetizada a partir da tirosina, nos terminais dos neurónios dopaminérgicos, sendo transportada activamente através da barreira hematoencefálica. Nessa síntese a tirosina é convertida a L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa)



ou levodopa, pela tirosina-hidroxilase (TH). A L-Dopa é rapidamente convertida em dopamina pela descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (DL-AA).<sup>13</sup>

A libertação de dopamina das terminações nervosas ocorre por exocitose das vesículas pré-sinápticas, um processo de despolarização que leva à entrada de cálcio. Uma vez na fenda sináptica as acções da dopamina podem ser interrompidas pela sua recaptação através de uma proteína de membrana transportadora. Alternativamente a dopamina pode ser degradada pelas enzimas monoaminoxidase B (MAO-B) e catecol-O-metil-transferase (COMT), resultando em dois produtos metabólicos: ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 3 metoxi-4hidroxifenilacético (HVA).<sup>13</sup>

## 2.6. Genética molecular da doença

Os principais factores de risco para a DP são a idade e a existência de história familiar. A causa da variabilidade na idade de início da DP e da velocidade variável de progressão da mesma, foi esclarecida de certa forma através da identificação de vários genes. Foram identificados vários modos de transmissão familiar, desde a forma autossómica dominante ou recessiva, à transmissão por via materna.<sup>8</sup>

Vários *locus* genéticos foram inicialmente associados à DP, designados de PARK-1 a PARK-10. Posteriormente, foram identificados os *locus* PARK-11, PARK-13, PARK-14 e PARK-15. Outro gene foi identificado recentemente, designado por proteína Tau associada aos microtúbulos (“*microtubule associated protein Tau*” (MAPT)).<sup>8,11,23,24</sup>

### ✚ PARK-1

O *locus* PARK-1 foi o primeiro a ser identificado, localizado no cromossoma 4q21-23. Esta região juntamente com o *locus* PARK-4 contêm o gene da  $\alpha$ -sinucleína, sendo que duas mutações neste gene estão relacionadas com uma forma autossómica dominante da DP. Esta forma da doença apresenta uma média de início de idade relativamente precoce (44 anos), apresentando uma progressão mais rápida do que as formas esporádicas e uma patologia característica de corpos de *Lewy*.<sup>8,11,25,26</sup>

A identificação das mutações neste gene que codifica para a  $\alpha$ -sinucleína na DP familiar, e o facto desta proteína ser um componente *major* dos corpos de *Lewy*, vieram chamar atenção para o papel da mesma. A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína de 140 aminoácidos, abundante no citoplasma dos neurónios, que parece ter um papel estabilizador das vesículas sinápticas dopaminérgicas. Por outro lado, esta mesma proteína mutada tem uma



velocidade de degradação lenta através do sistema *ubiquitina-proteosoma*, o que favorece a formação de agregados, levando à morte da célula, à alteração da libertação de dopamina e da função mitocondrial. Existem três mutações importantes desta proteína, nomeadamente, a A53T, a A30P e a E46K.<sup>8,11,24,25, 27</sup>

Descobriu-se que a DP pode ser causada por uma duplicação ou triplicação do gene normal da *α-sinucleína*.<sup>11,20,24,25,27</sup>

#### ✚ PARK-2

O PARK-2 foi o segundo *locus* a ser identificado e localiza-se no cromossoma 6q25-27. Este mesmo *locus* está associado ao gene da *parkina*, cujas mutações causam um parkinsonismo juvenil autossómico recessivo. A idade média de início da doença é de 32 anos e a progressão é lenta.<sup>8,20,24,25</sup>

A *parkina* é uma proteína de 465 aminoácidos, com função de ligase E3 no sistema da ubiquitina e, conseqüentemente, possui um papel importante na degradação de proteínas no proteasoma. As mutações na mesma estão associadas à perda da função ligase no proteasoma, o que leva à acumulação das proteínas que são substrato da enzima. Um desses substratos é a *α-sinucleína*. A *parkina* parece ser então importante no processamento metabólico.<sup>8,25</sup>

#### ✚ PARK-3

O *locus* dominante PARK-3 localiza-se no cromossoma 2p13, está associado a características esporádicas da DP.<sup>8,24</sup>

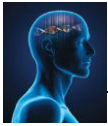
#### ✚ PARK-4

O *locus* PARK-4 localiza-se no cromossoma 4p15 e possui uma mutação que foi identificada numa única família em que o fenótipo clínico e patológico é semelhante à DP idiopática.<sup>8</sup>

Este *locus* contém uma parte do gene da *α-sinucleína*. A triplicação do mesmo neste *locus*, foi reportada numa família Norte-Americana de Iowa.<sup>21,25,22,28</sup>

#### ✚ PARK-5

O *locus* PARK-5 localiza-se no cromossoma 4p14 e está associado a uma mutação *missense*, em que a isoleucina é substituída por uma metionina na posição 93 da sequência



de aminoácidos da enzima “*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1*” (UCH-L1), pertencente à família hidrolase da ubiquitina, no proteasoma.<sup>8,24</sup>

Esta forma da DP é transmitida como autossómica dominante.<sup>8,24</sup>

#### ✚ PARK-6

O *locus* PARK-6 localiza-se no cromossoma 1p35-36, está associado uma forma recessiva de parkinsonismo, de início precoce, com resposta positiva à levodopa (pró-fármaco).<sup>8,24</sup>

O gene, “*PTEN-induced putative kinase 1*” (PINK 1), existente neste *locus* é autossómico recessivo e relaciona-se com a função mitocondrial. Mutações no mesmo gene podem levar à falência metabólica e à morte celular na SN. Este gene está associado ao parkinsonismo juvenil.<sup>10,11,24</sup>

#### ✚ PARK-7

O *locus* PARK-7 foi identificado no cromossoma 1p35-36, associado com a DP autossómica recessiva de início precoce (32 aos 48 anos), com progressão lenta e resposta positiva à levodopa.<sup>8,24</sup>

A mutação no gene DJ-1, presente neste locus, é autossómica recessiva. Este gene ajuda a regular a actividade de outros genes e a proteger as células do stress oxidativo, estando também relacionado com a função mitocondrial.<sup>11,24,25</sup>

#### ✚ PARK-8

O *locus* PARK-8 localiza-se no cromossoma 12, está associado à DP familiar ou esporádica e ao parkinsonismo de início tardio que responde à levodopa.<sup>8,10,24,26</sup>

O gene, “*leucine rich repeat kinase 2*” (LRRK2), presente neste *locus* está envolvido no metabolismo, tendo sido descobertas variantes do mesmo em famílias com DP. Uma das populações mais afectadas pela mutação deste gene é a Portuguesa, assim como a Espanhola e Inglesa. O gene codifica uma proteína, *dardarina*, que possui domínio GTPase ou cinase (domínio que pode ser inibido por inibidores clássicos, como o trastuzumab – anticorpo monoclonal).<sup>10,11,23,24,26,27</sup>

Em certos casos, detectou-se a presença de corpos de *Lewy*.<sup>10,11,23,24,26,27</sup>

#### ✚ PARK-9

No *locus* PARK-9 localiza-se o gene recessivo autossómico *ATP13A2*, característico da DP juvenil e que codifica uma enzima neuronal tipo ATPase lisossomal.<sup>24,25</sup>



#### **PARK-10**

O *locus* PARK-10 localiza-se no cromossoma 1p32 e está associado a DP idiopática.<sup>8,29</sup>

#### **PARK-11**

O *locus* PARK-11 localiza-se no cromossoma 2q, onde recentemente foi identificado o gene *GIGYF2*, contudo, a ligação à DP não está completamente definida.<sup>24</sup>

#### **PARK-13**

No *locus* PARK-13, as variantes do gene *OMI/HTRA2* foram recentemente associadas ao aumento de risco para a DP. Este gene codifica uma protease mitocondrial de serina com actividade pró-apoptótica, na região N-terminal. A mutação deste gene foi associada em alguns casos à presença de corpos de *Lewy*.<sup>23,24</sup>

#### **PARK-14**

No *locus* PARK-14 foi identificado o gene *PLA2G6*, autossómico recessivo característico da DP juvenil que codifica a enzima fosfolipase A2 grupo 6.<sup>24</sup>

#### **PARK-15**

O gene autossómico recessivo também característico da DP juvenil, *FBXO7*, localiza-se no *locus* PARK-15, embora a sua relação com a doença não esteja completamente definida. Tal como a *parkina* faz parte do sistema *ubiquitina-proteasoma*.<sup>24,25</sup>

#### **MAPT**

O gene *MAPT* está associado a um grupo de doenças neurodegenerativas hereditárias que, embora tenham aspectos clínicos e neuropatológicos distintos da DP, podem apresentar sinais e sintomas de parkinsonismo. Está relacionado com o cromossoma 17 e com depósitos patológicos de proteína *Tau*. Estudos recentes, indicaram também que pode existir relação entre este gene e a DP idiopática.<sup>8,23,25</sup>

O Quadro 1 resume a informação relativa aos genes associados à DP.

**Quadro 1:** Resumo dos *locus*, genes, população afectada, para as formas hereditárias da doença de Parkinson.

Locus	Gene	População afectada	Tipo de doença	Comentários
PARK-1	<i>α-sinucleína</i>	Italiana, Grega, Alemanha	DP, DCL	1º gene identificado; associado a corpos de <i>Lewy</i> ; Duplicações e triplicações do gene
PARK-2	<i>Parkina</i>	Global	DP juvenil	AR
PARK-3	<i>SPR?</i>	Norte-europeus	DP esporádica	Gene incerto
PARK-4	<i>α-sinucleína</i>	Norte-Americana (Iowa)	DP, DCL	Duplicações e triplicações do gene
PARK-5	<i>UCHL1</i>	Alemanha	DP	Gene incerto
PARK-6	<i>PINK1</i>	Italiana, Espanhola	DP juvenil	AR
PARK-7	<i>DJ-1</i>	Holandesa	DP	Raro
PARK-8	<i>LRRK2</i>	Alemanha, Italiana, Inglesa, Ibéricos, Americana, Norte-africana, Japonesa	Parkinsonismo	AD
PARK-9	<i>ATP13A2</i>	Jordania	DP juvenil	Mutações causam fenótipos complexos
PARK-10	-	Americana, Irlandesa	DP idiopática	-
PARK-11	<i>GIGYF2?</i>	-	DP, DCL	Gene incerto
PARK-13	<i>OMI/HTRA2</i>	-	DP	Patogenicidade não confirmada
PARK-14	<i>PLA2G6</i>	-	DP juvenil	Distrofia neuroaxonal
PARK-15	<i>FBXO7</i>	Persa, Italiana	DP juvenil	Plasticidade e demência
-	<i>MAPT</i>	-	DP	Outras doenças neurodegenerativas

**Abreviaturas:** DP – Doença de Parkinson; DCL – Demência com corpos de *Lewy*; AR – Autossómico recessivo; AD – Autossómico dominante. Fonte: adaptado de (8), (24) e (25).

## 2.7. Sintomas e sinais

A DP desenvolve-se de forma diferente para cada doente, o que significa que os doentes não apresentam necessariamente o mesmo conjunto de sintomas, estes podem progredir de forma diferente.<sup>30</sup>

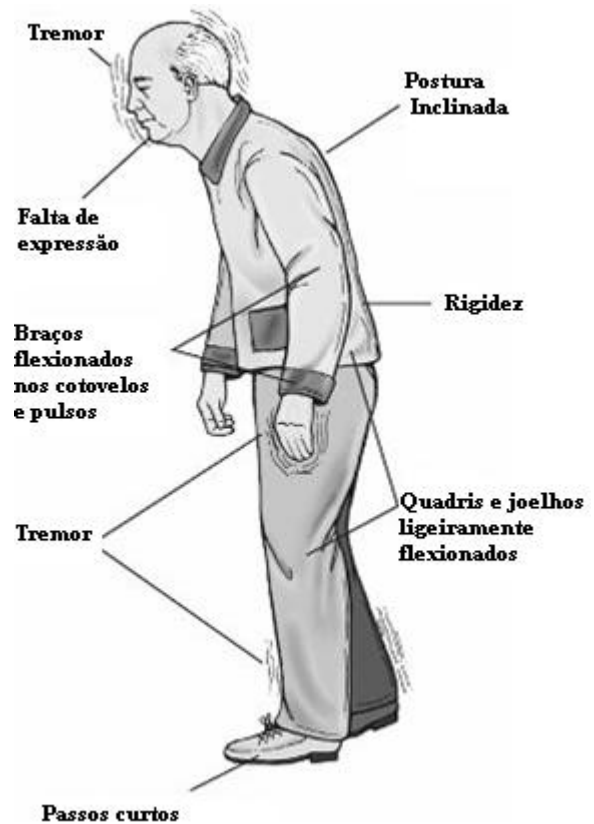
Os sintomas manifestam-se quando os doentes perdem cerca de 50% a 60% das células que produzem dopamina na SN do cérebro, iniciando-se de maneira subtil e aumentando gradualmente. A doença é crónica e progressiva, o que significa que a gravidade dos sintomas aumentam com o tempo.<sup>11,16,31</sup>



Os principais sintomas motores que descrevem a DP, são:

#### **✚ Tremor:**

Sintoma mais frequente que afecta os membros e, por vezes, a cabeça, a cara, o pescoço e os maxilares. Manifesta-se de um modo rítmico (quatro a seis ciclos por segundo), lento e ocorre quando os músculos estão relaxados, ou seja, quando o corpo está em repouso, diminuindo ou mesmo desaparecendo quando se inicia o movimento. Normalmente, durante o sono o tremor não se manifesta e aumenta com a ansiedade. Os membros superiores são os mais afectados, durante a marcha (Fig.6).<sup>7,11,16,31</sup>



**Figura 6:** Ilustração de um indivíduo, com os principais sintomas da doença de Parkinson. Fonte: adaptado de (32).

#### **✚ Rigidez:**

Os músculos tornam-se inflexíveis e resistentes ao movimento, permanecendo sempre tensos e contraídos.<sup>7,11,16,31</sup>

#### **✚ Bradicinesia e Acinesia:**

A bradicinesia caracteriza-se por movimentos lentos e incompletos, com paragens durante os mesmos. O termo acinesia significa dificuldade em iniciar movimentos, ou de ter reacção rápida, o que leva a uma redução gradual do movimento espontâneo e automático. Existe também uma redução da amplitude dos movimentos (hipocinesia).<sup>7,11,16,31</sup>

#### **✚ Instabilidade postural:**

Numa fase mais avançada da doença, ocorre falta de equilíbrio e de coordenação, o que leva a frequentes quedas. Os reflexos posturais compensatórios são comuns, aquando da mudança do centro da gravidade.<sup>7,11,16,31</sup>



Os sintomas não-motores secundários, que também podem acompanhar a DP são:

- ✚ Distúrbios da fala, perda de expressão facial, problemas de pele (muito oleosa ou muito seca), tonturas, dificuldade em engolir, xerostomia<sup>‡</sup>, dor por consequência da rigidez e de posturas anormais, confusão, demência, depressão (aparece numa fase inicial da doença e pode ser provocada pela falta de dopamina nas áreas do cérebro relacionadas com o prazer e com a disposição), mudanças emocionais (os doentes tornam-se inseguros), fadiga, apatia, distúrbios de sono, dificuldade de concentração, disfunção sexual, hipotensão ortostática, distonia muscular, problemas urinários e obstipação.<sup>7,11,10,16,31</sup>

Alguns sinais característicos da doença são a caligrafia tornar-se menos legível e o tamanho da letra reduzido (micrografia). Assim como, as actividades diárias que se realizam de forma rápida e fácil, passam a ser executadas com maior dificuldade, demorando horas.

## 2.8. Factores de prognóstico

A progressão dos sintomas pode levar vinte ou mais anos, no entanto em alguns indivíduos pode ser mais rápida. Embora seja difícil determinar a evolução da doença numa pessoa em particular, o sistema mais comum de descrever a progressão dos sintomas na DP é a escala de Hoehn e Yahr (Quadro 2).<sup>11</sup>

**Quadro 2:** Estados da doença de Parkinson, segundo Hoehn e Yahr.

Estados	Características
Estado 1	Sintomas num único lado do corpo
Estado 2	Sintomas em ambos os lados do corpo
Estado 3	Desequilíbrio, dependência física
Estado 4	Incapacidade severa, mas ainda é possível andar ou estar de pé sem ajuda
Estado 5	Forçado a estar numa cadeira de rodas ou numa cama, excepto se tiver ajuda

Fonte: adaptado de (11).

Outra escala utilizada é a “*Unified Parkinson’s Disease Rating Scale*” (UPDRS). No entanto, esta última escala é mais complicada, pois envolve um maior número de factores (funcionamento mental, comportamento e emoção; actividades diárias; características motoras; e complicações terapêuticas). Em 2008, esta escala foi adaptada como

<sup>‡</sup> **Xerostomia:** Secura de boca ou boca seca.



“*Movement Disorder Society-sponsored-UPDRS*” (MDS-UPDRS), completando-se com detalhes de avaliação dos sintomas não motores.<sup>11,31</sup>

## 2.9. Avaliação clínica e critérios de diagnóstico

A avaliação clínica inclui a anamnese<sup>§</sup> e o exame objectivo, visando o diagnóstico. A colheita de dados engloba: a idade actual e a idade de início da doença, a sintomatologia inicial, a história familiar de parkinsonismo ou DP e a própria história médica e farmacológica do doente.<sup>8,9</sup>

O diagnóstico clínico da DP é mais complexo do que foi considerado inicialmente por vários médicos. O tremor essencial é a entidade mais erradamente diagnosticada por parte dos médicos não especialistas. A DP pode ser também erradamente diagnosticada como depressão.<sup>3,8</sup>

A dificuldade de diagnóstico deve-se sobretudo à existência de numerosas patologias neurodegenerativas e outras doenças mais raras com características semelhantes à DP.<sup>8</sup> Uma outra área de erro de diagnóstico são as formas de parkinsonismo secundárias, causadas por consumo de fármacos neurolépticos e outros antidopaminérgicos, assim como enfartes ou hemorragias no sistema *nigro-striatum*, ou ainda encefalopatias arterioscleróticas. Portanto, terão de ser utilizados critérios de exclusão, de forma a diagnosticar correctamente a DP (Quadro 3).<sup>8,10</sup>

O exame clínico é a base do diagnóstico, sendo que a identificação do síndrome parkinsoniano é o primeiro passo. Assim, os mais importantes critérios de diagnóstico são: o início unilateral, o típico tremor de repouso e a resposta à levodopa (Quadro 3).<sup>8,16</sup>

O *score* do tremor na DP não está associado à idade do doente, ou idade do início ou duração da doença, mas sim, ao tremor de repouso. O tremor de repouso é mais comum na DP, do que no parkinsonismo associado às doenças neurodegenerativas.<sup>8</sup>

A rigidez é causada por um aumento involuntário do tónus muscular e afecta todos os músculos axiais, flexores e extensores, é também avaliada.<sup>8</sup>

Os testes de pronação das mãos e de bater com os calcanhares no solo, permitem avaliar a acinésia. A dificuldade de levantar-se de uma cadeira e até a redução do baloiçar dos braços, são expressões que permitem identificar a acinésia.

---

<sup>§</sup> **Anamnese:** História clínica do doente.



A bradicinésia, com a redução dos movimentos, movimentos mais lentos, também é um critério de diagnóstico bastante importante, senão o mais importante.<sup>8,9,10</sup>

**Quadro 3:** Critérios de diagnóstico, de exclusão e de suporte da doença de Parkinson.

<b>1ª etapa</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Bradicinésia; Com um dos seguintes: rigidez muscular, tremor, instabilidade postural.</b>
<b>2ª etapa</b>	<b>Critérios de exclusão da DP</b>	<b>História de AVC repetido, com progressão gradual dos sinais parkinsonianos; História de traumatismo craniano; História da encefalite; Crises oculares; Tratamentos com neurolépticos ou outros fármacos; Mais do que um parente afectado; Remissão sustentada; Características estritamente unilaterais após 3 anos; Paralisia supranuclear do olhar; Demência; Tumor cerebral; Resposta negativa a doses elevadas de levodopa; Exposição ao MPTP.</b>
<b>3ª etapa</b>	<b>Critérios positivos de suporte (necessários pelo menos 3)</b>	<b>Início unilateral; Tremor de repouso; Desordem progressiva; Presistente assimetria; Resposta excelente à levodopa; Resposta à levodopa durante 5 anos ou mais; Percurso clínico de 10 anos ou mais; Hiposmia (diminuição do olfato); Alucinações visuais.</b>

**Abreviaturas:** DP – Doença de Parkinson; AVC – Acidente vascular cerebral; MPTP– metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. Fonte: adaptado de (9).

A instabilidade postural é avaliada pelo teste do “empurrão” e na marcha. No teste do “empurrão”, o examinador coloca-se atrás do doente e puxa-o pelos ombros para trás. Se existir alteração dos reflexos posturais, o doente pode dar dois passos atrás e segurar-se ou mesmo cair, dependendo do grau de severidade da doença. Com a perda dos reflexos posturais, os doentes tendem a andar curvados e a surgirem quedas, especialmente na inversão do sentido de marcha. A marcha dos doentes parkinsonianos, também designada de



marcha frontal, caracteriza-se por hesitação inicial, passos curtos, arrastando os pés, de base não alargada.<sup>8</sup>

A resposta à levodopa é um dado essencial para o diagnóstico da DP, devendo ser assinalado que são raros os casos de doença que não respondam a esta terapêutica. São avaliados critérios como: as discinésias\*\* induzidas pela levodopa, a presença de flutuações motoras durante o dia, a existência de complicações psiquiátricas com o tratamento anti-parkinsoniano e presença de períodos de sonolência após as tomas.<sup>8</sup>

Conclui-se o exame clínico com a classificação do síndrome parkinsoniano motor e a quantificação da incapacidade motora global, através da escala de Hoehn e Yahr, anteriormente referida.<sup>8</sup>

### **2.10. Exames complementares**

De modo geral, não são necessários exames laboratoriais específicos na avaliação de doentes com DP idiopática, mas a Tomografia computadorizada (TC) e a Ressonância magnética (RM), e outros tantos exames podem ser necessários para excluir diferentes causas de parkinsonismo (tumor cerebral, exposição a fármacos, doença de Wilson ou Huntington, entre outras).<sup>8</sup>

Na área de imagiologia, destacam-se assim a TC, RM estrutural, a espectroscopia de RM, a Tomografia por emissão de positrões (PET) e a Tomografia por emissão de fóton único (SPECT), que utilizam biomarcadores específicos.<sup>8,31</sup>

### **2.11. Tratamento e suas limitações**

As terapêuticas utilizadas na actualidade são: o tratamento farmacológico e a estimulação cerebral.

Actualmente a DP não tem cura e desta forma, o tratamento disponível é o sintomático, sendo assim cada vez mais importante, a descoberta de terapêuticas que possam, não só, controlar os sintomas mas, também, inibir o processo de neurodegeneração e substituir os neurónios com danos.<sup>32,33,34</sup>

Na fase inicial da terapia, o ideal seria administrar substâncias que tivessem o papel de diminuir, inibir ou reverter o processo de degeneração dos neurónios. Contudo, não existe

---

\*\* **Discinésias:** movimentos involuntários. As discinésias são divididas em dois grupos: as do período “ON” (movimento do doente), caracterizadas por movimentos coreoatetóticos das extremidades e segmento cranial; e as do período “OFF” (estado acinésico do doente), caracterizadas por movimentos distónicos das extremidades e região axial.



nenhum fármaco que possa ser prescrito para esse efeito, embora algumas substâncias utilizadas apresentem um efeito de neuroprotecção leve (ex: selegilina).<sup>6,12,31</sup>

Nos primeiros três a cinco anos, a maioria dos doentes não apresenta uma incapacidade significativa, contudo, passado este período, ocorre em quase todos os doentes uma perda da eficácia da terapêutica. Ao fim de cinco a dez anos, começam a aparecer flutuações motoras e discinésias, o que obriga à alteração da estratégia terapêutica.<sup>3,8,18,34</sup>

Os principais tipos de flutuações motoras com o fármaco padrão, a levodopa são: a deterioração de final de dose (“*wearing-off*”), com necessidade de novas doses e as mudanças bruscas e imprevisíveis do estado de mobilidade do doente, enquanto este se movimenta ou quando este está parado (efeito “ON-OFF”).<sup>35</sup>

#### 2.11.1. Tratamento farmacológico

É importante salientar que a grande diferença entre a DP e outros parkinsonismos é a possibilidade de na doença, os sintomas poderem ser razoavelmente controlados com fármacos e no caso dos outros parkinsonismos os sintomas serem total ou parcialmente resistentes à terapêutica.<sup>31,32</sup>

O aparecimento de sintomas que levam ao desenvolvimento de uma incapacidade funcional, marca o início do tratamento sintomático. Este tem como objectivo o controlo e a melhoria de tais sintomas. Os sintomas, a idade, a fase da doença são alguns factores que se têm em consideração na escolha dos fármacos. A combinação de fármacos tem que ser ajustada à medida que a doença evolui.<sup>9,32,33</sup>

A maioria da terapia sintomática envolve ou tem por base a dopamina. Inclui fármacos precursores da dopamina, como a levodopa, ou agonistas directos do receptor da dopamina, como o pramipexol ou ropinirol. Outro tratamento sintomático, que previne o metabolismo da dopamina consiste na utilização de inibidores da COMT, como o etacapone ou inibidores da MAO-B, como a selegilina.<sup>34</sup>

Todas estas medidas farmacológicas sintomáticas apresentadas são as mais eficazes e ao mesmo tempo insatisfatórias, devido aos efeitos adversos que possuem e aos problemas farmacocinéticos e farmacodinâmicos (ex. dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica).<sup>1,4,34,36</sup>



As actuais e futuras medidas farmacológicas sintomáticas estão representadas no Quadro 4 e 5.

**Quadro 4:** Terapêutica sintomática oral e de libertação contínua, para o tratamento da doença de Parkinson.

Classes	Terapêutica oral	Terapêutica de libertação contínua
<b>Precursor da dopamina</b>	levodopa (pró-fármaco)+ Inibidor da descarboxilase dos aminoácidos (carbidopa ou benzerazida) ± Inibidor da COMT	Duodopa (levodopa+carbidopa gel intraduodenal)
<b>Agonistas dopaminérgicos</b>	bromocriptina; mesilato de di-hidroergocriptina; pergolida; cabergolina; piribedil; ropinirol; pramipexol	apomorfina (SC ou IV); <i>Lisuride</i> * (SC ou IV); rotigotina (penso transdérmico)
<b>Inibidores da MAO B</b>	rasagilina; selegilina	-
<b>Inibidores da COMT</b>	tolcapone; etacapone	-
<b>Anticolinérgicos</b>	biperideno; tri-hexifenidilo; prociclidina*	-
<b>Antiglutamatergicos</b>	Amantadina	-

**Abreviaturas:** COMT – catecol-O-metil-transferase; MAO B – monoaminoxidase B; SC – Subcutâneo; IV – Intravenoso; \*Não comercializado em Portugal; + Associação; ± Associação ou não. Fonte: adaptado de (18), (32) e (36).

**Quadro 5:** Possível terapêutica sintomática futura, para o tratamento da doença de Parkinson.

Terapêutica sintomática futura
<b>Agonistas parciais da dopamina</b> (ex: <i>pardoprunox</i> )
<b>Antagonistas da adenosina A2a</b> (ex: <i>istradefylline</i> e SYN115)
<b>Inibidor da MAO B, Antiglutamatergico e Bloqueador dos canais de sódio</b> (ex: <i>safinamide</i> )
<b>Inibidor da MAO B e Bloqueador da libertação de glutamato</b> (ex: <i>zonisamide</i> )
<b>Antagonistas mGluR5</b> (glutamato)
<b>Antagonistas dos <math>\alpha</math>-adrenoreceptores</b> (ex: <i>fipamexole</i> )
<b>Antagonistas do receptor do glutamato, AMPA</b> (ex: <i>perampanel</i> e <i>talampanel</i> )
<b>Agonistas parciais 5HT2A – agente serotoninérgico</b> (ex: <i>pimavanserin</i> )

**Abreviaturas:** AMPA - a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpro-prionato; MAO B – monoaminoxidase. Fonte: adaptado de (1), (18) e (37).

### 2.11.2. Terapêutica cirúrgica

O tratamento cirúrgico da DP, quase abandonado no final da década de sessenta do século XX, devido ao surgimento da levodopa, teve uma enorme expansão nos últimos anos.<sup>8</sup>

Devido às complicações e limitações do tratamento farmacológico e aos progressos de conhecimento sobre a fisiopatologia aliados às novas técnicas de neuroimagem (TC e RM), houve um interesse renovado pelo tratamento cirúrgico na DP.<sup>8,12</sup>



A cirurgia é um processo complexo, com risco não negligenciável, que requer um grande empenho dos familiares, doente e equipa médica. Estes factores tornam obrigatória a existência de critérios rigorosos que permitam seleccionar os doentes que obtenham maior benefício com a intervenção.<sup>8</sup>

A selecção dos doentes para cirurgia cumpre os critérios de diagnóstico para a DP. Os doentes devem ter pelo menos cinco anos de doença para permitir a exclusão de outras formas de parkinsonismo. Os critérios baseiam-se fundamentalmente na idade, na incapacidade provocada pela doença, na resposta à levodopa e na avaliação neuropsicológica.<sup>8</sup>

#### **Palidotomia e talamotomia**

As medidas cirúrgicas para diminuir o tremor e a rigidez na DP não são recentes. A observação de que as lesões palidais (no globo pálido) poderiam melhorar os sinais parkinsonianos, fez com que a palidotomia fosse muito utilizada.<sup>12</sup>

A talamotomia cujo alvo cirúrgico a destruir é o núcleo intermédio ventral do tálamo, foi considerada a cirurgia mais eficiente para a redução do tremor, mas com um índice de morbilidade a considerar.<sup>8,11,12</sup>

Estas medidas cirúrgicas foram descontinuadas devido às suas limitações e substituídas pela Estimulação Cerebral Profunda (ECP).<sup>4,11</sup>

#### **Estimulação Cerebral Profunda**

Outro avanço no tratamento neurocirúrgico foi a introdução da técnica da ECP, aprovada pela “*Food and Drug Administration*” (FDA). A ECP não impede a progressão da doença, mas reduz o tremor, a bradicinésia e a rigidez. É utilizada também para reduzir a necessidade de levodopa e outros fármacos, aliviando os sintomas de discinésias e de flutuações motoras.<sup>11,12</sup>

A ECP normalmente é realizada em estados mais avançados da doença, quando o efeito terapêutico dos fármacos já não é evidente, ou quando os efeitos adversos dos mesmos já não permitem o seu uso. Esta técnica consiste na implementação cirúrgica de um eléctrodo, numa parte do cérebro, estando este ligado a um aparelho electrónico, designado de gerador de impulsos, que se encontra implantado no tórax. Este gerador emite impulsos de frequência de aproximadamente 13Hz, tendo de ser substituído a cada cinco anos.<sup>11,12,16</sup>



Na DP o eléctrodo pode ser colocado em três regiões do cérebro: no núcleo subtalâmico de *Luis*, no glóbulo pálido ou no tálamo. A ECP nos dois primeiros, pode reduzir o tremor, a bradicinésia e a rigidez, enquanto que a estimulação no tálamo é usada, principalmente para reduzir o tremor.<sup>11,12</sup>

As desvantagens da ECP são o custo elevado, a necessidade de ajustes periódicos, as hemorragias, os enfartes, o risco de infecção e a mortalidade associada.<sup>4,12,16</sup>

Devido aos riscos deste procedimento, esta técnica só é utilizada em casos específicos.<sup>4</sup>

### 2.11.3. Terapêutica neuroprotectora

As terapêuticas que estão actualmente em estudo têm, não só, em vista o tratamento sintomático mas, principalmente, a cura da DP, impedindo a sua progressão neurodegenerativa e permitindo a substituição de neurónios com danos.

Cada potencial terapêutica neuroprotectora ou neuroregenerativa terá de demonstrar ter um impacto, nas incapacidades a longo prazo dos doentes, para ser aceite a sua utilidade clínica.<sup>8</sup>

Um grande número de moléculas foram propostas como potenciais agentes neuroprotectores para DP.<sup>18</sup>

Moléculas que reduzem a morte de células dopaminérgicas, incluem: os inibidores MAO-B (ex. selegilina e rasagilina); agentes anti-apoptose (ex. minociclina - inibidor da caspase, TCH346 e CEP-1347); antagonistas do glutamato (ex. riluzol – utilizado em doenças degenerativas); antioxidantes (ex. selénio, vitamina C e E, coenzima Q10); bloqueadores de canais de cálcio (ex. “*israpidine*”); nicotina (embora fumar não seja opção); factores de crescimento neurotróficos (ex. “*glia cell line-derived neurotrophic factor*”- GDNF); entre outras.<sup>1,4,18,27,29,38</sup>

Dentro destas moléculas, os factores neurotróficos, tem sido bastante estudados quanto às propriedades neuroprotectoras. Estes factores impedem a neurodegeneração da células e promovem a neuroregeneração. Os factores neurotróficos são proteínas que actuam directamente no desenvolvimento do sistema nervoso. Alguns factores actuam apenas numa fase do crescimento e outros actuam durante toda a vida. Várias famílias de factores neurotróficos foram estudadas, incluindo a família “*brain derived neurotrophic factor*” (BDNF) e “*transforming growth factor  $\beta$* ” (TGF $\beta$ ), uma superfamília que inclui a família GDNF.<sup>4</sup>



No entanto, a maioria das moléculas referidas não indicou definitivamente ter propriedades neuroprotectoras, nos ensaios clínicos. Tal indica ou a inefectividade de tais propriedades ou a presença de limitações, nomeadamente ao nível da dose ou da população em estudo.<sup>1,4,18,27,29,38</sup>

Os agentes neuroprotectores que estão a ser estudados estão representados no Quadro 6.

**Quadro 6:** Agentes neuroprotectores em estudo.

Fármacos e substâncias com propriedades neuroprotectoras – ainda em estudo
pramipexol – agonista da dopamina
coenzima Q10 – antioxidante e estimulador da cadeia respiratória
creatina – estimulador da síntese de ATP
polifenol (chá verde) – antioxidante
inosina – produtor de uratos
“israpidine” – bloqueador dos canais de cálcio
“cogane” – estimulador da síntese/GDNF, BDNF

**Abreviaturas:** ATP – trifosfato de adenosina; GDNF – “glial cell line-derived neurotrophic factor” e BDNF – “brain-derived neurotrophic factor”. Fonte: adaptado de (18).

#### 2.11.4. Outras terapêuticas

Outras terapêuticas que estão em estudo são: o transplante de células estaminais; a neurotransplantação, através de tecido adrenomedular e de tecido fetal do mesencéfalo (pouco eficaz); a inibição da agregação de  $\alpha$ -sinucleína, o uso de imunoterapia; e inibição do processo inflamatório, através da diminuição da neuroinflamação que acompanha a neurodegeneração.<sup>1,29</sup>

### 3. A Terapia Génica

A possibilidade de empregar a TG foi pela primeira vez discutida em 1970, sendo que no ano 2000 foi relatada a primeira cura por M. Cavazzana-Calvo, totalmente bem sucedida, na correção da doença “Severe Combined Immune Deficiency” (SCID-X1) em crianças. No entanto, nos anos 2002 e 2003, duas crianças desenvolveram leucemia causada quando o vírus utilizado activou um oncogene. Desde então, os ensaios clínicos de terapias genéticas têm sido encarados com algum receio e apreensão, pois apesar dos resultados promissores é necessário garantir a segurança e eficácia da terapia. Por esta razão a grande maioria destas técnicas encontra-se disponível apenas sob a forma de ensaios clínicos e



experimentais, não existindo ainda provas concretas do seu sucesso para aplicação da TG numa rotina clínica.<sup>5,39,40</sup>

No entanto, a possibilidade desta forma de tratamento através da introdução no corpo humano de material genético artificial obtido com o auxílio da biotecnologia, tem avançado à medida que aumenta o conhecimento no Projecto Genoma Humano, sobre os genes responsáveis por características normais e patológicas.<sup>41,42,43</sup>

### 3.1. Definição e fundamentos da Terapia Génica

A TG consiste na introdução, correcção ou inactivação de material genético, por forma a obter benefícios para o organismo. O conceito de TG, pode ser aplicado a qualquer procedimento terapêutico em que sequências nucleotídicas específicas são intencionalmente introduzidas ou modificadas em células ou tecidos humanos.<sup>39,41,42,43</sup>

A transferência génica é um termo que inclui todos os procedimentos que visam a entrada de material genético na forma de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou oligonucleótidos, em células alvo.<sup>39,41,42,43,44</sup>

Na TG pode ocorrer:

- ✚ correcção, quando ocorre a inserção de um gene funcional no local de um não funcional;
- ✚ inactivação ou “*knocking out*” de um gene mutado, que funciona de forma imprópria;
- ✚ adição, com a introdução de um gene ausente no genoma, que ajuda o organismo a combater a doença.<sup>42</sup>

Existem dois tipos de estratégias utilizadas na TG:

- ✚ **TG germinal** (TGG), caracteriza-se pela correcção da doença pela manipulação genética, em que é introduzido o material genético exógeno (gene), em células germinais, gâmetas ou óvulos fertilizados (zigotos). O gene inserido será assim transmitido às gerações futuras. Tal correcção pode passar tanto para células somáticas como para células germinais, das gerações futuras, durante a embriogénese. Contudo, a TGG não é aplicada em doenças genéticas no Homem, devido a questões éticas, pois poderiam ocorrer erros genéticos na descendência.<sup>5,39,42,45</sup>



✚ **TG somática** (TGS), caracteriza-se pela correcção da doença na qual um gene é inserido, corrigido ou inactivado, em qualquer célula somática (ex. células hematopoiéticas) que sofra ou não divisão celular ao longo da vida do organismo. Na TGS o gene inserido não é transmitido às gerações futuras. Devido a questões legais e éticas, os protocolos são efectuados somente com este tipo de terapia e de forma controlada.<sup>5,39,45,46</sup>

As metodologias associadas à TG incluem métodos de isolamento de genes celulares (clonagem), manipulação (engenharia genética) e transferência para células humanas.<sup>39,45,46</sup> A metodologia da TG resume-se aos passos referidos no Quadro 7.

**Quadro 7:** Metodologia geral da Terapia Génica.

Metodologia geral da Terapia Génica
1. Caracterizar etiofisiologicamente a doença (conhecer o gene implicado na doença ou cuja expressão pode modificar a doença).
2. Isolar o(s) gene(s) em questão.
3. Escolher o sistema de vectores para a distribuição ou transferência génica.
4. Inserir o(s) gene(s) de interesse no sistema de vectores.
5. Administrar o sistema de vectores na célula hospedeira num sítio cromossómico adequado.
6. Medir a expressão do(s) gene(s).
7. Vigiar.
8. Readministrar o(s) gene(s) se necessário.

Fonte: adaptado de (39), (47) e (48).

### 3.1.1. Terapia *in vivo* e *ex vivo*

O aporte do material genético pode ser feito de duas formas:

✚ ***in vivo***, ocorre transferência do gene e vector directamente para as células do indivíduo por via sistémica ou via injeção *in situ* (directamente no tecido alvo), sem extracção ou manipulação *in vitro*. Este método é mais sensível mas tem desvantagens, nomeadamente: tem um menor grau de controlo de transferência, é menos eficiente a nível global (uma vez que não pode amplificar as células já com o transgene) e é difícil alcançar um elevado grau de especificidade tecidual. No entanto, este método evita os problemas de reintrodução do número adequado de células, uma vez que é feito num local do organismo compatível e eficaz.<sup>5,45,47</sup>



✚ *ex vivo*, indirectamente, pela remoção de tecido do indivíduo seguida da introdução do transgene nas células em culturas *in vitro* e que depois de expressarem a proteína ou fenótipo pretendido são administradas a fim de corrigir a desordem genética. As células são reintroduzidas por injeção. As principais vantagens deste método são permitir seleccionar o tipo de células a tratar e a maior eficácia do processo (Fig. 7).<sup>5,45,46,47</sup>

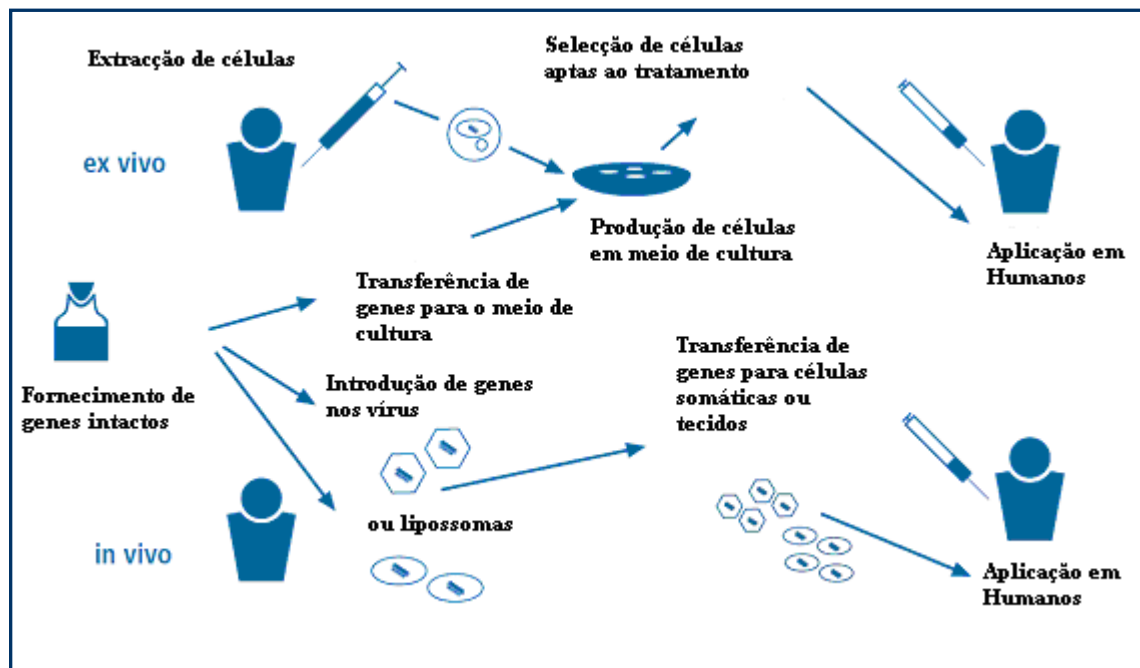


Figura 7: Terapia Génica *in vivo* e *ex vivo*. Fonte: adaptado de (49).

### 3.2. Vectores utilizados

O veículo de transferência e de transporte usado para conduzir para dentro das células alvo o material genético, contido numa molécula de DNA ou de RNA juntamente com outros elementos genéticos para a sua manutenção e expressão, é denominado de vector. O objectivo do vector é conduzir o DNA terapêutico até ao núcleo das células alvo, onde é descodificado a fim de produzir a proteína terapêutica, ou a entrega de RNA directamente no citoplasma das células. Contudo, o RNA é mais instável que o DNA, o que é um factor limitante ao seu uso. Recentemente, surgiu o uso de DNA mitocondrial (DNAm) em vectores genéticos citoplasmáticos, cuja aplicação potencial é a reposição do mesmo em células com deficiência no metabolismo energético.<sup>41,43,45,46</sup>



Um dos aspectos mais importantes na TG é a pesquisa de um vector que seja seguro e confiável. Apesar deste sistema ainda não existir, o objectivo é a aproximação a um vector ideal. Assim, para que a terapia seja efectiva estes vectores devem possuir idealmente os requisitos do Quadro 8.<sup>43</sup>

**Quadro 8:** Requisitos ideais dos vectores para a Terapia Génica.

Requisitos ideais dos vectores
Permitir inserir no vector uma grande quantidade de transgene numa forma concentrada;
Serem de fácil produção, manipulação e a baixo custo;
Terem capacidade de se dirigir e actuar selectivamente nas células alvo;
Não permitem a replicação autónoma;
Permitir uma expressão génica a longo prazo (com regulação correcta da transcrição e tradução);
Não terem toxicidade e imunogenicidade.

Fonte: adaptado de (43).

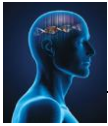
Existem dois tipos fundamentais de vectores: vectores virais e vectores não virais.<sup>41,43</sup>

### 3.2.1. Vectores virais

Actualmente, os vírus continuam a ser a forma mais eficaz de transferência de genes terapêuticos pela TG.<sup>45</sup>

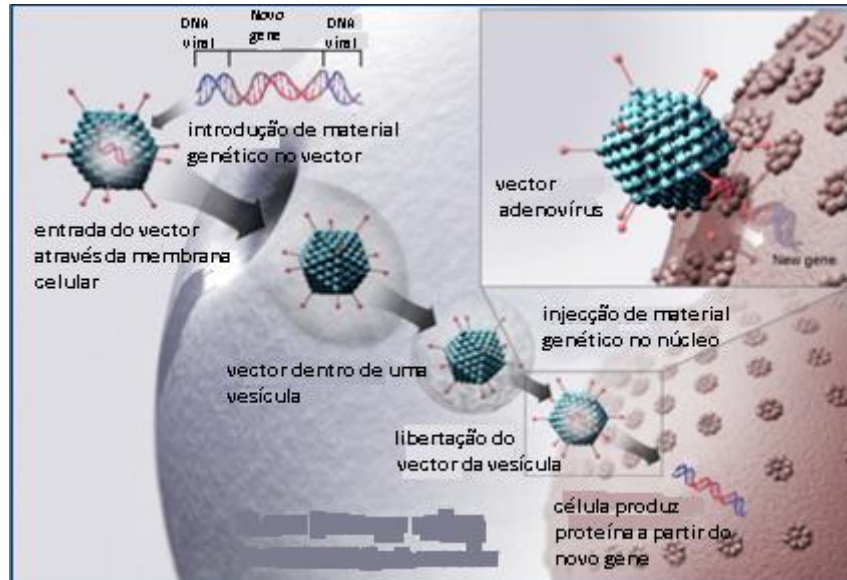
Para que os vectores virais sejam úteis é necessário que algumas funções virais sejam alteradas por técnicas de engenharia genética, como por exemplo a replicação do vírus não deve acontecer, de modo a poder-se prevenir a proliferação incontrollada do transgene e a formação de agentes patogénicos. Assim, estes vectores virais recombinantes e não competentes para a replicação viral, mantêm ainda a capacidade de um ciclo de infecção e de expressar no interior do hospedeiro, genes que lhes estão associados (genes terapêuticos). Exemplos destes vectores incluem: adenovírus, vírus adeno-associados (AAV) (ex. parvovírus), retrovírus, HIV (lentivírus- família dos retrovírus), poxvírus e vírus *vaccinia*, vírus Herpes-simplex, vírus da Hepatite B e vírus Influenza.<sup>41,45,50</sup>

Existem duas categorias gerais, em que os vectores virais podem ser divididos, nomeadamente, os que integram o seu material genético no genoma do hospedeiro e os que não o fazem. Os retrovírus e lentivírus são os únicos vírus com capacidade de se integrar. Os adenovírus não se integram no genoma do hospedeiro, o que diminui a possibilidade de interferirem com genes vitais da célula hospedeira (Fig. 8).<sup>41,42</sup>



Os adenovírus e lentivírus têm a capacidade de infectar diferentes tipos de células e são capazes de transferir genes para células que não se encontrem em divisão.<sup>41,42</sup>

Actualmente, os vírus são os vectores mais utilizados para a maioria das estratégias de TGS.<sup>34,36</sup>



**Figura 8:** Uso de adenovírus na Terapia Génica. Fonte: adaptado de (42).

### 3.2.2. Vectores não virais

Os métodos de transferência génica não virais são divididos em duas categorias: métodos físicos ou mecânicos e métodos químicos.<sup>41,43,46</sup>

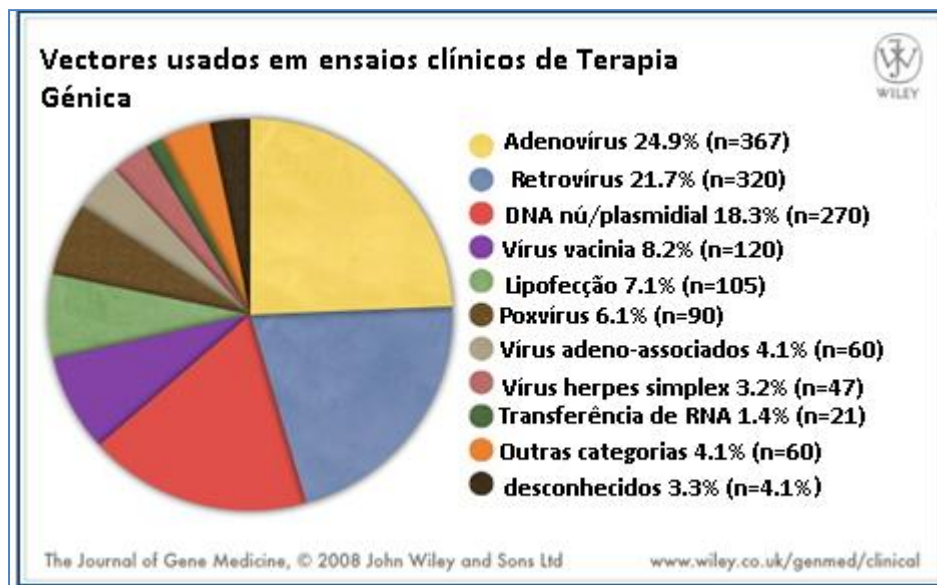
Nos métodos físicos o gene de interesse, também chamado de transgene, é introduzido de forma mecânica na célula. Existem vários métodos físicos como a microinjecção directa, a electroporação e o método biobalístico. A microinjecção directa, como o seu nome indica, consiste na introdução directa de material genético. A electroporação consiste num sistema que gera pulsos eléctricos alternados, que são aplicados nas células em solução com o material genético. A corrente gerada abre temporariamente poros na superfície celular permitindo a entrada de material genético. O método biobalístico baseia-se no uso de microesferas de ouro ou tungsténio revestidas com DNA. Estas microesferas são aceleradas por um gás carregador que as projecta contra as células, com o objectivo de atingir o núcleo das mesmas.<sup>41,43,44,46</sup>



Os métodos químicos, como o seu nome indica, utilizam compostos químicos para garantir a entrada de material genético nas células. Estes compostos são normalmente compostos catiónicos que interagem com as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA, formando complexos. Após a formação destes complexos, estes entram nas células por endocitose. Os compostos químicos utilizados para este efeito são o dextrano-dietilamina (DEAE), polietilenimina, poli-lisina, entre outros. Outros métodos químicos que também são utilizados na TG são: a co-precipitação de material genético com fosfato de cálcio e os lipossomas.<sup>41,43,44,46</sup>

Actualmente, alguns destes sistemas são aplicados em conjunto com vectores retrovirais e adenovirais, com a finalidade de aumentar a eficácia de transferência destes vectores.

A Fig.9 representa os principais vectores utilizados na TG e as respectivas percentagens de utilização, no ano 2008.

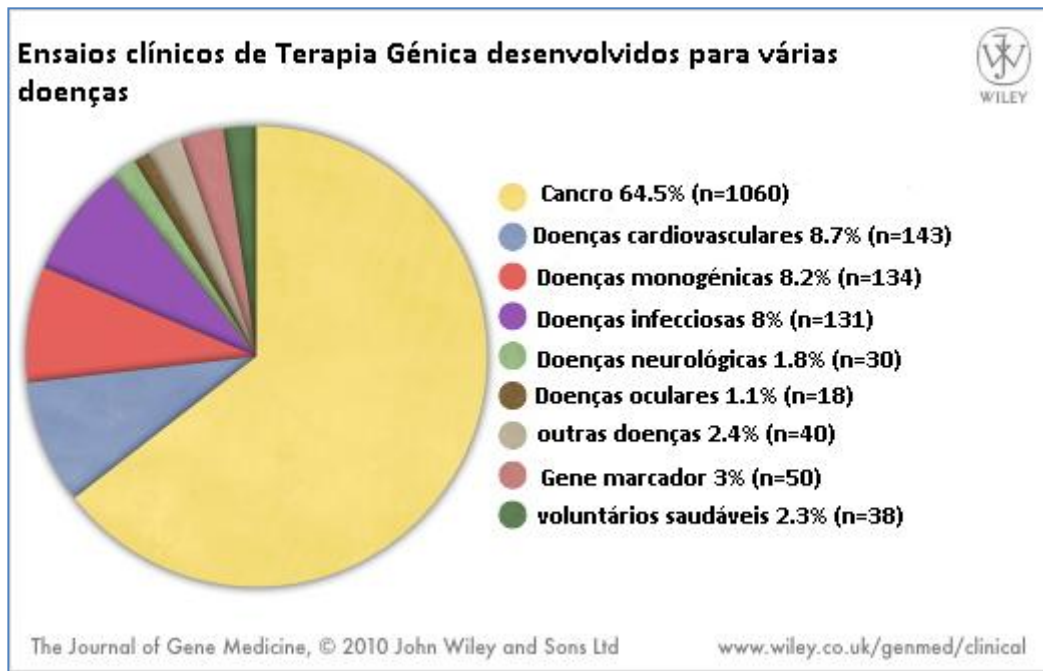


**Figura 9:** Gráfico dos vectores mais utilizados nos ensaios clínicos da Terapia Génica, no ano 2008. Fonte: adaptado de (50).

### 3.3. Aplicação da Terapia Génica em várias doenças

A TG é a esperança de tratamento para um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos convencionais, das hereditárias e neurodegenerativas (DP e Alzheimer), às diversas formas de cancro e doenças infecciosas.<sup>5,41,42,43</sup>

As percentagens das aplicações da TG, no ano 2010, podem-se observar na Fig.10.



**Figura 10:** Aplicações da Terapia Génica em ensaios clínicos, no ano 2010. Fonte: adaptado de (50).

Algumas doenças em que foi testada a TG são: doenças monogénicas (ex. distrofia muscular de Duchenne, Fibrose cística e Hemofilia), cancro, SIDA, doenças cardiovasculares (ex. aterosclerose), doenças hepáticas, diabetes, disfunção erétil e dor.<sup>39,40,43,46,51</sup>

É de salientar que a percentagem relativa de ensaios clínicos com vista à aplicação da TG às doenças neurodegenerativas, corresponde somente a 1.8%.<sup>50</sup>

### 3.4. Implicações sociais e éticas

O conhecimento actual da genómica permite a possibilidade de modificar o genoma humano, com implicações para o indivíduo e para a sua descendência.<sup>5</sup>

A utilização deste tipo de procedimentos acarreta implicações sociais e éticas, não podendo ser aplicado de uma forma irracional, uma vez que os danos podem ser irreversíveis para o organismo.<sup>5</sup>

A manipulação genética pode por exemplo levar a objectivos terapêuticos com o fim de intensificar a perfeição das características do ser humano, levantando problemas éticos relativos à eugenia, não tendo propriamente um fim curativo.<sup>5</sup>



A manipulação genética de células germinais conduz a uma grande discussão acerca destas questões. Os benefícios e os riscos devem ser ponderados antes de qualquer procedimento.<sup>5,39,42,52</sup>

Várias questões se levantam quanto ao uso da TG, nomeadamente: O que é considerado normal ou doença? Quem decide? São doenças que necessitam de ser curadas ou prevenidas? A busca da cura prejudica a vida dos doentes? Quem vai promover estas terapias e quem irá financiá-las?<sup>52</sup>

### 3.5. Factores e órgãos reguladores da Terapia Génica

Embora os fundamentos da TG se encontrem maioritariamente em fase experimental, pretende-se que estas técnicas sejam aplicadas de uma forma segura e eficaz. Para tal, o papel do Farmacêutico será importante, devendo este no futuro participar de forma activa para o uso correcto da técnica e nos cuidados prestados aos utentes. É neste contexto também, que a formação de uma equipa multidisciplinar será o modelo mais adequado para garantir o futuro uso racional da TG.<sup>45</sup>

Como é uma terapia recente os riscos podem ser imprevisíveis, desta forma vários estudos tem sido desenvolvidos de maneira a tornar a TG o mais segura possível.<sup>5,42</sup>

Os ensaios clínicos da TG exigem um protocolo que assegure em primeira análise a segurança e a inocuidade do tratamento. Assim, antes da aplicação em seres humanos, o gene terapêutico e o sistema de transferência são testados em células de cultura e em animais de experiência. Consoante os resultados destes primeiros ensaios, passa-se então para os ensaios clínicos em indivíduos doentes ou em indivíduos saudáveis. Existem quatro fases de ensaios clínicos, nomeadamente: a fase I, onde são testadas a toxicidade e farmacologia clínica; a fase II, em que são testados de forma preliminar a eficácia e segurança; a fase III, onde é feita a avaliação terapêutica a larga escala, onde são testadas a efectividade e a inocuidade em comparação com outras drogas ou fármacos; e a fase IV, onde é feita a monitorização após a introdução no mercado (como é óbvio, esta fase não existe actualmente).<sup>53</sup>

Entre os factores a ter em conta num protocolo de TG destacam-se o tipo de herança genética das doenças, o padrão da herança genética (recessivo ou dominante), a natureza da mutação que causa a doença, o controlo da expressão, o tamanho do gene a inserir no vector e o tipo de tecido onde se manifesta a doença (se pode ser extraído, cultivado *in vitro*, se é ou não resistente à manipulação e reintrodução). A resposta imunológica do



organismo e a dificuldade que colocam as desordens multigénicas (que envolvam múltiplos genes), são outros dois importantes factores a ter em conta.<sup>5,52</sup>

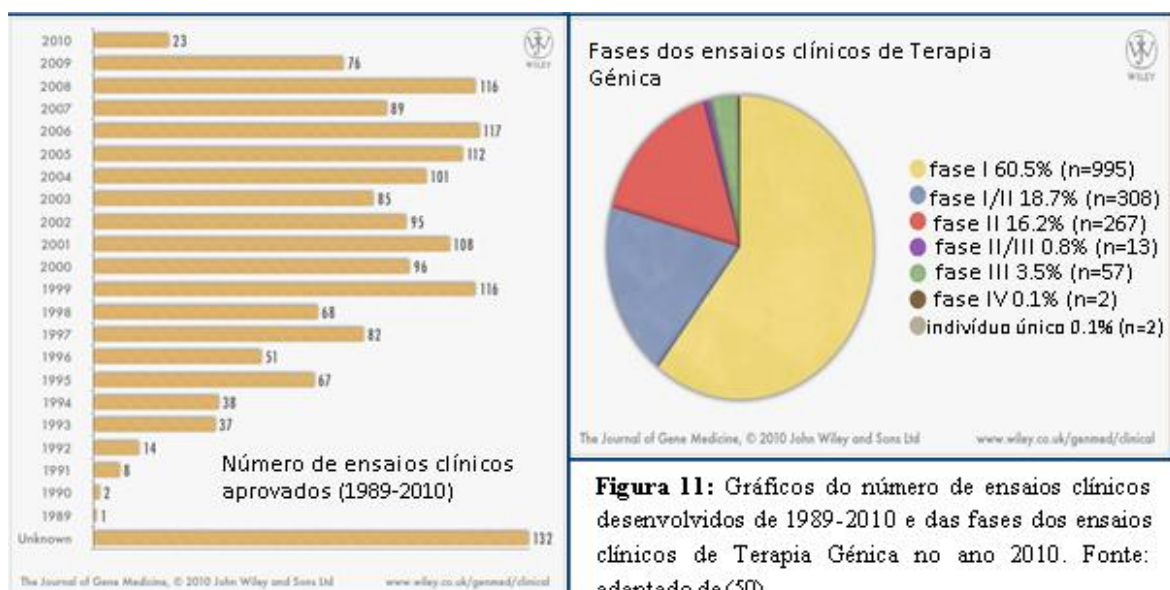
O sucesso da TG depende da eficiência da transferência e dos níveis de regulação da expressão do gene terapêutico, bem como, da sobrevivência das células ou tecido alvo geneticamente modificados no doente.<sup>53</sup>

Todos os estudos e aplicações da TG têm de ser aprovados e regulados por órgãos específicos. A FDA e o “National Institutes of Health” (NIH), órgãos reguladores Norte-Americanos. Na Europa, o Comité das Terapias Avançadas (CAT), no seio da agência europeia de avaliação dos medicamentos, “European Medicines Agency” (EMA).<sup>42,54</sup>

### 3.6. Aspectos actuais da Terapia Génica

Actualmente a TG oferece uma enorme potencialidade no tratamento de doenças através de vários métodos e linhas de investigação que estão disponíveis para uma abordagem mais directa na prevenção e tratamento. A TG, hoje em dia, não se limita às possibilidades de substituir ou corrigir genes defeituosos, ou de eliminar selectivamente células marcadas. À medida que novos sistemas são desenvolvidos, um espectro terapêutico mais amplo surge, nomeadamente, ao nível da libertação de proteínas terapêuticas, tais como hormonas, citocinas, anticorpos, antigénios e novas proteínas recombinantes.<sup>43</sup>

A FDA e EMA ainda não aprovaram nenhum produto de TG para venda. Entretanto, as pesquisas relacionadas com a TG continuam a crescer, sendo que o número de ensaios clínicos (1989-2010) e as percentagens relativas às fases dos ensaios clínicos que decorreram no ano 2010, podem ser visualizadas na Fig. 11.<sup>42,50,52</sup>



**Figura 11:** Gráficos do número de ensaios clínicos desenvolvidos de 1989-2010 e das fases dos ensaios clínicos de Terapia Génica no ano 2010. Fonte: adaptado de (50).



Embora a TG actualmente seja desenvolvida essencialmente no campo da investigação, estão a decorrer vários ensaios clínicos e prevê-se que nos próximos anos surjam produtos de TG aprovados.<sup>39</sup>

#### ***4. A Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson***

Na década passada a TG voltou a ganhar ênfase como meio potencial de tratamento de várias doenças, incluindo as doenças neurodegenerativas como a DP. A TG foi considerada uma das melhores promessas de desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença.<sup>55</sup>

A localização selectiva da doença na substância nigra (SN) do cérebro, a compreensão da biossíntese de dopamina e dos circuitos dos gânglios basais, assim como o conhecimento de factores neurotróficos dopaminérgicos e a disponibilidade de modelos animais, contribuíram para o desenvolvimento de vários estudos de TG.<sup>29,56</sup>

As primeiras tentativas de TG para DP utilizaram uma variedade de células e tecidos transplantados. No entanto, a possibilidade de utilização de vectores virais revolucionou o campo da TG, fornecendo um método eficiente para a entrega de material genético na DP.<sup>55,57,58</sup>

Várias plataformas virais têm sido desenvolvidas, com base em critérios de segurança, contudo, somente os AAV (2 e 5) e lentivírus estão a ser usados nos ensaios clínicos para a DP.<sup>57,58</sup>

Os AAV são da família dos parvovírus e têm a vantagem serem aparentemente não patogénicos e de apresentarem uma baixa resposta imunológica nos seres humanos.<sup>57</sup>

Os lentivírus são retrovírus de RNA, capazes de integração cromossómica e expressão estável a longo prazo. Ao contrário dos AAV, que tem restrições no tamanho do transgene inserido (~4.7 kb), os vectores de lentivírus podem acomodar um transgene de tamanho superior (~8 kb).<sup>57,59,60</sup>

##### **4.1. A actuação da Terapia Génica ao nível do Sistema nervoso central**

Desde a descoberta da dopamina como neurotransmissor ocorreram grandes avanços na compreensão das vias metabólicas específicas dos gânglios da base.<sup>59</sup>

Dentre os genes candidatos a TG na DP destacam-se os genes responsáveis pela produção de enzimas da síntese da dopamina, como a tirosina hidroxilase (TH), a guanosina trifosfato ciclodrolase 1 (GTP-C1) e a descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos



(DL-AA), assim como, da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD).<sup>29</sup>

A TG para doenças do S.N.C. apresenta um conjunto de restrições, nomeadamente: a natureza funcional específica dos neurónios, a heterogenidade da população celular, os circuitos de interacção, a barreira hemato-encefálica e a presença do próprio crânio.<sup>61,62</sup>

#### **4.2. As razões para a utilização da Terapia Génica na doença de Parkinson**

Na DP existem várias razões para a utilização da TG, nomeadamente: (i) a fisiopatologia da doença, mais precisamente devido ao facto de afectar uma área ao nível do cérebro de acesso limitado aos tratamentos convencionais; (ii) existir a possibilidade de aumentar os níveis de dopamina quando os sintomas da doença surgem, ou seja, quando mais de 50% dos neurónios estão destruídos na SN, podendo-se fazer a injeção directa do vector nos corpos celulares da mesma ou nos terminais localizados no *striatum*, sendo que uma única aplicação do vector poderá resultar numa expressão do transgene estável e prolongada; (iii) e por fim, haver possibilidade de cura ou regressão desta doença debilitante.<sup>55,57,61</sup>

#### **4.3. Estudos desenvolvidos em modelos animais e seres humanos**

Os modelos animais da DP reflectem com precisão este distúrbio, imitando a perda de neurónios dopaminérgicos e a resultante perda de função dos gânglios basais.<sup>54</sup>

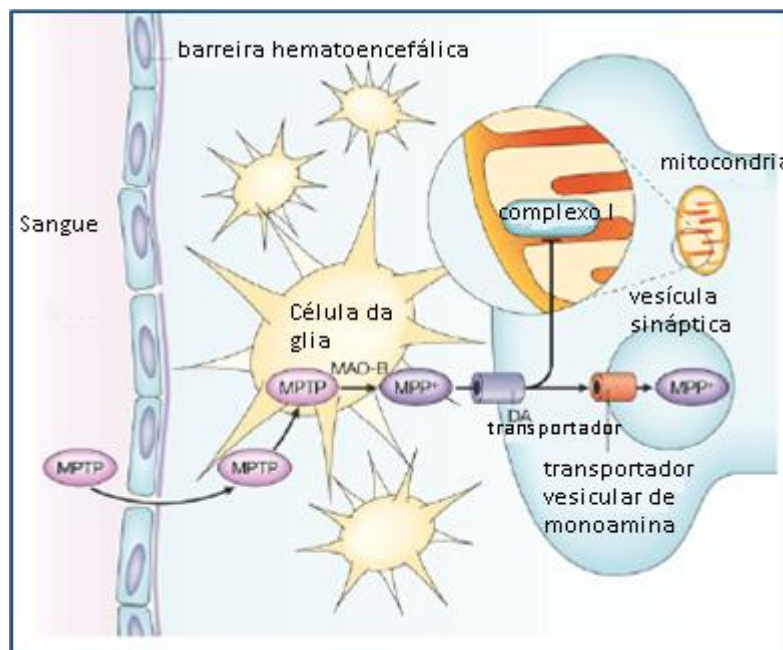
Vários estudos de TG com vista ao tratamento da DP, em modelos animais (roedores e primatas não humanos) foram desenvolvidos nos últimos anos.<sup>54</sup>

Há mais de 35 anos, verificou-se que a injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no prosencéfalo de roedores induzia uma lesão nigral aguda, associada ao aparecimento de hipersensibilidade a agonistas dopaminérgicos como a apomorfina. Esta neurotoxina (6-OHDA) não atravessa a barreira hematoencefálica, portanto deve ser administrada localmente através de injeção estereotáxica, directamente na SN *pars compacta* ou no feixe do prosencéfalo medial. Esta descoberta foi muito útil porque permitiu a indução de parkinsonismo unilateral em roedores.<sup>17,62</sup>

Langston e os seus colaboradores por volta de 1983 descobriram que uma heroína sintética análoga à meperidina, a 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), convertida no cérebro no seu metabolito activo, desenvolvia parkinsonismo grave em seres humanos. Este mesmo grupo de pesquisadores, demonstrou que a administração de MPTP em macacos causava sintomas parkinsonianos, que notavelmente se assemelhavam à DP idiopática.<sup>17,62</sup>



A MPTP é uma molécula altamente lipofílica, que atravessa facilmente as membranas lipídicas, como a barreira hematoencefálica em questão de segundos após a sua administração sistémica. Uma vez no encéfalo, é rapidamente convertida em 1-metil-4-fenilpiridinium ( $MPP^+$ ), metabolito activo. A MPTP sofre a acção da enzima MAO-B, originando o 1-metil-2-fenil-2,3-dihidropiridinium ( $MPDP^+$ ) e  $MPP^+$ , nas células da glia. De seguida o  $MPP^+$  liga-se ao transportador da dopamina e entra nos neurónios dopaminérgicos. Uma vez dentro dos neurónios, o  $MPP^+$  rapidamente acumula-se na matriz mitocondrial e expulsa a dopamina de dentro das vesículas, acumulando-se dopamina e radicais livres no citosol, provocando a morte neuronal (Fig. 12).<sup>17</sup>



**Figura 12:** Mecanismo de acção do 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina. **Abreviaturas:** DA – dopamina; MAO-B - monoamina oxidase B;  $MPP^+$  - 1-metil-4-fenilpiridinium; MPTP -1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina. Fonte: adaptado de (17).

Nos seres humanos as abordagens de TG na DP, basearam-se nos seguintes critérios: aumento dos níveis de dopamina por meio do aumento da produção de neurotransmissores, via reposição enzimática; modulação do fenótipo neuronal ou do circuito de sinalização dos gânglios basais; e neuroprotecção.<sup>54,57,59,60,64</sup>

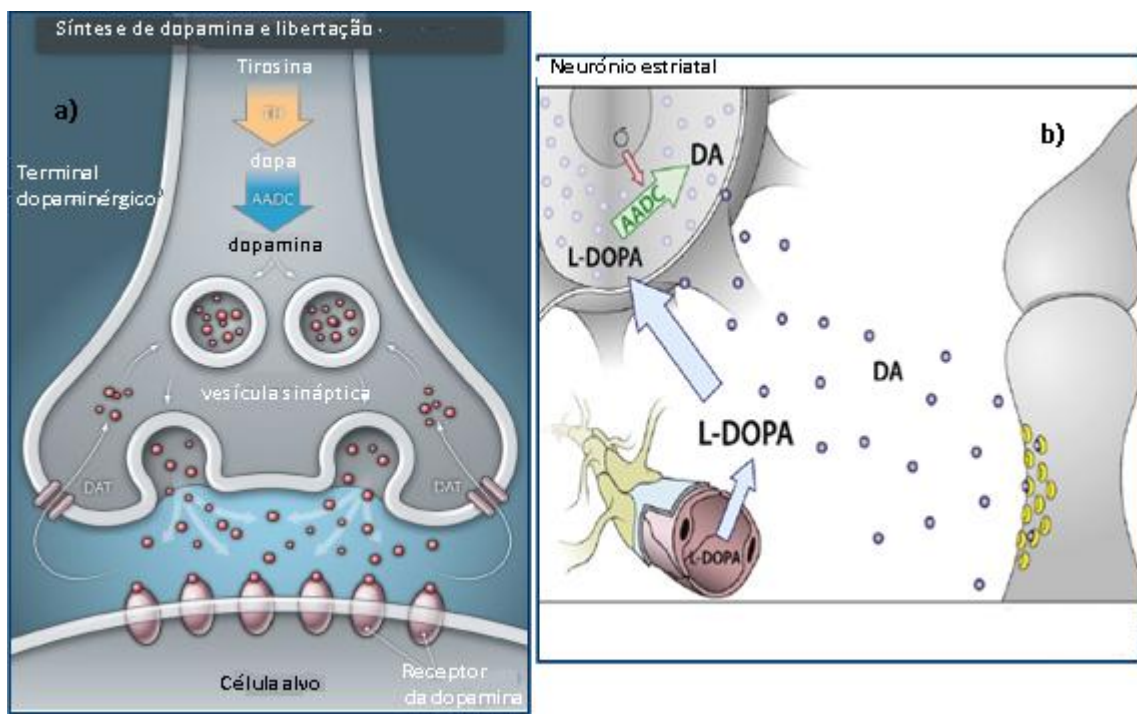
Alguns dos estudos efectuados em modelos animais e em seres humanos, serão analisados neste trabalho.



#### 4.3.1. Terapia Génica de reposição enzimática

Durante as duas últimas décadas, grandes esforços têm sido desenvolvidos no mapeamento das vias enzimáticas e mecanismos de armazenamento-libertação-recaptação de catecolaminas.<sup>57,59,64,65</sup>

A abordagem de TG para a DP mais óbvia seria a de reconstituir as enzimas no *striatum*, essenciais à síntese de dopamina. A dopamina é obtida da tirosina, via L-Dopa, onde participam as enzimas TH e DL-AA. A conversão enzimática da tirosina a L-Dopa é muito ineficiente, caso a enzima TH não tenha acesso ao cofactor tetrahydrobiopterina (BH4). Para ter acesso a este cofactor é necessário que a enzima GTP-C1 esteja em perfeito funcionamento, pois esta é a enzima limitante da sua formação. A perda dopaminérgica no *striatum* está associada a uma redução na actividade da TH, DL-AA e GTP-C1, bem como, uma diminuição na concentração de BH4 (Fig. 13).<sup>57,59,60,65,66</sup>



**Figura 13:** a) Síntese e neurotransmissão da dopamina num cérebro normal; b) Síntese de dopamina mediada pela L-Dopa ou levodopa (pró-fármaco). **Abreviaturas:** TH – tirosina hidroxilase; AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; DAT – Transportador de dopamina; L-DOPA - levodopa. Fonte: adaptado de (60) e (64).

As estratégias de TG com base nestas vias metabólica estão em fases I e II de ensaios clínicos e serão discutidas de seguida.



### ✚ Descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos / Vírus adeno-associados 2

Estudos em primatas não humanos, demonstraram que a entrega do gene terapêutico da DL-AA utilizando AAV2 recombinante, é capaz de restaurar a capacidade de conversão da L-Dopa em dopamina no *striatum* (Fig.14).<sup>57,58,64</sup>

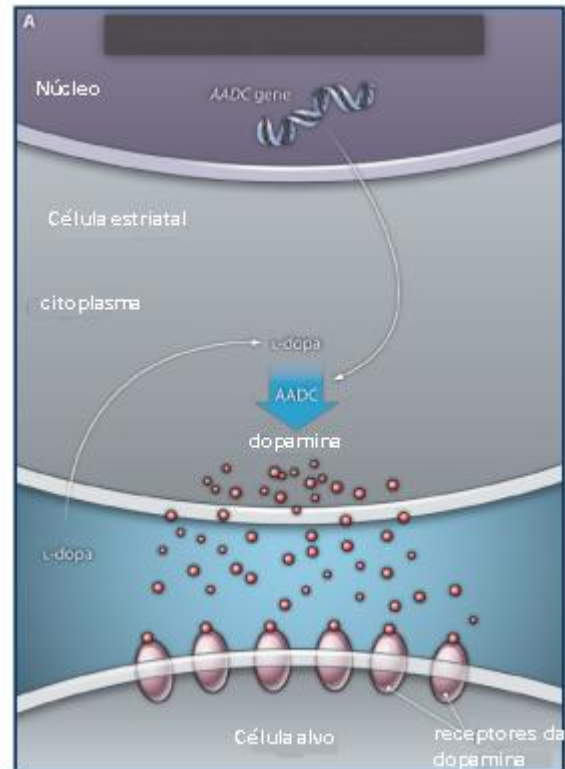
Estes resultados positivos levaram a que estudos clínicos de fase I, fossem patrocinados pela “Genzyme Inc.” (Cambridge, MA, EUA), onde utilizaram o mesmo gene e vector para a transdução no *putamen*.<sup>57</sup>

Os critérios de entrada no estudo incluíram: (i) o diagnóstico da DP idiopática, com pelo menos duas a quatro características clínicas principais identificadas; (ii) na escala de Hoehn e Yahr os doentes deviam estar entre o estadio III e IV; (iii) possuírem flutuações

motoras refractárias ao tratamento farmacológico sintomático; (iv) resposta à levodopa positiva; (v) uso de levodopa superior ou igual a cinco anos; (vi) com uma idade inferior ou igual a 75 anos; (vii) e com uma idade no diagnóstico da doença igual ou superior a 40 anos.<sup>57</sup>

Os critérios de exclusão incluíram: (i) o parkinsonismo atípico, com discinésias violentas nos últimos seis meses e prévia neurocirurgia estereotáxica; (ii) pontuação < 26 na escala de um mini exame mental; (iii) alucinações ou delírios nos seis meses antes do exame de rastreio; (iv) transtorno psiquiátrico grave ou depressivo; (v) história de neoplasia nos últimos cinco anos; (vi) e um título de anticorpos neutralizantes AAV-2  $\geq 1:1,200$ .<sup>67</sup>

Os doentes inscritos no estudo, cinco homens e cinco mulheres com idade média de 64 anos, receberam uma infusão bilateral no *putamen* de dose baixa ( $9 \times 10^{10}$  vector-genoma (vg)) [n=5] ou de dose alta de ( $3 \times 10^{11}$  vg) [n=5], em conjunto com administração oral de levodopa, de forma a estabelecer-se a segurança terapêutica. Caso efeitos adversos

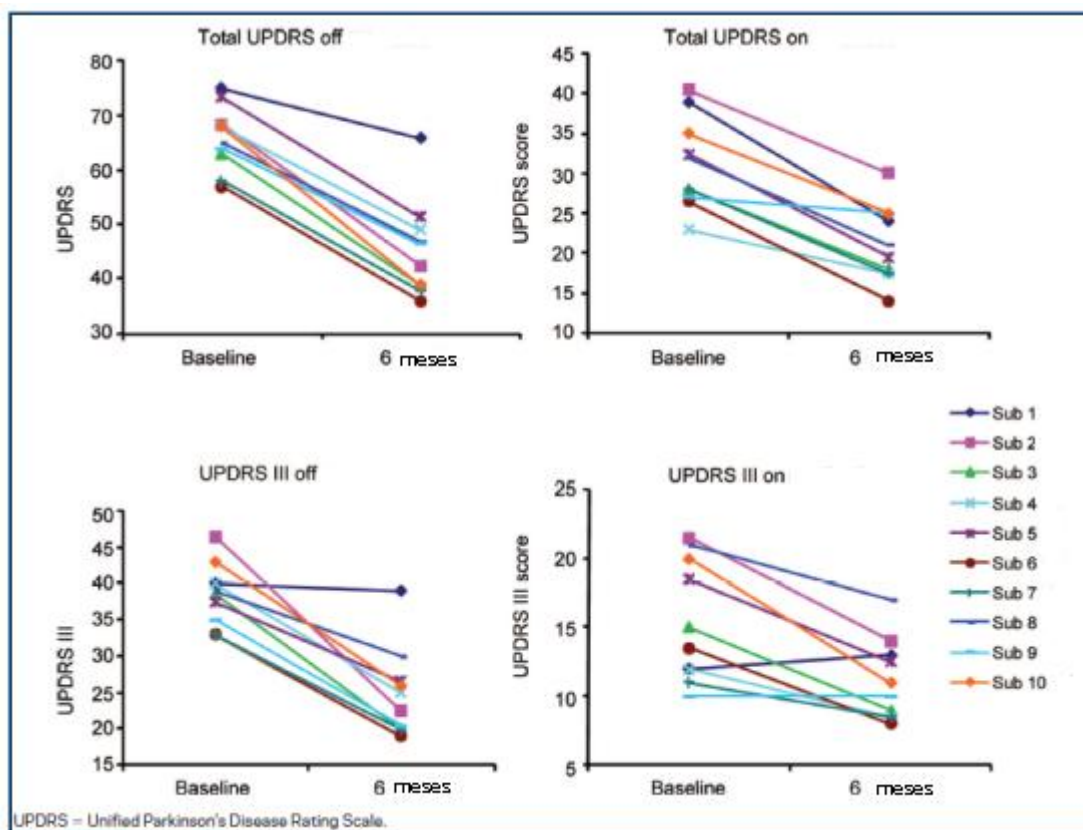


**Figura 14:** Ilustração da Terapia Génica de reposição da dopamina, utilizando o gene da enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos. **Abreviaturas:** AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos. Fonte: adaptado de (60).



fossem observados a administração oral seria parada e assim a enzima DL-AA ficaria inactiva, pois esta necessita da presença de levodopa para actuar. Desta forma, uma das vantagens desta abordagem seria a possibilidade de controlo do efeito pelo ajuste da dose de levodopa.<sup>57,59,67</sup>

Os resultados da escala UPDRS podem ser visualizados na Fig. 15, observando-se que aos seis meses todos os indivíduos apresentam uma melhoria na UPDRS total, tanto no estado “OFF” (estado acinésico ou parado do doente) como no “ON” (estado de movimento do doente). Também se verificou melhorias no estadió III da escala UPDRS, com a excepção de um indivíduo que não apresentou melhoras no estado “ON” (Fig. 15 sub1).<sup>67</sup>



**Figura 15:** Escala UPDRS total e no estadió motor III dos participantes do estudo na “baseline” e seis meses depois do tratamento para os estados “ON” e “OFF”. Fonte: adaptado de (67).

A melhoria média na UPDRS total foi de 31% no estado “OFF” e 32% no estado “ON” (Quadro 9).

**Quadro 9:** Resultados do ensaio segundo a escala UPDRS total e motora no estadio III, para os estados “OFF” e “ON” dos doentes.

	Estado “OFF”				Estado “ON”			
	Baseline	6M	%	p*	Baseline	6M	%	p*
<b>Total UPDRS</b>								
Dose baixa “cohort”	69.6	49.6	-28	0.04	32.6	21.8	-33	0.024
Dose alta “cohort”	62.4	41.3	-33	0.001	29.7	20.5	-31	0.08
Combinação “cohorts”	66	45.5	-31	0.0008	31.2	21.2	-32	0.004
<b>III UPDRS</b>								
Dose baixa Cohort	40.5	26.6	-33	0.004	15.8	11.4	-22	NS
Dose alta Cohort	36.6	23.1	-37	0.0014	15.1	10.9	-28	NS
Combinação cohorts	38.6	24.6	-36	0.0016	15.5	11.2	-28	NS

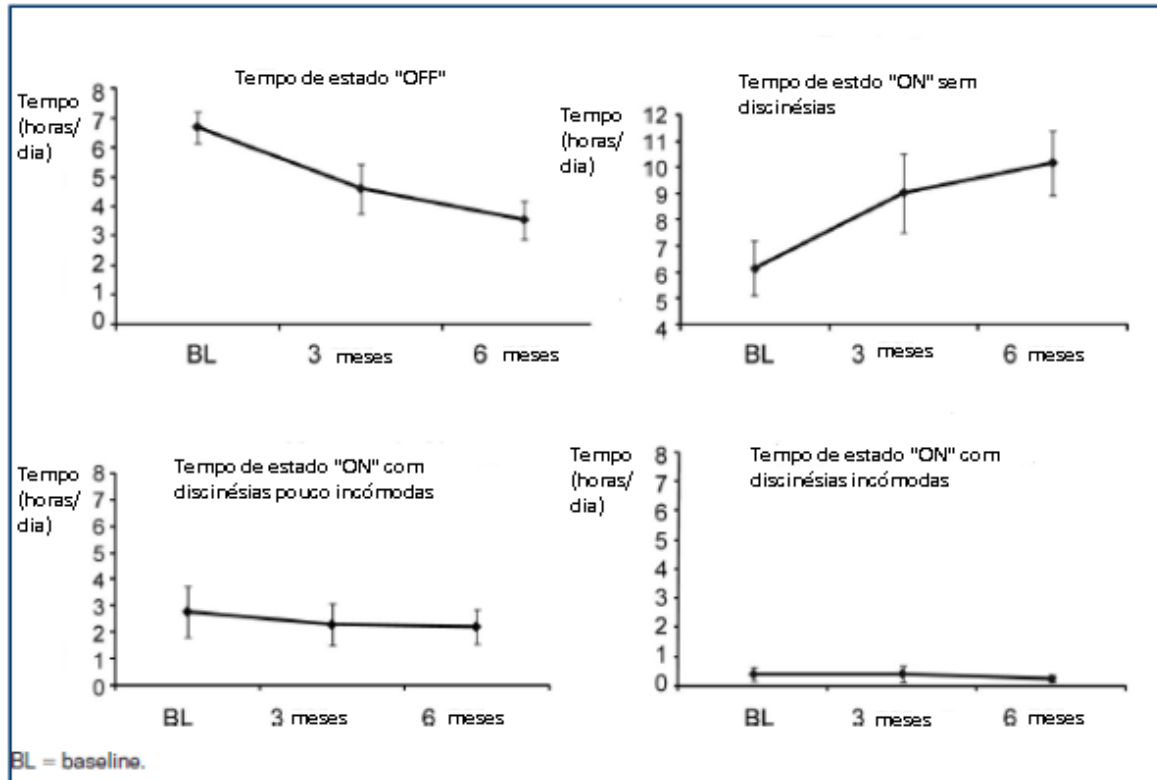
**Abreviaturas:** (-) – percentagem de redução na escala UPDRS do valor aos seis meses em comparação à “baseline”; p – valor de p segundo o teste *Bonferroni*; M – meses; NS – sem significado; UPDRS – “*Unified Parkinson’s Disease Rating Scale*”. Existem cinco pacientes em cada “cohort”. Fonte: adaptado de (67).

A média da melhoria no estadio III da escala UPDRS foi de 36% no estado “OFF” e de 28% no estado “ON”.<sup>67</sup>

Os resultados obtidos neste estudo na combinação dos “cohorts”<sup>††</sup>, nos seis meses após a intervenção, mostraram uma redução no valor da escala UPDRS total, o que demonstra resultados positivos. Reduções similares foram verificadas nos valores da escala UPDRS motora no estadio III.<sup>67</sup>

No registo de actividade motora de cada participante observou-se uma redução do tempo de estado “OFF” (de acinésia) com discinésias e um aumento do tempo de estado “ON” (de movimento) sem discinésias, num período de seis meses. O estado “ON” não foi associado ao aumento de discinésias incómodas ou não incómodas, verificando-se uma redução do tempo das mesmas ao longo de seis meses (Fig. 16).<sup>67</sup>

<sup>††</sup> **cohorts:** estudos que envolvem o seguimento de grupos de indivíduos num período de tempo.

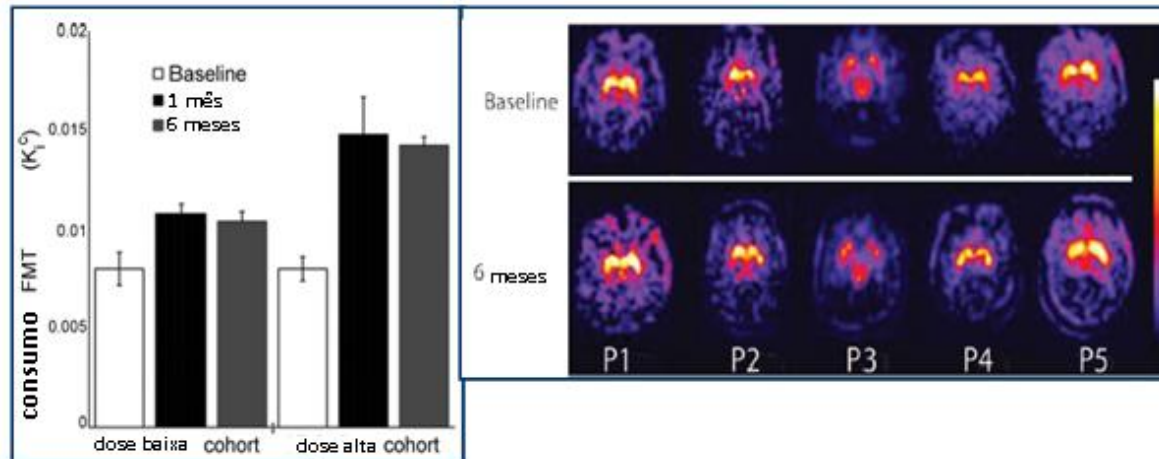


**Figura 16:** Tempo dispendido nos diferentes estados “ON” ou “OFF” no terceiro e sexto mês após a intervenção, em comparação com a “baseline”. Fonte: adaptado de (67).

Nenhum participante necessitou de aumentar a dose de levodopa, como terapêutica adjuvante.<sup>67</sup>

O sucesso da transferência do gene foi monitorizado utilizando o marcador [<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tirosina (FMT), por imagem PET. A Fig. 17 mostra o aumento médio dos valores de consumo ( $K_i^c$ ) de FMT no *putamen* (média do hemisfério direito e esquerdo) um mês e seis meses após a transferência do gene de acordo com a dose recebida. O aumento médio de consumo foi maior para o “cohort” da dose mais alta, 75% versus 30% do “cohort” da dose mais baixa, o que foi consistente com os níveis mais elevados de expressão de DL-AA. A imagem de PET seis meses após a intervenção permitiu verificar o aumento de consumo de FMT em relação à “baseline”.<sup>57,67,68</sup>

Todos os dez participantes tiveram melhorias que foram descritas segundo a escala UPDRS, ou seja os valores na escala diminuíram. Outro aspecto a realçar neste estudo foi que oito dos dez doentes conseguiram reduzir a dose de levodopa, demonstrando-se assim a actividade desta TG. Curiosamente, estes mesmos doentes apresentaram melhorias com ou sem a medicação auxiliar com levodopa, no estado “ON” ou “OFF” do doente.<sup>57,60</sup>



**Figura 17:** Gráfico de consumo de FMT no *putamen*, após um mês e seis meses da intervenção e imagem PET após seis meses em comparação com a “baseline”.

Dose baixa: (1º mês,  $p=0,02$ ; 6º mês  $p= 0,009$ ); Dose alta: (1º mês,  $p=0,007$ ; 6º mês  $p= 0,004$ );

**Abreviatura:** FMT -[<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-tirosina; K<sub>i</sub><sup>c</sup> – Valores de consumo de FMT. Fonte: adaptado de (67) e (68).

Embora, estes resultados tenham sido animadores, os autores sugerem a necessidade de um estudo de fase II, versus placebo para determinação da eficácia destes resultados. Para além disso, vários efeitos adversos foram relatados, como cefaleias transitórias, hemorragias intracranianas e em quatro doentes foi registado um aumento transitório das discinésias.<sup>54,57,59,67</sup>

#### ✚ “ProSavin”

A Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido) em associação com o sistema de saúde francês, patrocinou um teste clínico que utiliza um vector multicistronico de lentivírus, nomeadamente, um vírus equino baseado na anemia infecciosa (EAIV). Este vector permitiu transferir três tipos de genes relacionados com a síntese de dopamina a partir da tirosina, para o *striatum*, mais precisamente: o gene da TH, o gene da GTP-C1 e DL-AA (Fig. 18). O gene da TH é transformado (TH truncada) de forma a evitar a inibição por “feedback” negativo desta enzima pela dopamina. A escolha destes três genes deve-se ao facto da restauração da actividade da DL-AA requerer administração contínua de levodopa. Neste caso, a produção da levodopa endógena pode ser conseguida através da transdução das enzimas envolvidas na sua biossíntese, a TH e a GTP-C1.<sup>57,58,60,64,65</sup>



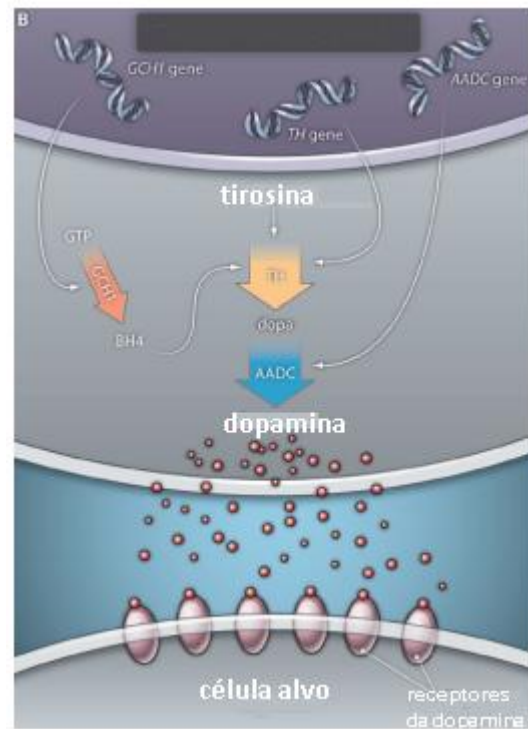
A terapia com o “ProSavin” demonstrou-se bem sucedida em modelos animais de roedores induzidos com 6-OHDA e primatas não humanos com MPTP.<sup>57,58,60,64</sup>

Jarraya e seus colaboradores, utilizaram modelos animais de primatas não humanos para a entrega dos três genes através do vector lentiviral tricistrónico. Para investigar a capacidade de transferência dos genes TH, DL-AA e GPT-C1, 18 macacos foram distribuídos por três grupos de seis. Para simular a DP avançada foi administrada a neurotoxina MPTP. Os macacos do primeiro grupo receberam injeções bilaterais (cinco) do vector lentivírus com os três genes em estudo, ao nível do *putamen* motor. Os do segundo grupo receberam injeções bilaterais (cinco) do vector lentivírus com o gene “reporter”<sup>‡‡</sup>, lacZ, no *putamen* motor, sendo considerado o grupo controlo. Os do terceiro

grupo não receberam qualquer intervenção cirúrgica mas foram incluídos como um grupo controlo adicional, para avaliar a estabilidade do MPTP a longo prazo. Todos os animais foram mantidos durante o tempo de estudo sem levodopa ou qualquer outro fármaco dopaminérgico.<sup>65</sup>

Ao fazerem a análise extracelular de dopamina no *putamen* através de microanálise, realizada dez meses após a cessação de MPTP, verificaram que a concentração de dopamina diminuiu para 27% das concentrações normais ( Teste de Friedman  $p < 0,001$ ).<sup>65</sup>

Antes da administração com a neurotoxina todos os primatas têm o valor zero na escala de severidade, “Clinical rating scale” (CRS). Após o tratamento mas antes da injeção lentiviral, os macacos apresentaram um aumento significativo da severidade da DP na



**Figura 18:** Ilustração da Terapia Génica de reposição de dopamina, utilizando um vector lentivírus com os três genes das enzimas envolvidas na síntese de dopamina. **Abreviatura:** AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; BH4 – tetrahydrobiopterina; GCH1 ou GTP-C1 – guanosina trifosfato ciclodrolase 1; e TH – tirosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (60).

<sup>‡‡</sup> Gene “reporter”: o gene de interesse é substituído pelo “reporter”, permitindo visualizar o produto da sua expressão (fluorescente ou corado) e indicando que a zona estudada é importante para a expressão do gene em estudo consoante a intensidade da cor transmitida.



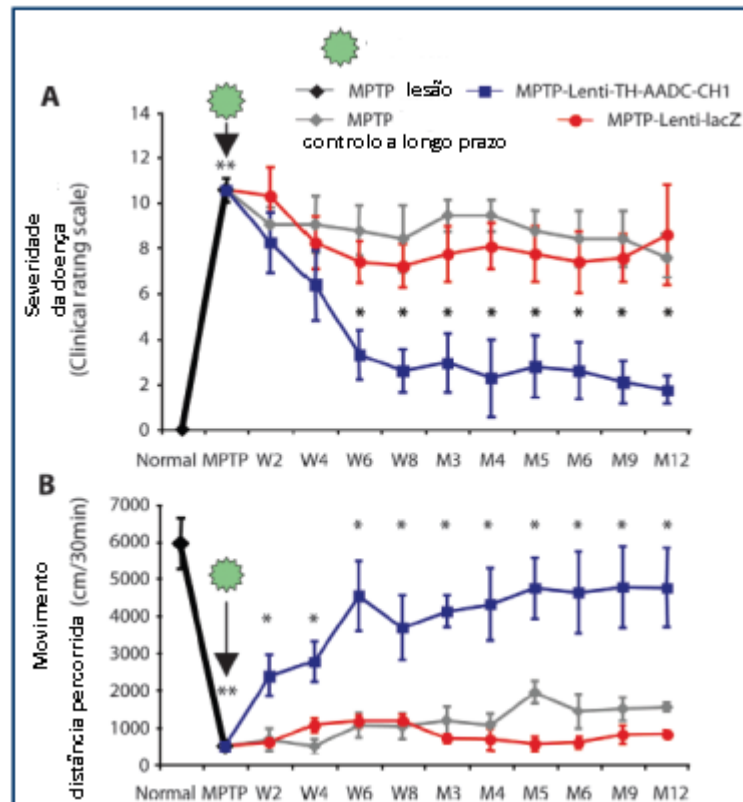
escala CRS de 10,4 (máximo = 14), em relação ao controlo (normal) [n = 18] (Fig. 19A). Após o tratamento com os três genes, verificou-se uma redução e uma melhoria significativa na escala de CRS global, por comparação com os grupos controlo e passadas seis semanas do início do tratamento ( $p < 0,001$ , segundo o teste de Friedman e  $p < 0,05$ , segundo o teste Mann-Whitney, em comparação com ambos os controlos).<sup>65</sup>

A severidade da deficiência motora, ou seja a diminuição dos movimentos, causada pelo MPTP foi avaliada através de uma análise quantitativa de movimento a partir de vídeo. Desta forma, concluíram que os macacos tratados com

MPTP apresentaram uma marcada acinesia (deslocavam-se 8% da distância percorrida por animais normais) [n = 18]. A

disfunção postural foi avaliada pela frequência de movimentos de criação ou de iniciativa (7% em comparação com o estado normal [n = 18]).<sup>65</sup>

Duas semanas após a injeção lentiviral, os animais que receberam os três genes (azul na Fig. 19B) demonstraram uma melhoria significativa da acinesia em comparação com os animais que receberam os controlos, com o gene “reporter” (lacZ; vermelho) ou os que não receberam injeção viral (cinza), ambos com um valor de  $p < 0,05$ , segundo o Teste de Mann-Whitney.<sup>65</sup>

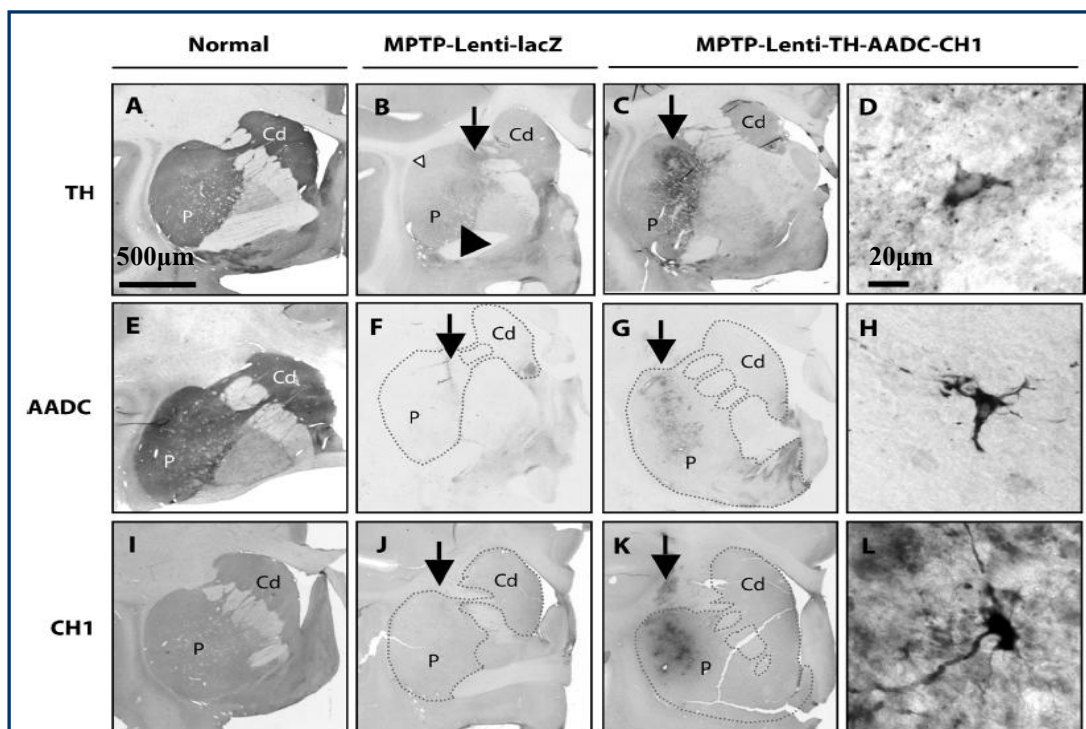


**Figura 19:** Resultados da injeção do lentivírus (TH-DL-AA-GTPC1) em macacos tratados com MPTP, de forma a provocar efeitos parkinsonianos. A) Avaliação da severidade da doença pela escala CRS; B) Avaliação do movimento, através da distância percorrida com auxílio de vídeo. Azul : Administração do lentivírus com os genes de interesse; Vermelho: Administração do lentivírus controlo; Cinza: Sem injeção viral; Preto: Lesão com MPTP; W – semanas após a transferência génica; M – mês após a transferência de genes. **Abreviaturas:** AADC ou DL-AA– descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; CH1 ou GTP-C1 – guanosina trifosfato ciclohidrolase 1; MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; e TH – tirosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (65).



Os animais tratados com os genes em estudo, continuaram a recuperar da acinesia e do comprometimento postural, tendo atingido 77% da distância total percorrida por um animal normal e 85% da postura normal. Os animais controlo ficaram gravemente doentes em todos os momentos, não recuperando.<sup>65</sup>

A análise neuropatológica, *post-mortem*, realizada 12 semanas após a cessação do MPTP, demonstrou uma perda pronunciada de células e uma diminuição da função metabólica na SN *pars compacta* e uma diminuição dramática das células onde são produzidas as enzimas TH, DL-AA e GTP-C1 e consequentemente de fibras imunorreactivas no *striatum* (Fig. 20 B, F, J). A desnervação no *striatum*, avaliada pela perda de TH, resultou num padrão heterogéneo de degeneração semelhante à observada em doentes com DP. Assim, o *putamen* foi mais afectado do que o núcleo caudado e a parte dorsal do *putamen* (Fig. 20B seta incompleta branca) mais afectada com que a ventral (Fig. 20B seta incompleta preta). Os animais tratados por TG com os três genes tiveram resultados positivos nos



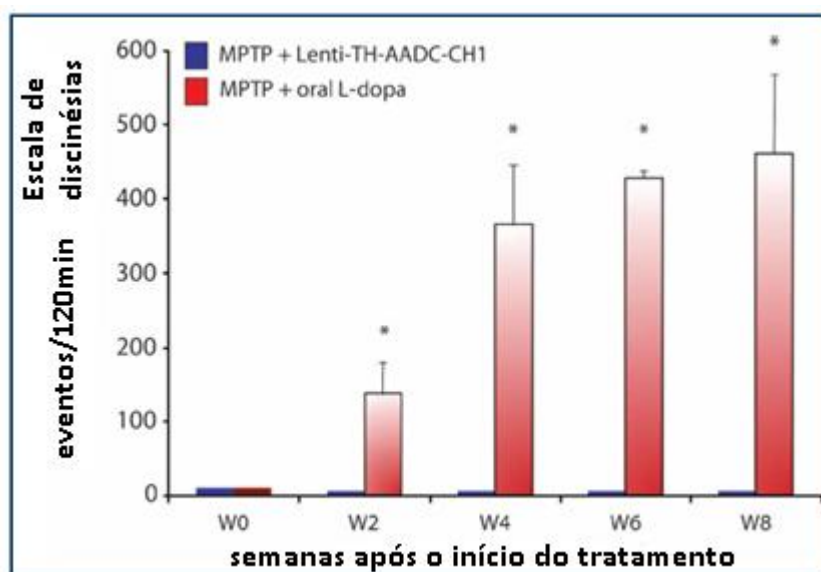
**Figura 20:** Análise *post-mortem* dos transgenes num cérebro normal [A, E e I], num cérebro controlo [B, F e J] e num cérebro com o vector lentiviral com os três genes (TH – [C]; DL-AA – [G]; e GTP-C1 – [K]). Numa ampliação maior observa-se as fibras imunorreactivas ao longo do *putamen* e os neurónios positivos para a TH [D], DL-AA [H] e GPT-C1 [L].

Setas completas – sectores da agulha de injeção; Seta incompleta branca – *putamen* dorsal; Seta incompleta preta - *putamen* ventral; Linha tracejada – delineamento do corpo do *striatum*.  
**Abreviaturas:** AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; Cd – núcleo caudado; CH1 ou GTP-C1- guanosina trifosfato ciclohrolase; lacZ – controlo; Lenti – lentivírus; MPTP - 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; P – *putamen*; TH – tirosina hidroxilase. Fonte: (65).



neurónios, sendo mais evidente estes resultados nos arredores do local da injeção do vector viral, representando quase 15% do volume do *putamen* (Fig. 20C, G e K).<sup>65</sup>

Neste mesmo estudo foram mais tarde avaliadas as discinésias induzidas pela levodopa em comparação com o tratamento de TG com os três genes. Para avaliar se o tratamento induziu discinésias foram utilizadas imagens de vídeo. A administração oral de levodopa produziu discinésias graves, ao passo que a TG não induziu nenhuma discinésia significativa, durante o período de observação (Fig. 21).<sup>65</sup>



**Figura 21:** Comparação das discinésias induzidas pelo tratamento com levodopa e com a Terapia Génica dos genes TH, DL-AA e GTP-C1, com o lentivírus. **Abreviaturas:** AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; CH1 ou GTP-C1 – guanósina trifosfato ciclohidrolase; TH – tirosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (65).

Iniciaram-se depois os ensaios clínicos, em seres humanos com “*ProSavin*”. Nestes estudos duas doses diferentes foram utilizadas, sendo que no ano 2009 a “*Oxford BioMedica*” anunciou que ambas foram bem toleradas pelos doentes, melhorando a função motora e qualidade de vida dos mesmos, sem evidência de imunotoxicidade ou efeitos adversos. Na fase I ao fim de 6 meses, o grupo que recebeu a dose mais elevada possuiu uma melhoria motora de 34% em relação à “*baseline*”.<sup>57,58</sup>

Numa segunda etapa, foi elaborado um estudo de determinação da eficácia da dose ideal (2010). Neste estudo de fase II onde participaram 12 indivíduos, os critérios de selecção foram: (i) idade entre os 50 e 65 anos; (ii) com diagnóstico de DP idiopática bilateral



superior a cinco anos; (iii) com estádios III e IV na escala de Hoehn e Yahr; (iv) presença de flutuações motoras; (v) e resposta positiva à terapia dopaminérgica.<sup>57,68</sup>

Os resultados obtidos nesta fase levaram a concluir que esta terapia era segura e bem tolerada ao fim de dois anos após o tratamento. Dois de cada três participantes do grupo que recebeu a dose inicial mais baixa apresentaram melhorias da função motora de 30% ao fim de dois anos, na escala motora UPDRS estadio III durante o estado “OFF” (acinésico). Concluiu-se também que não houve problemas de segurança e os participantes permaneceram bem sem evidência de toxicidade. A melhoria máxima da função motora após um ano de tratamento foi de 56% no grupo que recebeu a dose mais elevada.<sup>68</sup>

Embora se tenha verificado melhorias significativas na qualidade de vida dos participantes deste estudo, uma advertência foi feita ao facto dos neurónios não dopaminérgicos também serem atingidos, por este tipo de terapia.<sup>57,68</sup>

#### 4.3.2. Terapia Génica na modulação do circuito dos gânglios basais

As neurocirurgias como a palidotomia e talamotomia, foram intervenções muito utilizadas para a redução dos problemas motores da DP. No entanto, as lesões no cérebro são irreversíveis e os seus efeitos difíceis de prever. Desta forma, novos métodos de inibição dos gânglios basais (segmento interno do globo pálido e núcleo subtalâmico de Luys) foram utilizados, assim como a Estimulação Cerebral Profunda (ECP). Os benefícios da ECP no núcleo subtalâmico de Luys, em indivíduos com DP, incluíram melhorias na rigidez, acinésia e tremor, ao ponto da farmacoterapia poder ser reduzida. A ECP é utilizada em doentes com DP avançada, de forma a bloquear o núcleo subtalâmico de Luys e conseqüentemente reduzir a excitação neuronal, devido ao aumento do neurotransmissor inibitório, ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA).<sup>64,66</sup>

A perda de dopamina nigroestriatal não provoca alterações neurofisiológicas isoladamente, pelo contrário, conduz a alterações complexas ao longo do circuito dos gânglios basais. Claramente, a perda da inervação dopaminérgica do *striatum* traduz-se numa hiperactividade no núcleo subtalâmico de Luys, que resulta num aumento de actividade nos núcleos de saída, ou seja, no segmento interno do globo pálido e SN *pars reticulata*, que por sua vez inibem os centros motores do tálamo.<sup>59,66</sup>

Tanto a ablação deste núcleo como a utilização da ECP tem sido utilizados e tem sugerido que a modulação fenotípica do núcleo subtalâmico de Luys, pode ser benéfica a um subgrupo de doentes.<sup>57,58</sup>



Assim, a identificação dos mecanismos subjacentes à actividade eléctrica anormal do circuito dos gânglios cortico-basais, pode permitir outras abordagens de TG. Uma abordagem alternativa para obter o silenciamento deste núcleo é a conversão dos neurónios excitatórios num fenótipo inibitório, a partir do GABA.<sup>57,66</sup>

As vias da síntese excitatória pelo glutamato e inibitória pelo GABA estão relacionadas. Na verdade, o GABA é sintetizado directamente do glutamato pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), que possui duas isoformas (GAD65 e GAD67). Assim, a sobreexpressão de GAD, num neurónio glutaminérgico, leva à formação de GABA em detrimento do glutamato. No entanto, o armazenamento e libertação do GABA fica comprometido, uma vez que, o transportador vesicular de glutamato é altamente específico para este e assim é mantida a actividade inibitória do GABA.<sup>64,66</sup>

Com base na hipótese de que o GABA pode inibir a actividade excitatória do núcleo subtalâmico de Luys e reverter os sintomas motores da DP, foi desenvolvida uma abordagem de TG para entregar o gene da GAD no núcleo subtalâmico com vectores de vírus adeno-associados (AAV).<sup>70,71</sup>

Estudos iniciais, utilizaram modelos animais de roedores, aos quais foi induzida a DP com 6-OHDA. Estes animais receberam no núcleo subtalâmico de Luys injecções de AAV2 recombinante com os genes GAD65, GAD67 e um gene marcador de proteína verde fluorescente (GFP), o controlo.<sup>64,66</sup>

Nestes animais a produção de GABA foi medida verificando-se a sobreexpressão do AAV2 recombinante do GAD65, levando a um aumento de produção de GABA. Observou-se também, nos mesmos animais, uma diminuição da rotação<sup>§§</sup> induzida por anfetaminas ou apomorfina, com o GAD65. Tal significa que houve uma redução da área lesada e os animais passaram a rodar menos no sentido da lesão, ou seja, ambas áreas lesadas ou não do cérebro passaram a ser estimuladas pelas drogas.<sup>64,66</sup>

Relativamente ao GAD67 pareceu ser menos eficiente na protecção dos neurónios da SN *pars compacta* e na diminuição da rotação induzida pela apomorfina.<sup>64,66</sup>

Este estudo foi posteriormente replicado em macacos *rhesus* induzidos com MPTP, que receberam uma injecção unilateral de AAV recombinante com GAD (65 ou 67) ou GFP.

---

<sup>§§</sup> **Teste de rotação induzida por drogas:** teste bem estabelecido para avaliar o défice de dopamina após a lesão. Os animais rodam para a direita ou esquerda após lesão e a administração de doses elevadas de drogas. Tais movimentos são registados por um aparelho medidor das rotações. As rotações são normalmente feitas no sentido da lesão. Drogas como a apomorfina, estimulam mais os receptores no lado do cérebro intacto, induzindo o animal a rodar para o lado oposto da área do cérebro com mais receptores activos.



As análises de PET mostraram um aumento do metabolismo do córtex motor ipsilateral (do lado da lesão) dos animais em estudo em comparação com grupos controlo. A infusão dos vectores com as duas isoformas resultou não só numa melhoria do comportamento mas também em comportamentos espontâneos.<sup>64,66</sup>

Todos estes dados levaram ao desenvolvimento de ensaios clínicos de fase I e II, onde foi avaliada a segurança e tolerabilidade, num estudo duplamente cego patrocinado pela “*Neurologix Inc.*” (Fort Lee, Nova Jersey, EUA). Os critérios de inclusão no estudo foram: (i) DP idiopática à pelo menos cinco anos; (ii) pontuação de três na escala de UPDRS  $\geq 25$  no estado “*OFF*”; (iii) e demonstrar complicações na resposta à levodopa, pelo menos, de 12 meses.<sup>57,59,64</sup>

Na fase I do ensaio clínico 12 participantes (11 homens e uma mulher), receberam uma injeção unilateralmente no núcleo subtalâmico de Luys, de uma de três doses de AAV2-GAD 65 e 67 (baixa, média ou alta). Neste ensaio de segurança nenhum efeito adverso grave foi registado e após um ano registou-se uma melhoria de 29% em relação à escala UPDRS total. O efeito foi observado pela primeira vez três meses após a cirurgia e persistiu até 12 meses.<sup>59,64</sup>

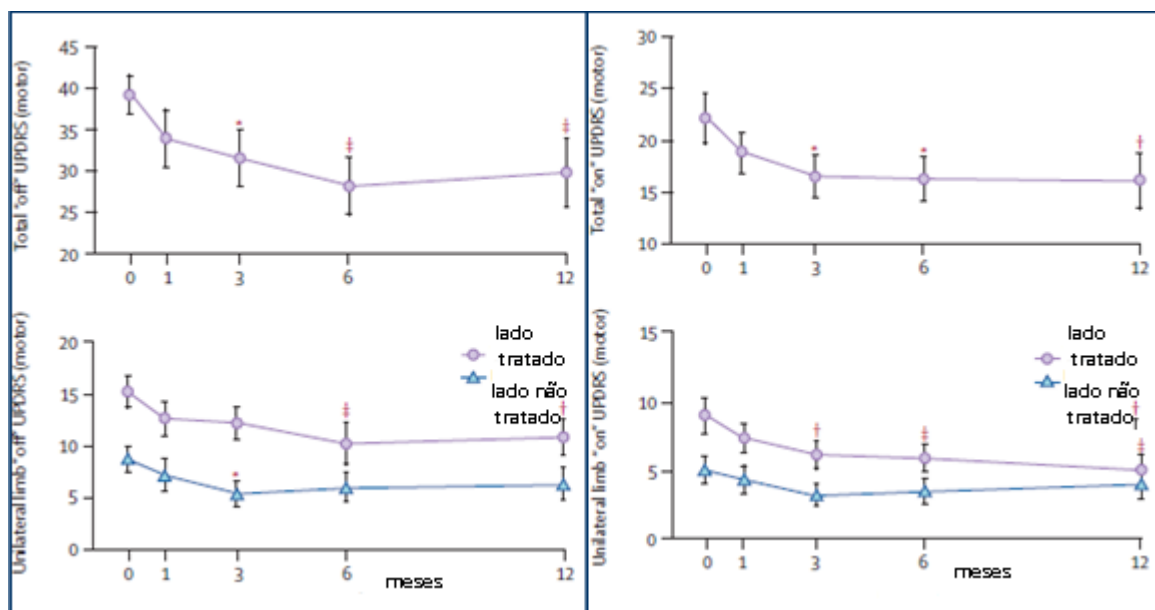
Com base neste dados, iniciaram-se os ensaios clínicos de fase II para testar a segurança e eficácia. Nestes Kaplitt e seus colaboradores utilizaram o mesmo número de participantes (12) com idade média de 58.2 anos  $\pm$  5.2 anos, com DP idiopática.<sup>64,70</sup>

Os critérios de inclusão no estudo foram: (i) idade dos participantes compreendidas entre os 25 e 70 anos; (ii) duração da DP de pelo menos cinco anos; (iii) estadio III ou superior na escala de *Hoehn e Yahr*; (iv) pontuação de 30 ou mais na escala motora UPDRS III, no estado “*OFF*”; (v) complicações motoras com o tratamento com a levodopa; (vi) e uma esquema terapêutico estável com fármacos antiparkinsonianos à pelo menos três meses.<sup>70</sup>

Os critérios de exclusão foram: (i) a presença de disfunção cognitiva considerada por testes neuropsiquiátricos; (ii) e contra-indicação para cirurgia.<sup>70</sup>



O tratamento total ou unilateral no núcleo subtalâmico de Luys com GAD-AAV conduziu a melhorias na escala motora UDPRS, tanto no estado “ON” (de movimento do doente) como no estado “OFF” (acinésico) (Fig. 22 – gráficos roxos). Após um mês da intervenção não se registaram melhorias estatisticamente significativas. Contudo, após três meses, ambos os estados “ON” e “OFF” demonstraram melhorias significativas em relação à “baseline” (19% com  $p= 0.0244$ ; e 25% com  $p= 0.0182$ ), bem como, ao fim de seis meses (28% com  $p= 0.0006$ ; e 26% com  $p= 0.0126$ ) e 12 meses (24% com  $p= 0.0038$ ; e 27% com  $p= 0.0098$ ).<sup>70</sup>



**Figura 22:** Gráficos das melhorias motoras segundo a escala UPDRS para o estado “OFF” e “ON”, com tratamento total ou unilateral do núcleo subtalâmico de Luys. Para o estado “OFF” as medidas foram feitas 12 horas após cessar a medicação oral. Para o estado “ON” as medidas foram feitas 1 hora após a administração matinal da medicação oral. Roxo – região do núcleo subtalâmico de Luys com tratamento total ou unilateral com GAD-AAV. Azul – região do núcleo subtalâmico de Luys contralateral, sem tratamento. Fontes: adaptado de (70). \* ( $p<0.05$ ); †( $p<0.01$ ); ‡ ( $p<0.005$ ).

Uma melhoria significativa na escala UPDRS foi registrada no lado do corpo oposto ao hemisfério tratado (contralateral), com tratamento unilateral, no estado “OFF”,  $p= 0.0035$  e no estado “ON”,  $p= 0.0007$ ; RMANOVA (Fig.22 - azul).<sup>70</sup>

No lado do núcleo tratado de forma unilateral, a escala UPDRS no estado “OFF”, melhorou 33% ( $p= 0.0012$ ) e 29% ( $p= 0.0057$ ) em seis e 12 meses, respectivamente (Fig.22 – roxo em baixo).<sup>70</sup>

Dez dos 12 participantes apresentaram melhoria na UPDRS no estado “OFF”, em 12 meses. Quatro participantes apresentaram melhorias entre os 0%-20% e dois melhoraram entre os 20%-40%. Outros quatro melhoram mais de 40% em todo o corpo na escala



UPDRS no estado “OFF”. O Quadro 10 permite visualizar os valores segundo a escala UPDRS para todos os participantes em qualquer instante, em comparação à “baseline”.<sup>70</sup>

As reacções adversas observadas nos participantes foram consideradas leves ou sem relação com esta TG.<sup>70</sup>

Relativamente à quantidade de fármacos antiparkinsonianos consumidos por dia pelos doentes neste estudo, esta não se alterou significativamente ao longo do estudo, curiosamente até diminuiu (Fig. 23).<sup>70</sup>

**Quadro 10:** Valores do UPDRS no estado “OFF” e “ON”.

Estado OFF	Dose	“baseline”	Mês 1*	Mês 3*	Mês 6*	Mês 12*
Doente 1	Baixa	35	26(-26%)	18(-49%)	25(-29%)	15(-57%)
Doente 2	Baixa	48	52(8%)	45(-6%)	48(0%)	52(8%)
Doente 3	Baixa	31	25(-19%)	39(26%)	22(-29%)	27(-13%)
Doente 4	Baixa	46	49(7%)	44(-4%)	52(13%)	42(-9%)
Doente 5	Média	37	35(-5%)	30(-19%)	28(-24%)	36(-3%)
Doente 6	Média	30	33(10%)	30(0%)	15(-50%)	18(-40%)
Doente 7	Média	33	22(-33%)	18(-45%)	34(3%)	22(-33%)
Doente 8	Média	38	19(-50%)	17(-55%)	18(-45%)	16(-58%)
Doente 9	Alta	36	43(19%)	43(19%)	33(-8%)	49(36%)
Doente 10	Alta	56	51(-9%)	48(-14%)	30(-46%)	46(-18%)
Doente 11	Alta	45	29(-36%)	22(-51%)	18(-60%)	16(-64%)
Doente 12	Alta	35	23(-34%)	25(-29%)	16(-54%)	19(-46%)
Média	-	39.2	33.9	31.6	28.3	29.8
Mudança no grupo em relação à “baseline”			-13.4%	-19.4%	-27.9%	-23.8%
<i>Estado ON</i>						
Doente 1	Baixa	19	17(-11%)	13(-32%)	17(-11%)	12(-37%)
Doente 2	Baixa	29	25(-14%)	22(-24%)	29(0%)	22(-24%)
Doente 3	Baixa	9	14(56%)	16(78%)	15(67%)	16(78%)
Doente 4	Baixa	27	22(-19%)	16(-41%)	20(-26%)	20(-26%)
Doente 5	Média	27	24(-11%)	22(-19%)	24(-11%)	28(4%)
Doente 6	Média	19	18(-5%)	16(-16%)	7(-63%)	9(-53%)
Doente 7	Média	24	17(-29%)	12(-50%)	20(-17%)	10(-58%)
Doente 8	Média	12	14(17%)	13(8%)	10(-17%)	8(-33%)
Doente 9	Alta	15	16(7%)	20(33%)	16(7%)	26(73%)
Doente 10	Alta	35	35(0%)	33(-6%)	24(-31%)	32(-9%)
Doente 11	Alta	33	15(-55%)	9(-73%)	8(-76%)	5(-85%)
Doente 12	Alta	16	9(-44%)	6(-63%)	5(-69%)	5(-69%)
Média	-	22.1	18.8	16.5	16.3	16.1
Mudança no grupo em relação à “baseline”			-14.7%	-25.3%	-26.4%	-27.2%

Abreviaturas: \* - Percentagem de mudança em comparação à “baseline”. Fonte: adaptado de (70).

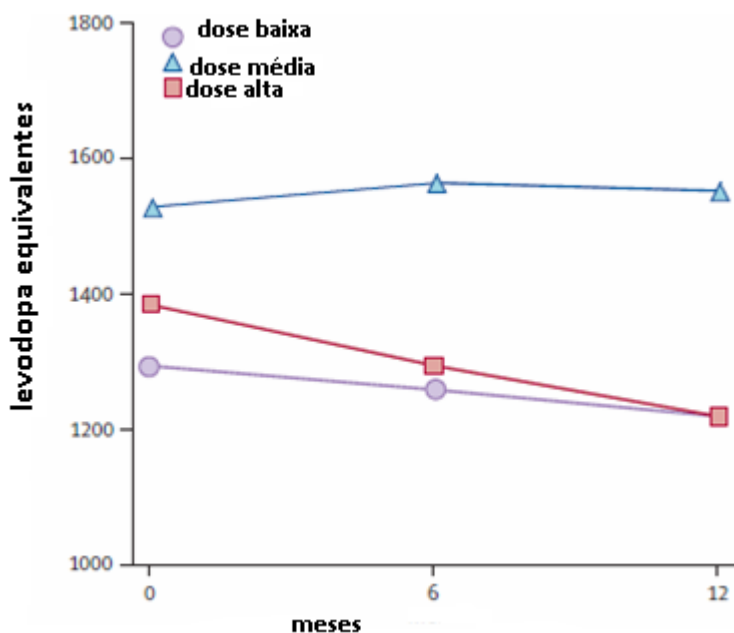


Figura 23: Mudanças na dose diária de fármacos dopaminérgicos. Fonte: adaptado de (70).

Numa análise de PET, após 12 meses e em comparação à “baseline”, demonstrou uma redução significativa no metabolismo da glicose no tálamo no hemisfério tratado com GAD-AAV ( $p < 0.001$ , segundo o teste  $t$ ), como se pode ver na Fig. 24. Esta redução é coerente com os princípios desta TG, uma vez que o aumento da concentração de GABA no cérebro inibe a actividade do tálamo, comprovando-se assim o efeito deste procedimento.<sup>70</sup>

Não houve correlacões significativas entre a TG e a actividade metabólica no hemisfério não tratado.<sup>70</sup>

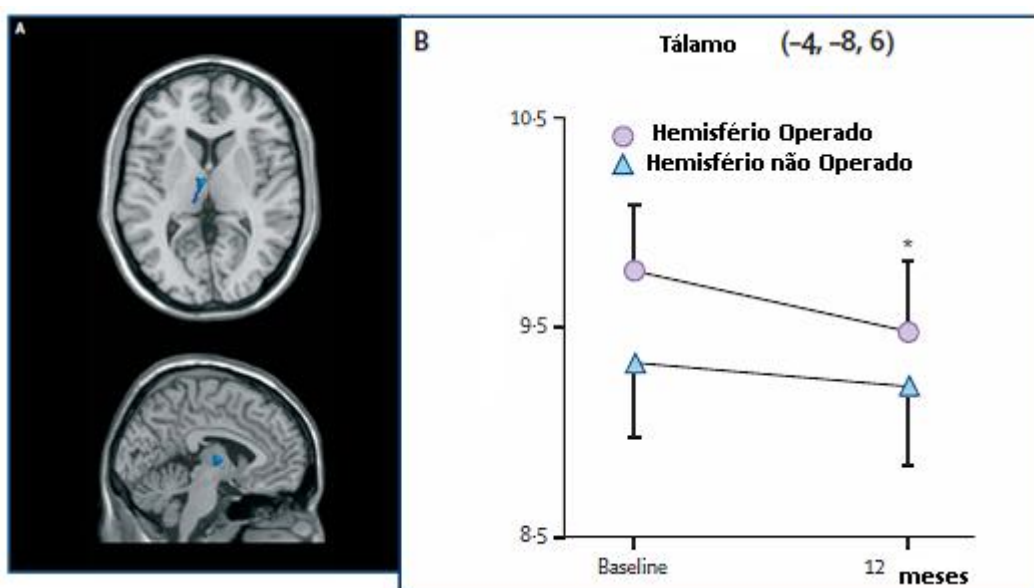


Figura 24: Redução da actividade metabólica do tálamo após a Terapia Génica no núcleo subtalâmico de Luys. A) Representação axial e sagital 12 meses após a terapia génica. B) Actividade metabólica nos hemisférios operados e não operados na “baseline” e após 12 meses. \*  $p < 0.02$  Fonte: adaptado de (70).



Os resultados demonstraram que a transferência de genes mediada por AAV pode ser segura, sem evidência de substâncias tóxicas ou efeitos adversos e sem mortes.<sup>70</sup>

Este tipo de TG foi descrita como potencialmente poderosa em comparação à ECP, contudo, com a ressalva de que as consequências a longo prazo ainda são desconhecidas.<sup>57,70</sup>

#### 4.3.3. Terapia Génica neuroprotectora

Como a DP é uma doença, neurodegenerativa e progressiva, tem havido um esforço para encontrar estratégias para desacelerar ou reverter o processo degenerativo.<sup>64</sup>

Uma vez que os sintomas motores da DP só surgem após a perda substancial de neurónios dopaminérgicos na *SN pars compacta*, a protecção destas células é uma meta terapêutica óbvia.<sup>57</sup>

Vários estudos foram desenvolvidos em modelos animais (>50 estudos pré-clínicos) e em seres humanos (aproximadamente 9 ensaios clínicos), baseados em genes e utilizando os factores de neuroprotecção, nomeadamente os factores neurotróficos. Actualmente, continuam a ser desenvolvidos estudos deste tipo, uma vez que a utilização destes factores de protecção têm mostrado ser uma mais valia para a doença.<sup>72</sup>

Os factores neurotróficos têm uma história enorme de investigação biológica e clínica. Desde a descoberta do factor de crescimento neural, por Rita Levi-Montalcini em 1954, esta área de investigação tem avançado consideravelmente, nomeadamente ao nível das novas funções destes factores e da identificação de subpopulações. Contudo, a identificação do factor adequado é apenas parte do desafio, a identificação de meios para entrega dos mesmos também o é.<sup>59,73</sup>

Os objectivos desta abordagem são: (i) melhorar sintomas, restaurando a função dos neurónios dopaminérgicos que sofreram degeneração nigroestriatal, aumentando assim a biossíntese de dopamina; (ii) permitir a protecção dos neurónios impedindo a neurodegeneração; (iii) e ainda retardar ou travar a progressão da doença.<sup>74</sup>

A vantagem deste tipo de abordagem é facilitar a produção de dopamina endógena sem interrupção do circuito dos gânglios basais.<sup>74</sup>

A maioria dos estudos feitos em modelos animais, onde se simulou a morte dos neurónios dopaminérgicos, verificou-se a existência de neuroprotecção utilizando como tratamento o factor neurotrófico protótipo, o “*glia cell line-derived neurotrophic factor*” (GDNF). Este



factor derivado da glia foi descoberto em 1993 e pertence à família de factores de crescimento  $\beta$ , sendo a molécula mais bem estudada em termos de neuroprotecção. O GDNF é expresso em níveis elevados durante o desenvolvimento embrionário e é mantido em níveis baixos na vida adulta.<sup>57,58,59,64</sup>

Os primeiros estudos da acção neuroprotectora do GDNF foram realizados por injeccção directa ou por infusão da proteína recombinante, no espaço intracerebroventricular ou no parênquima cerebral.<sup>59,64</sup>

O primeiro ensaio clínico foi iniciado em 1996, onde se utilizou uma infusão contínua de proteína recombinante do GDNF, intracerebroventricular, utilizando bombas mecânicas. Foram seleccionados 50 participantes com DP moderada ou avançada, que receberam uma injeccção bólus de 25-4000 $\mu$ g GDNF no ventrículo lateral, durante cada mês e no total de 28 meses. O estudo foi realizado de forma duplamente cega. Contudo, os resultados foram decepcionantes uma vez que não se registou qualquer melhoria, pelo contrário, foram registados vários efeitos adversos, como náuseas, vómitos, perda de peso, depressão e parestesias. Tais efeitos adversos foram atribuídos à estimulação pelo GDNF de regiões do cérebro extra-*striatum* e à penetração limitada do líquido cefalorraquidiano para o parênquima cerebral.<sup>59,64,73</sup>

Devido ao fracasso do primeiro ensaio clínico, verificou-se a necessidade de mudança do local de acção, nomeadamente para o *putamen*. Assim, foi elaborado outro estudo em doentes com DP idiopática, que receberam a terapia bilateralmente através de um catéter intraparenquimatoso, no *putamen* postero-dorsal. Os resultados foram mais animadores sem evidências de efeitos adversos e os doentes apresentaram melhorias da função motora de 40% na escala de UPDRS.<sup>64</sup>

Baseado nestes dados estudos de eficácia, duplamente cegos e controlados por placebo, para entrega intra-*putamen* da proteína GDNF, foram desenvolvidos, mas não foram bem sucedidos. Consequentemente, os ensaios clínicos foram interrompidos, uma vez que a neurotrofina não alcançou níveis adequados no cérebro dos seres humanos. Os doentes tratados a longo prazo com este factor neurotrófico desenvolveram também anticorpos anti-GDNF, o que constituiu mais um factor para o insucesso deste tipo de tratamento. Para além destes aspectos, observou-se num estudo posterior em primatas não humanos, a degeneração das células de Purkinje ao nível do cerebelo, o que sugeriu um vazamento do péptido GDNF para fora do local de acção.<sup>58,59,66</sup>



No entanto, várias outras estratégias para aumentar a expressão de GDNF ao nível do *striatum* foram bem sucedidas na redução e ou prevenção da morte dopaminérgica nigroestriatal e na redução dos sintomas parkinsonianos comportamentais, utilizando modelos animais (ex. macaco-rhesus e roedores), induzidos com MPTP ou 6-OHDA.<sup>58,59,66</sup> Em ambos os modelos DP em roedores e primatas a transferência do gene GDNF foi alcançada utilizando adenovírus (Barkats et al., 1998), herpes vírus (Simonato et al., 2000; Fink et al., 2003), AAV (Mandel et al., 2006), ou lentivírus (Jakobsson e Lundberg, 2006), demonstrando-se a neuroprotecção.<sup>58,59,66</sup>

Num estudo pioneiro desenvolvido por Marta Bohn e seus colaboradores, descobriram que a administração supranigral de GDNF utilizando como vector um adenovírus, sete dias antes da provocação da lesão no *striatum* com 6-OHDA, em roedores, resultava numa protecção de 75% dos neurónios dopaminérgicos.<sup>59,64,73</sup>

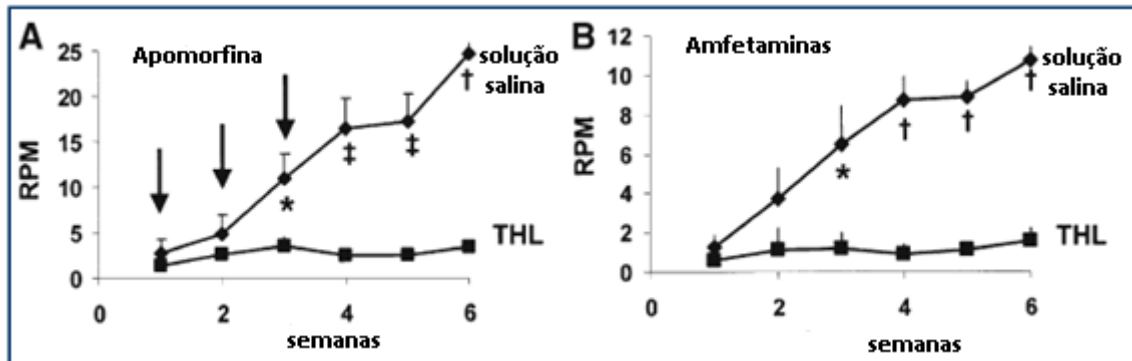
Choi Lundberg, repetiu o estudo pioneiro utilizando o vector de adenovírus injectando o mesmo intra-*striatum*, contudo, alterou a forma da lesão para uma lesão parcial com 6-OHDA. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que a assimetria comportamental dos roedores foi reduzida e as células nigrais foram protegidas, no entanto, não houve melhoria na densidade das fibras do *striatum*. Outro aspecto a realçar foi o facto do adenovírus ter produzido uma forte resposta inflamatória no local da injeccção, destacando-se a necessidade de utilizar vectores virais menos imunogénicos (ex. AAV ou lentivírus).<sup>59,64,66,73</sup>

Num estudo mais recente (2008), desenvolvido por Yun Zhang e William Pardridge, foram utilizados outro tipo de vectores não virais, mais precisamente o “Trojan horse” lipossomas (THLs), também designados por imunolipossomas peguilados. Neste estudo, o transgene GDNF foi colocado sob a influência do promotor da TH, por forma a restringir a expressão do factor nas células catecolaminérgicas no cérebro. Assim, o GDNF é apenas expresso na substância nigra do cérebro, garantindo a neuroprotecção. O plasmídeo recombinante obtido (pTHpro-GDNF) foi encapsulado no interior dos lipossomas e a superfície dos mesmos conjugada com polietilenoglicol.<sup>75</sup>

No mesmo estudo, a evolução da lesão com 6-OHDA em roedores foi monitorizada por ensaios de neurocomportamento, utilizando apomorfina e anfetamina para indução da rotação.<sup>75</sup>



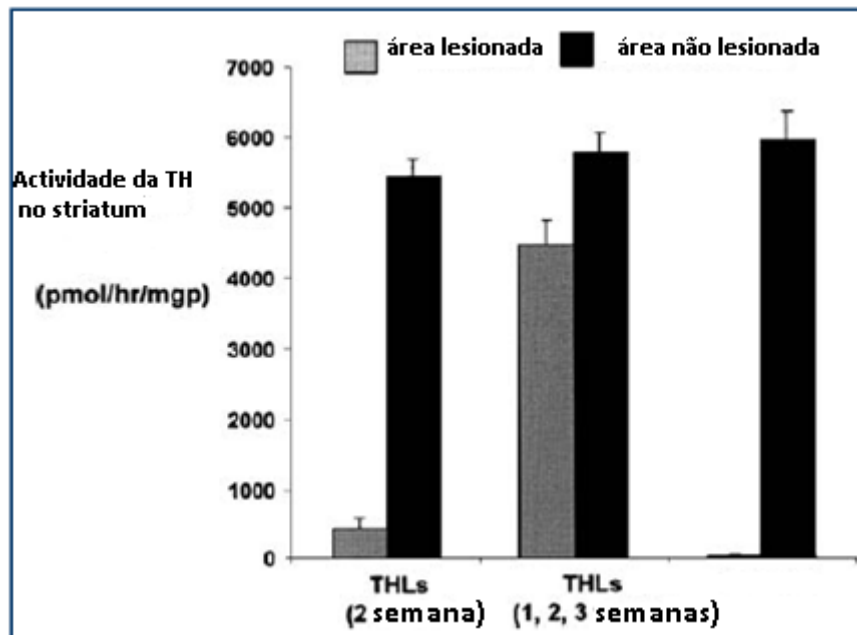
Nos animais tratados com solução salina, a rotação induzida pelas drogas aumentou durante seis semanas após a injeção da toxina (6-OHDA). Nos animais tratados com THLs (com pTHproGDNF) e em que a administração foi realizada na primeira, segunda e terceira semana após a administração da toxina, a rotação induzida pelas drogas manteve-se em níveis mais baixos, o que significa uma redução da área lesada (Fig.25).<sup>75</sup>



Como a expressão do transgene GDNF está sob a influência do promotor da TH a sua expressão no cérebro fica confinada a regiões vizinhas da região onde o gene TH é expresso, estando assim este relacionado com a actividade da enzima TH.<sup>75</sup>

A actividade da enzima TH no *striatum* foi medida seis semanas após a administração da toxina, em ambos os lados do cérebro (lesado e não lesado), nos roedores tratados com solução salina e THLs (Fig. 26). Verificou-se uma redução de 99% de actividade da enzima TH no *striatum* do lado lesado, para a solução salina. Contudo, a redução da mesma enzima foi de apenas 23% para os animais tratados com THLs, na primeira, segunda e terceira semana após a administração da toxina. Por outro lado, quando tratados com uma única injeção de THLs na segunda semana após a administração da toxina, observou-se uma redução de 91% da enzima TH, o que significa que as injeções repetidas são mais eficazes.<sup>75</sup>

Os resultados deste estudo fornecem evidências de uma recuperação quase completa dos efeitos tóxicos da 6-OHDA, quando tratados os animais com THLs (pTHproGDNF) durante várias semanas.<sup>75</sup>



**Figura 26:** Actividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no lado do cérebro lesado em comparação com o não lesado, nos roedores tratados com solução salina ou lipossomas (THLs); O tratamento com THLs foi efectuado na primeira, segunda e terceira semana ou com uma dose única duas semanas após a administração da 6-OHDA. A actividade da enzima no *striatum* foi medida seis semanas após a administração da toxina. Fonte: adaptado de (75).

Foram também efectuados estudos em roedores (Gasmi et al., 2007) e primatas não humanos (Kordower et al., 2006; e Herzog et al., 2007), com um outro membro da família destes factores, a neurturina (NTN), expressa nos gânglios da base, demonstrando-se neste caso protecção eficaz dos neurónios dopaminérgicos, sem o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes ou degeneração cerebelar.<sup>56,57,58,64,66,73</sup>

A NTN foi descoberta em 1996 nos laboratórios de Jeffrey Milbrandt, como o segundo membro dos factores neurotróficos e obteve resultados benéficos ao nível da neuroprotecção e neurorestruturação de dopamina.<sup>56,57,58,64,66,73</sup>

Num estudo desenvolvido por Herzog C. e seus colaboradores, primatas não humanos receberam injeções bilaterais de CERE-120 ou NTN, segundo uma escala de doses (de  $6 \times 10^{10}$  até  $6 \times 10^{11}$  vg) ou solução controlo. Foi utilizado como vector viral um AA2V.<sup>76</sup>

Nos animais tratados com CERE-120 verificou-se uma forte imunomarcação da proteína no *striatum* (Fig. 27 b, c e d).<sup>76</sup>

A análise estatística de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo em relação à dose de CERE-120 [H (1,3) = 18.53;  $p < 0.001$ ].<sup>76</sup>



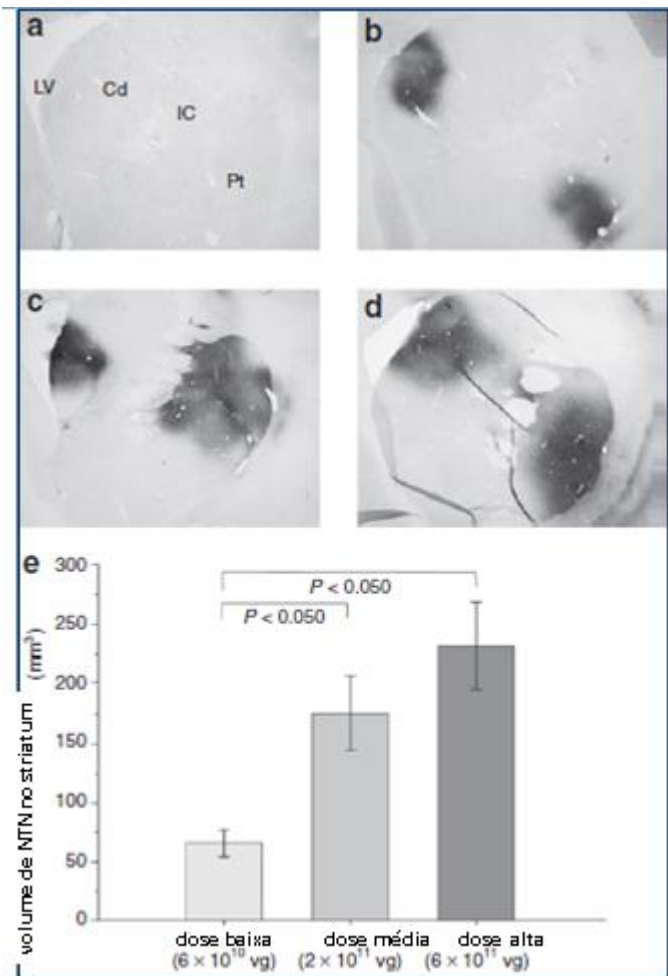
As comparações “*post hoc*”<sup>\*\*\*</sup>, utilizando o método de Dunn revelaram um aumento significativo no volume de NTN na dose média e alta, em comparação com a dose mais baixa (Fig. 27 e).<sup>76</sup>

Na SN *pars compacta*, foi observada a NTN (Fig. 28 b-d). Na análise “*post hoc*” de Tukey, revelou uma diferença significativa na quantidade de NTN entre os grupos do estudo [F (3,8) = 4.36;  $p=0.042$ ; Fig. 28e], bem como, que a intensidade de NTN aumentou de forma dose-dependente [F (3,8) = 9.53;  $p<0.005$ ; Fig. 28 f].<sup>76</sup>

O tratamento com CERE-120 aumentou a TH ao nível do *striatum*, uma vez que houve um aumento evidente da sua intensidade nas imagens, em comparação com os grupos controlo. A imunorreactividade mais intensa da TH coincide com as

áreas delimitadas pela NTN, nas doses média e alta (Fig. 29 b-d). A quantificação da TH por densimetria óptica mostrou uma tendência para o aumento de intensidade da TH no caudado de animais injectados com CERE-120 com o aumento da dose [F (3,8) = 3.07;  $p = 0.091$ ]; Fig. 29e]. Um aumento estatisticamente significativo nas doses média e alta (aumentos de 60 e 65%), em comparação com os controlos no *putamen*, também foi verificado (Fig. 29 f).<sup>76</sup>

Um aumento qualitativo da TH foi observada na SN, com o aumento da dose Fig. 30 b-d.<sup>76</sup>



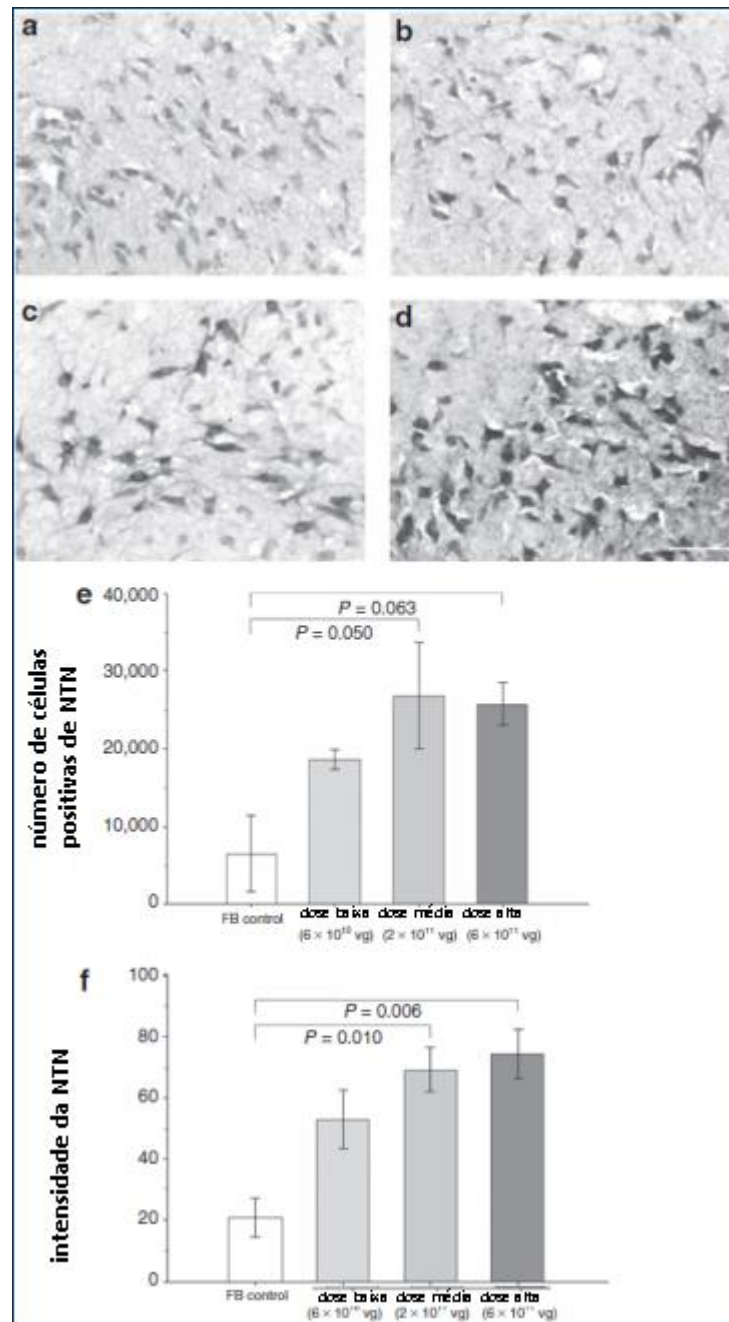
**Figura 27:** Relação dose – expressão de neurturina no *striatum*. Fotomicrografias da imunorreactividade de neurturina no caudado e no *putamen*, em animais injectados com: (a) solução controlo; (b) dose baixa, (c) dose média, (d) dose alta, de CERE-120. (e) Histograma ilustrando um aumento dose-dependente no volume médio de neurturina no *striatum*. **Abreviaturas:** Cd – Caudado; IC – Cápsula Interna; LV – Ventrículo Lateral; NTN – Neurturina; Pt – *putamen*. Fonte: adaptado de (76).

<sup>\*\*\*</sup> “*post hoc*”: Análise de dados após término da experiência.



Os resultados obtidos permitiram verificar um aumento de proteína NTN na SN *pars compacta* e *striatum*, assim como, o aumento da actividade da TH. Para além do mencionado, os exames toxicológicos extensivos não revelaram efeitos adversos, neurotoxicidade ou patologia sistémica. Com base nestes resultados, ensaios clínicos de fase I e II foram desenvolvidos pela “Ceregene Inc.” (San Diego, CA, EUA), envolvendo injeções intra-*putamen* da CERE-120, utilizando como vector o AAV2 recombinante (entre

ano 2005 e 2007). Na fase I, onde participaram 12 indivíduos com DP utilizou-se uma dose baixa ( $1.3 \times 10^{11}$  vg) [n = 6] e uma dose alta (quatro vezes maior) [n = 6].



**Figura 28:** Imunoreactividade da neurturina na substância nigra. Fotomicrografias da neurturina na substância nigra, dos animais que receberam (a) solução controlo, (b) dose baixa, (c) dose média, (d) dose alta, de CERE-120. Histogramas da quantidade de neurturina (e) e intensidade de neurturina (f). **Abreviaturas:** NTN – neurturina. Fonte: adaptado de (76).

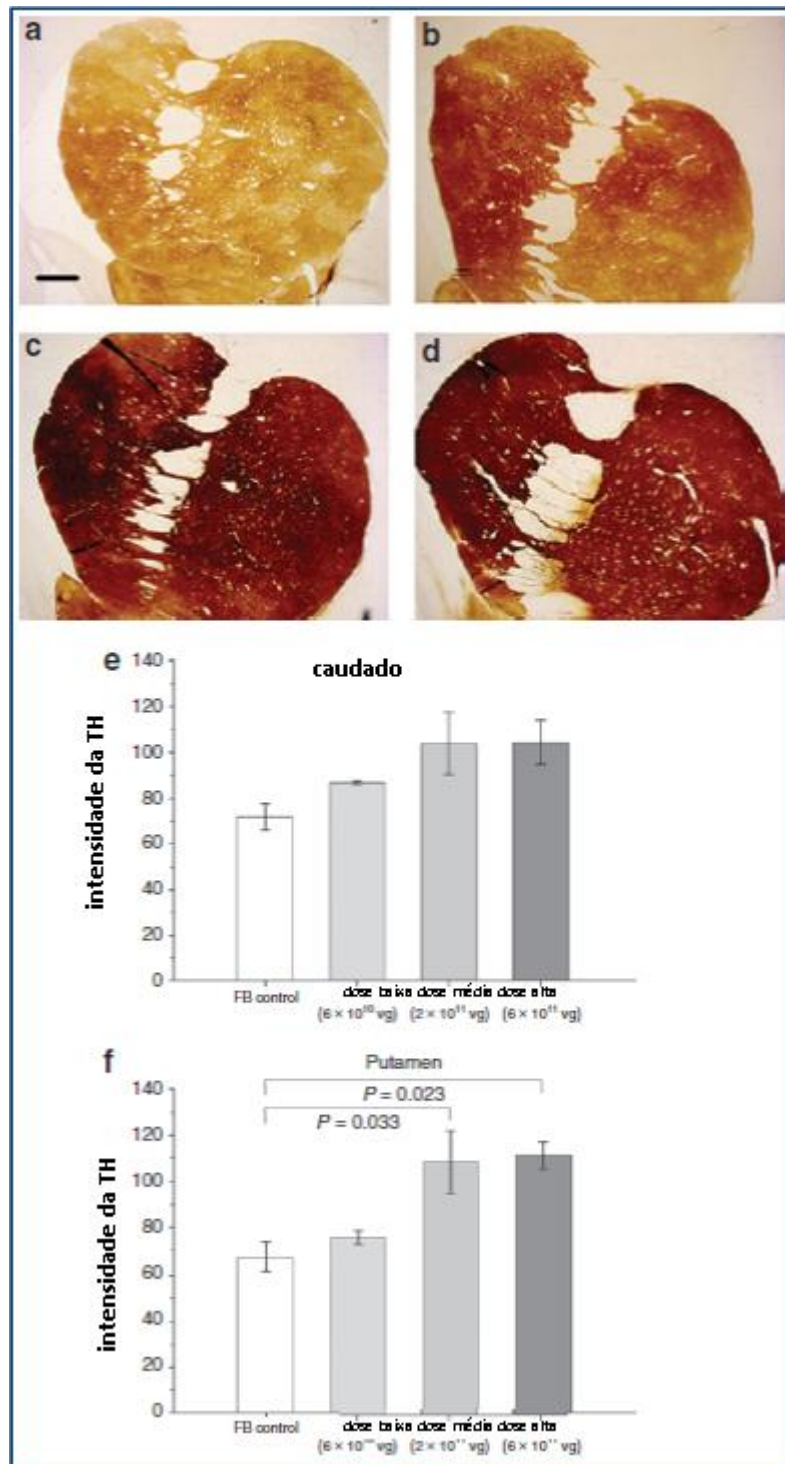


Os resultados deste estudo foram favoráveis em termos de segurança e tolerabilidade, observando-se algumas melhorias nos sintomas característicos da DP.<sup>57,58,59,64</sup>

Houve uma melhoria significativa de 36% na DP segundo a escala de UPDRS, não se registrando diferenças entre as duas doses utilizadas. Devido a estes resultados positivos, foi elaborado um ensaio clínico de fase II, multicêntrico e duplamente cego, onde participaram 58 indivíduos com DP idiopática bilateral em estado avançado.<sup>57,58,59,64</sup>

Lamentavelmente, em Novembro de 2008, a “Ceregene Inc.”, informou que o ensaio clínico de fase II não teve os resultados esperados, não demonstrando diferença significativa segundo o protocolo da escala de UPDRS entre os indivíduos

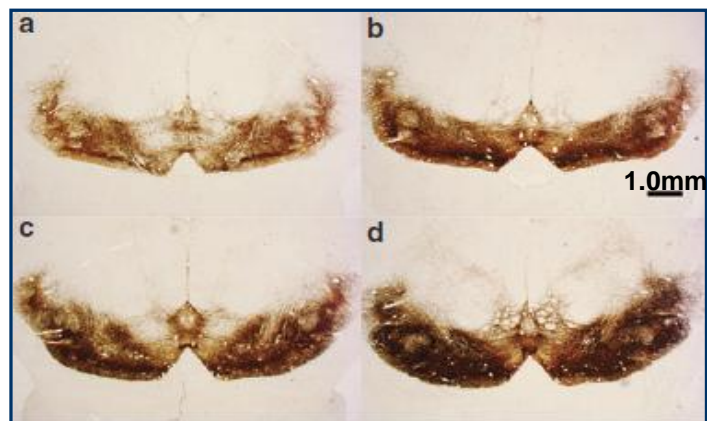
tratados e os sujeitos a placebo. Além disso, efeitos adversos graves foram detectados nos participantes do estudo.<sup>57,58,64,77</sup>



**Figura 29:** Imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase no *striatum*. Fotomicrografias da imunorreatividade: (a) com solução controle; (b) dose baixa; (c) dose média; (d) dose alta, de CERE-120. (e) Histograma ilustrando melhorias de intensidade de tirosina hidroxilase, no caudado e no *putamen*. **Abreviaturas:** TH – tirosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (76).

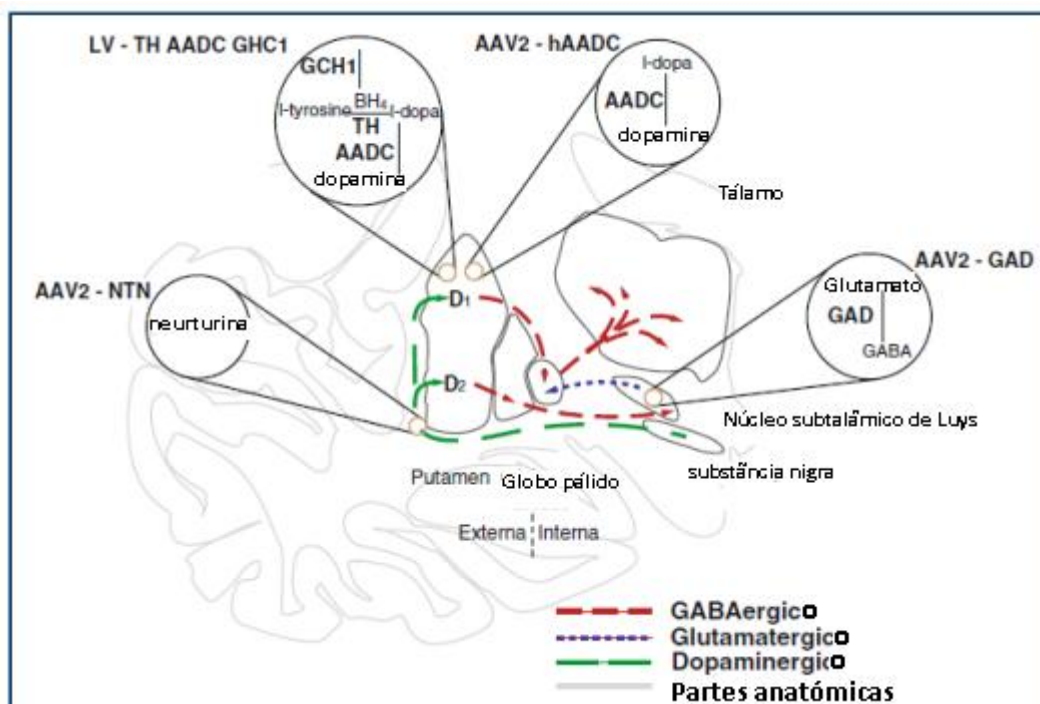


Contudo, mais tarde, 30 doentes foram novamente acompanhados clinicamente num estudo adicional duplamente cego, durante 18 meses, onde foram relatados efeitos modestos mas estatisticamente significativos segundo a escala UPDRS, com melhoria da função motora, sem efeitos adversos tão significativos.<sup>57,58,64,77</sup>



**Figura 30:** Imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase na substância nigra. Fotomicrografias da imunorreatividade: (a) com solução controlo; (b) dose baixa; (c) dose média; (d) dose alta, de CERE-120. Fonte: adaptado de (76).

Na Fig. 31 estão representados de maneira geral as intervenções da TG no tratamento da DP, referidas até este ponto do trabalho.



**Figura 31:** Ilustração dos locais de acção, vectores e transgenes dos ensaios clínicos da Terapia Génica no tratamento da doença de Parkinson. **Abreviaturas:** AADC - descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; AAV2 - vírus adeno-associado 2 ; GABA - ácido- $\gamma$ -aminobutírico; GAD - descarboxilase do ácido glutâmico; GCH1 - guanosina trifosfato ciclohidrolase 1; LV – lentivírus; NTN – neurturina; TH – tirosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (58).



#### 4.3.4. Terapia Génica como estratégia de libertação contínua de L-Dopa

Uma abordagem funcionalmente diferente das estratégias referidas anteriormente é a libertação contínua de L-Dopa.<sup>59</sup>

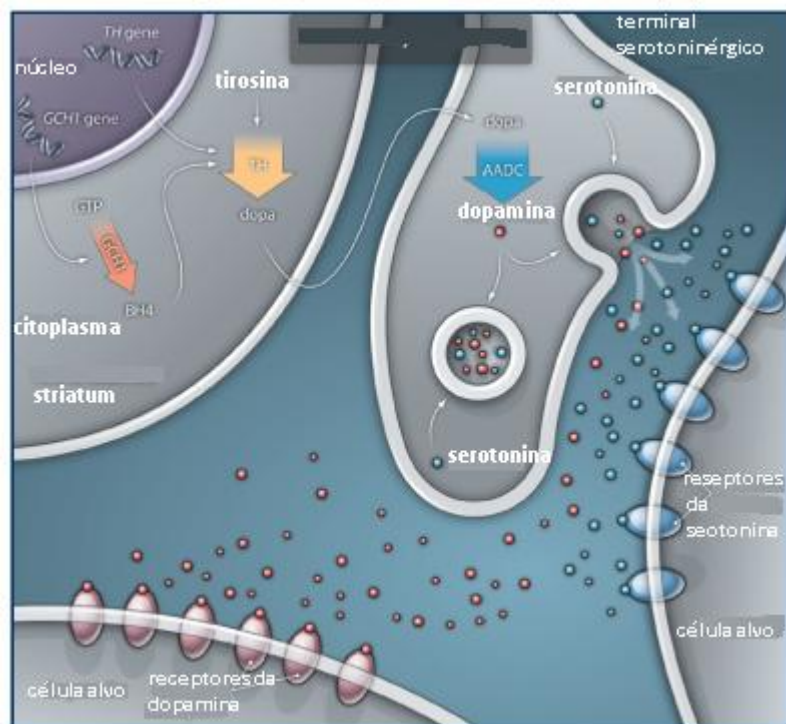
Esta estratégia utiliza a transferência de genes para a libertação contínua de L-Dopa ao contrário da síntese ectópica da mesma que está dependente da actividade endógena da DL-AA e transportador vesicular de monoamina 2 (TVMA2), para a conversão e libertação da dopamina nas células do *striatum*.<sup>59,64</sup>

A presença das enzimas da síntese da dopamina no *striatum*, não só nos axónios dopaminérgicos como também nos terminais serotoninérgicos permite a abordagem deste tipo de TG para a DP.

A desnervação serotoninérgica no *striatum* é menos significativa que a dopaminérgica em indivíduos com DP e portanto, pode funcionar como um meio alternativo de terapêutica.<sup>59,64</sup>

Ao separar-se a síntese da L-Dopa (neurónios do *striatum*) da síntese de dopamina (fibras serotoninérgicas), uma série de complicações podem ser evitadas como a necessidade de TH truncada ou risco de acumulação de dopamina intracelular no citosol, como ocorre nos estudos “Genzyme Inc.” e “Oxford BioMedica”, mencionados anteriormente.<sup>59,60,64</sup>

Estes problemas podem ser evitados com a utilização de duas únicas enzimas, nomeadamente, a GTP-C1 e TH nas células do *striatum*, por forma a produzir L-Dopa. Ao passo que a enzima DL-AA terá apenas uma acção endógena no terminal serotoninérgico, onde participa na conversão da L-Dopa em dopamina (Fig. 32).<sup>59,60,64</sup>



**Figura 32:** Terapia Génica de libertação contínua de L-Dopa. **Abreviaturas:** AADC ou DL-AA – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; GCH1 ou GTP-C1 – guanosina trifosfato ciclohidrolase; TH – tiosina hidroxilase. Fonte: adaptado de (60).

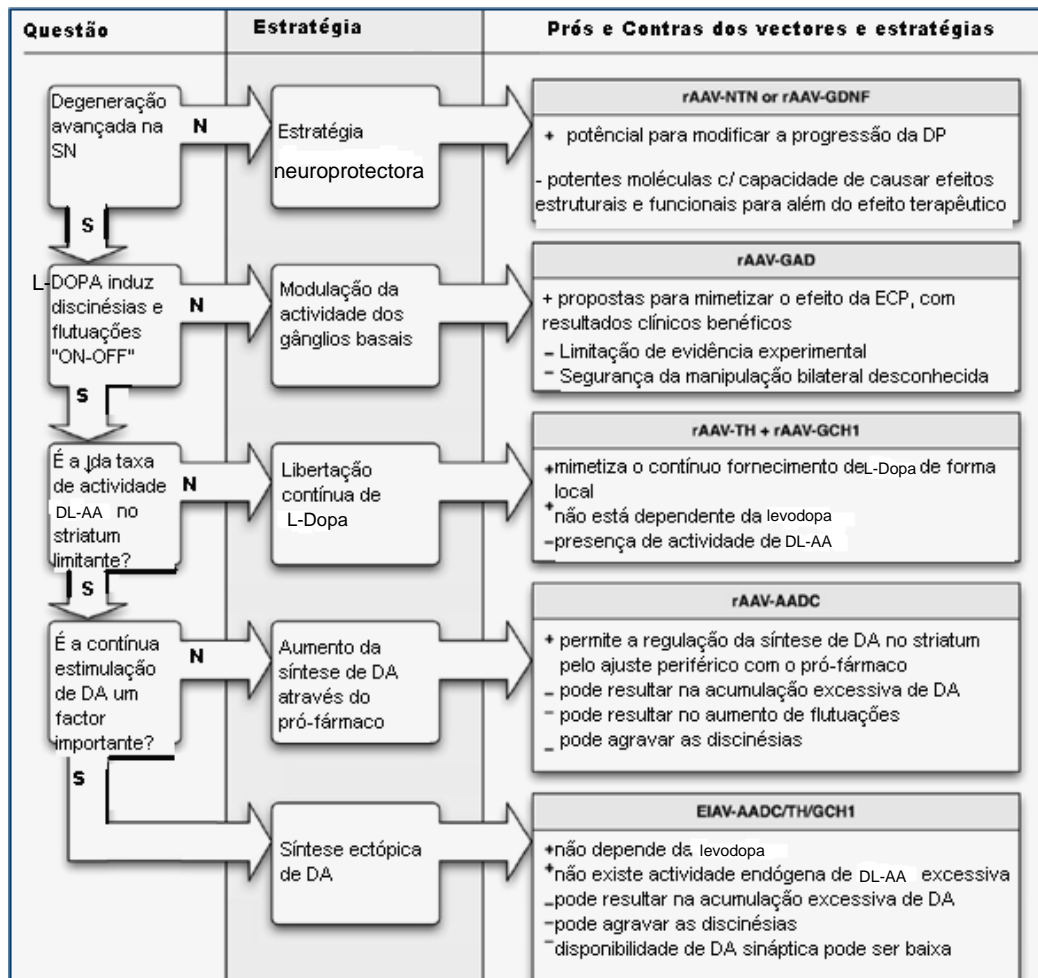


Kirik e seus colaboradores, utilizaram uma geração de vectores AAV com os genes TH e GTP-C1 e impoaram um limite terapêutico no *striatum* de roedores com desnervação parcial de dopamina (1,5pmol/mg de concentração de L-Dopa), por forma que esta concentração de L-Dopa estimula-se a produção de dopamina nas células serotoninérgicas. A estes níveis de síntese de L-Dopa contínua, os animais não só recuperam nos testes de rotação induzida por drogas, como também apresentam melhorias motoras. No entanto, tais melhorias foram mais proeminentes em animais com alguma inervação no *striatum* (10-20% normal) do que em animais com lesões completas (<5% de inervação residual).<sup>59,64</sup>

Carlsson e colaboradores, demonstraram em estudos efectuados em roedores induzidos com 6-OHDA, que a administração contínua de L-Dopa utilizando vectores AAV5 recombinantes, conseguia reverter as discinésias induzidas pela levodopa. Após a injeção no *striatum* dos vectores AAV5 contendo TH e GTP-C1, os movimentos discinésicos diminuíram gradualmente até serem reduzidos até 85%, sendo que a gravidade desses movimentos foi reduzida até cerca de 15%, 12 semanas após a injeção. Em quatro dos nove animais utilizados verificou-se a abolição completa das discinésias, tendo o sucesso deste tipo de TG sido comprovado por análises de PET.<sup>59,64</sup>

A entrega de L-Dopa contínua é uma estratégia atractiva que necessita de ser aprofundada, com o objectivo de ser testada a eficácia através de ensaios clínicos em seres humanos.<sup>64</sup>

A estratégia de escolha da TG mais adequada para a DP e os respectivos prós e contras, podem ser observadas no diagrama abaixo (Fig. 33).



**Figura 33:** Diagrama da escolha da estratégia de Terapia Génica mais indicada para o tratamento da doença de Parkinson. **Abreviaturas:** L-AAD – descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos; DA – dopamina; ECP – Estimulação Cerebral Profunda; GAD – descarboxilase do ácido glutâmico; GCH1 ou GTP-C1 - guanosina trifosfato ciclohidrolase; L-DOPA – levodopa; SN – substância nigra; TH – tirosina hidroxilase; rAAV ou AAV – vírus adeno-associado; EIAV – vírus equino baseado na anemia infecciosa. + -equivale a benéfico e – equivale a factor limitante. Fonte: adaptado de (64).

#### 4.3.5. Outras estratégias

##### 🚦 Gene “Parkina”

Embora a DP familiar represente menos de 5% dos casos de doença, os indivíduos que têm uma mutação autossómica recessiva, no gene da PINK-1 e Parkina, poderiam hipoteticamente ser candidatos ideais a TG.<sup>58</sup>

Estudos indicam que os sintomas da DP podem ser melhorados utilizando modelos transgênicos, através da reparação ou expressão de genes ausentes. Modelos de *Drosophila*



demonstraram que os parâmetros funcionais da Parkina e PINK-1 se sobrepõem, na medida que a super-expressão da primeira pode compensar a perda da segunda, resgatando a disfunção mitocondrial e a neurodegeneração dopaminérgica causada pela mutação da PINK-1.<sup>56,58</sup>

Observações clínicas, genéticas e neuropatológicas indicam que a  $\alpha$ -sinucleína em excesso é tóxica para os neurónios dopaminérgicos. Foram utilizados vectores virais de lentivírus e AAV, em roedores e primatas não humanos, para a entrega do gene normal ou “*wild type*” da Parkina na SN, protegendo-se assim o organismo contra a neurodegeneração e disfunção motora provocada pela  $\alpha$ -sinucleína. Contudo, os resultados obtidos não foram os esperados, verificando-se baixos níveis de transporte para a SN, não demonstrando a eficácia necessária.<sup>56</sup>

No entanto, continuam a ser desenvolvidos estudos em primatas (ex. *Macaca mulatta* ou Macaco-rhesus) deste tipo de estratégia, sendo que estas investigações podem levar ao desenvolvimento de ensaios clínicos promissores ao tratamento da DP familiar e esporádica.<sup>56,57,78</sup>

#### *Complexo I mitocondrial*

Através das informações recolhidas das pesquisas sobre os genes susceptíveis, bem como o mecanismo de acção das neurotoxinas utilizadas para modelar a DP, recolheram-se dados de suporte para a participação da disfunção mitocondrial e *stress* oxidativo na doença em causa.<sup>58</sup>

Foi proposto que os neurónios dopaminérgicos da SN são particularmente susceptíveis ao *stress* oxidativo devido à acumulação substancial de espécies oxidativas durante a síntese de dopamina.<sup>57,58</sup>

Foi iniciado um estudo para identificar um agente de TG reparador de um gene mitocondrial, nomeadamente, uma variante genética do complexo I mitocondrial isolado de *S. cerevisiae*. O gene correspondente a uma oxirredutase NADH-quinona rotenona insensível. A utilidade deste agente necessita de uma maior avaliação em modelos animais, mas teoricamente intervem nos processos de neurodegeneração.<sup>58</sup>

Verificou-se também que a actividade da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GPX1) tem acção neuroprotectora, em roedores cuja DP foi induzida com 6-OHDA. Tais resultados sugeriram um efeito benéfico da TG através da entrega de moléculas antioxidantes.<sup>55</sup>



#### ✚ Terapia génica anti-apoptótica

Existe uma evidência crescente que a morte celular programada (apoptose) é um mecanismo celular chave, da morte dos neurónios na DP. Dados não clínicos obtidos em modelos animais sugerem que a apoptose poderia ser suprimida pela expressão de genes *in vivo* de factores anti-apoptose, como inibidores de proteínas de apoptose.<sup>66</sup>

O citocromo C libertado da mitocôndria promove a activação da Caspase-9 através do factor de activação de protease apoptótica 1 (Apaf1). Estudos recentes demonstraram que a actividade anti-apoptótica utilizada na TG da DP era capaz de impedir a toxicidade provocada pelo MPTP, através de um vector AAV onde foi incorporado um inibidor do Apaf1.<sup>56,66</sup>

Noutro estudo a transferência com adenovírus de genes de um inibidor da proteína caspase, inibidor do cromossoma X ligado a um inibidor da apoptose, também impediu o MPTP de induzir a morte celular dos neurónios dopaminérgicos da SN, em roedores.<sup>56,66</sup>

Uma questão que se põe neste tipo de terapia é a possibilidade de oncogénese.<sup>66</sup>

#### ✚ Doxiciclina e o sistema promotor regulável

Nas próximas décadas, as abordagens de TG para o tratamento da DP, irão utilizar vectores reguláveis. No entanto, até ao ano 2007, nenhum sistema regulável foi considerado seguro ou eficaz. O promotor regulável que mais amplamente tem sido estudado é o sistema de Tetraciclina. Este sistema insere um elemento regulável, dependente de tetraciclina, no vector de construção, de modo que a administração de tetraciclina, doxiciclina, ou análogos, pode ligar (“*tet-on*”) ou desligar (“*tet-off*”) a expressão do transgene.<sup>61,74</sup>

Utilizando um sistema “*tet-on*”, seria necessário a administração de antibiótico por via oral, para manter a expressão do transgene. Caso ocorram efeitos secundários, teoricamente, poderia-se parar a administração de antibiótico e impedir a expressão.<sup>74</sup>

Por outro lado, utilizando o sistema “*tet-off*”, os doentes só tomariam antibiótico caso se verificassem efeitos secundários e assim teoricamente ocorreria o bloqueio da expressão do transgene.<sup>74</sup>

Neste tipo de abordagem a questão que se coloca são efeitos adversos destes antibióticos quando tomados a longo prazo.<sup>74</sup>

Latta-Mahieu e Fabre, verificaram que a aplicação destas abordagens em primatas poderia ser tóxica, activando a resposta imune e inflamatória. Na verdade, todos os estudos



desenvolvidos de sistemas de transferência de genes reguláveis exigem a expressão de uma “proteína reguladora”, que ironicamente, expressa uma forma não regulada.<sup>74</sup>

#### **4.4. Limitações e aprovação pela “Food and Drug Administration” ou pela “European Medicines Agency”**

Existem várias limitações ao uso deste tipo de terapia. Desta forma, o medo do desconhecido a cada nova abordagem de TG que surge, não é de todo, uma preocupação insignificante.<sup>61</sup>

Uma das principais limitações da TG na DP são os riscos dos vectores virais para o cérebro, nomeadamente, os efeitos tóxicos sobre as células, a resposta imune que pode levar a inflamação, o dano neuronal e a possibilidade de activação de oncogenes.<sup>74,79</sup>

Uma segunda causa de preocupação é o possibilidade do transgene induzir neurotoxicidade grave.<sup>74</sup>

Outra limitação que se coloca neste tipo de terapia, é o facto dos neurónios transfectados com o gene terapêutico continuarem a expressar a proteína de forma contínua. Tal facto, pode ser uma solução boa, na medida que se obtém uma terapia a longo prazo, ou um problema devido ao risco de desenvolvimento de efeitos adversos graves.<sup>61</sup>

A segurança e a eficácia da TG precisam de ser devidamente comprovadas, sendo que os custos relativos a estas terapias é outra limitação que se coloca.<sup>58</sup>

Nos ensaios de TG em curso os participantes têm plena consciência *à priori* dos riscos que correm. Como em qualquer estudo, os participantes devem assinar um consentimento informado.<sup>74</sup>

Devido a estas limitações, as questões de segurança são cuidadosamente exploradas e avaliadas pela FDA nos EUA e EMA na Europa. Nenhuma TG para a DP foi aprovada até à actualidade para utilização clínica pela FDA ou EMA.<sup>80,81</sup>

#### **4.5. Perspectivas futuras da Terapia Génica na doença de Parkinson**

Apesar dos avanços na compreensão da DP e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, esta doença continua a ser um dos mais incapacitantes distúrbios na população idosa. O diagnóstico precoce, a selecção do tratamento adequado, a correcta dose, o



acompanhamento, o controle dos efeitos adversos, o uso oportuno do tratamento cirúrgico, e educação do paciente, são factores que influenciam a qualidade de vida dos doentes.<sup>1</sup>

A TG é um novo paradigma para o tratamento da DP e que mantém a promessa de cumprir tal papel. Este tipo de terapia abre portas a objectivos mais precisos, de longa duração e de intervenções alternativas, oferecendo esperança aos doentes e profissionais de saúde.<sup>82</sup>

A questão da regulação da TG na DP, surge como uma grande discussão e levou ao início do desenvolvimento de estudos nesse sentido. Assim, o surgimento de novas ferramentas moleculares, como pequenas moléculas de RNA interferência (em formato de “*hairpin*”), RNA *silencing* e outras ferramentas associadas oferecem a possibilidade de regulação da expressão dos genes alvo. Contudo, serão necessários vários anos até que qualquer sistema regulável esteja pronto para uso clínico.<sup>66,74,83</sup>

Como consequência dos avanços tecnológicos e conceituais, nos próximos anos prevê-se uma explosão de publicações nesta área. As abordagens neuroprotectoras e neurorestruturativas, provavelmente começaram a utilizar doentes nos estadios iniciais da DP, uma vez que na fase final o efeito é limitado.<sup>66</sup>

A TG irá permitir a entrega de moléculas complexas ou enzimas para regiões específicas do cérebro, a taxas constantes. A distribuição de proteínas de interesse, pode ser otimizada especificamente para cada doente, controlando o volume de injeção e a concentração do vector.<sup>64</sup>

No futuro, os farmacêuticos e outros clínicos, terão uma infinidade de informações a analisar e a avaliar, segundo este tipo de abordagem.<sup>28</sup>

## 5. Conclusão

De acordo com os objectivos propostos depreende-se com este trabalho que a DP é uma doença neurodegenerativa com complicações graves, que afecta milhões de pessoas no mundo. Desta forma, requer uma nova terapia para o seu tratamento uma vez que os actuais tratamentos apenas controlam os sintomas da doença. As terapias farmacológicas são incapazes de impedir ou reverter a progressão da perda de neurónios dopaminérgicos. Embora eficaz nos estágios iniciais da DP, a terapia sintomática perde a eficácia ao longo do tempo devido ao desenvolvimento de efeitos adversos e a problemas farmacocinéticos e farmacodinâmicos.



Actualmente muitas pesquisas de TG têm sido desenvolvidas com o intuito de curar a DP, no entanto, nenhuma é completamente satisfatória.

Embora muitos dos resultados obtidos tenham demonstrado ser efectivos em modelos animais, nem sempre o sucesso é alcançado nos seres humanos, principalmente devido às diferenças biológicas entre as espécies. Contudo, alguns ensaios clínicos foram desenvolvidos em seres humanos, onde se obtiveram resultados bastante positivos.

Depreende-se que ainda existem muitas limitações quanto à utilização da TG tanto ao nível das técnicas usadas e como ao nível ético.

Apesar do objectivo máximo de obter um tratamento definitivo e permanente para a DP ser o ideal, a aplicação da TG ainda reside num futuro mais ou menos distante. Os métodos usados são muito promissores mas ainda é necessário pesquisa adicional. A terapia génica tem potencial para ser uma opção terapêutica segura e eficaz num futuro próximo.



## 6. Referências Bibliográficas

- (1) Khatri IA., Chaudhry US. Parkinson's Disease-A Review. Pak J Neurol Sci. 2009; 4(1):33-43.
- (2) Medifocus [página web]. Medifocus Guidebook on Parkinson's Disease; c2011 [atualizado em 18 de Março 2011]. Disponível em: <http://www.parkinsonsdiseaseguidebook.com/2009/landing.php?gidNR013&a=a&assoc=Google&keyword=parkinsons>
- (3) Pickard S. "Life with Parkinson's". European Parkinson's Disease Association; 2008. p. 44-63.
- (4) Toulouse A., Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease-Where do we stand?. Progress in Neurobiology. 2008; 85:376-392.
- (5) Miniet RSG., Fraguera EG. Terapia Genica. Perspectivas y Consideraciones Eticas en Relacion con su Aplicacion. Rev haban cienc méd. La Habana. 2008; Vol VII N° 1, ene-mar.
- (6) Lim E. A Walk Through the Management of Parkinson's Disease. Ann Acad Med Singapore. 2005;34:188-95.
- (7) Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007; 79:368-376.
- (8) Levy A., Ferreira J. Doença de Parkinson – Manual Prático. Lidel, Edições técnicas, lda; Nov, 2003. p. 3-77; 189-223; 237-246; 287-291.
- (9) Lees AJ., Mandy J., Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009; 373:2055-66.
- (10) Davie CA. A review of Parkinson's disease. British Medical Bulletin. 2008; 86:109-127.
- (11) National Institute of Neurological Disorders and Stroke [página web]. Parkinson's Disease: Hope Through Research; c2010 [atualizado em 22 de Novembro 2010]. Disponível em: [http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons\\_disease/detail\\_parkinsons\\_disease.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons_disease/detail_parkinsons_disease.htm)
- (12) Bacheschi LA, Nitrini R. A Neurologia que todo Médico deve saber. Parte II Capítulo 14. São Paulo: Atheneu; 2005. p.297-313.
- (13) Gilman AG., Hardman JG., Limbird LE. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2003. p.411.419.
- (14) Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson [página web]. Conheça o Sistema Nervoso Central; c2008 [atualizado em 15 de Maio 2008]. Disponível em: <http://www.parkinson.pt/?lop=conteudo&op=577bcc914f9e55d5e4e4f82f9f00e7d4&id=0537fb40a68c18da59a35c2bfe1ca554>
- (15) Fitzpatrick KM., Raschke J., Emborg AE. Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. Antioxid. Redox Signal. 2009; 11: 2189-2208.



- (16) Lemke MR., Raethjen J. “Depression and Parkinson’s Disease - pathophysiology, diagnosis, treatment”. Uni-Med; 2007. p. 18-51.
- (17) Barbiero JK. Administração aguda mas não crônica de Pioglitazona promoveu efeitos protetores comportamentais e neuroquímicos no modelo de MPTP da doença de Parkinson [monografia na internet]. Curitiba: Paraná; 2010. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/24047/JANA%201.pdf?sequence=1>
- (18) Parkinson’s Disease Foudation [página web]. What is Parkinson’s Disease?. 2010. Disponível em : [http://www.pdf.org/en/about\\_pd](http://www.pdf.org/en/about_pd)
- (19) Alves G., Forsaa EB., Pedersen KF., et al. Epidemiology of Parkinson’s disease. J Neurol. 2008; 255 : 18-32.
- (20) Paraquato e Parkinson [página web]. Doença de Parkinson. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2005-2006. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/paraquato/parkinson.html>
- (21) Obeso JA., Rodriguez-Oroz MC., Goetz CG., et al. Missing pieces in the Parkinson’s disease puzzle. Nature Medicine. 2010 16 : 653-659.
- (22) Ulusoy A., Bjorklund T., Hermening S., et al. In vivo gene delivery for development of mammalian models for Parkinson’s disease. Experimental Neurology. 2008; 209:89-100.
- (23) Bras JM., Singleton A. Genetic Susceptibility in Parkinson’s Disease. Biochim Biophys Acta. 2009; 1792(7) : 597-603.
- (24) Gasser T. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. Expert Reviews in Molecular Medicine. 2009; 11; e22 : 1-14.
- (25) Hardy J., Lewis P., Revesz T., et al. The genetics of Parkinson’s syndromes: a critical review. Current Opinion in Genetics & Development. 2009; 19 : 254-265.
- (26) Moore DJ. The biology and pathobiology of LRRK2: Implications for Parkinson’s disease. Parkinsonism and Related Disorders. 2008; 14 : 92-98.
- (27) Sen S., West AB. The Therapeutic Potential of LRRK2 and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson’s Disease. Antioxidants & Redox Signaling. 2009; 11 : 2167-2187.
- (28) Zeiss KA., Mhyre TR., Federoff HJ. Gazing into the future: Parkinson’s disease gene therapeutics to modify natural history. Experimental Neurology. 2008; 209 : 101-113.
- (29) Inamdar NN., Arulmozhi DK., Tandon A., et al. Parkinson’s Disease: Genetics and Beyond. Current Neuropharmacology. 2007 5 : 99-113.
- (30) Monique L., Giroux MD. Parkinson disease: Managing a complex, progressive disease at all stages. Cleveland Clinic Journal of Medicine. 2007; vol.74, N°5, 313-328.



- (31) Parkinson Disease CME [página web]. Introduction; Advances in Pharmacotherapy for PD; Progress in identifying early signs and symptoms of PD. Disponível em: <http://www.parkinsonsdiseasecme.com/cme-modules/future-of-parkinsonsdisease/advances-in-pharmacotherapy.html>
- (32) SchoolWorkHelper [página web]. Parkinson's Disease: Symptoms & Inheritance. Disponível em: <http://schoolworkhelper.net/2011/02/parkinson%E2%80%99s-disease-symptoms-inheritance/>
- (33) Caramona, Esteves M, Gonçalves AP., et al. *Prontuário Terapêutico - 9*. Infarmed; 2010. p.77-83.
- (34) Wu, Stacy S.; Frucht, Steven J. Treatment of Parkinson's Disease: What's on the Horizon? *CNS Drugs*, Vol 19(9), 2005, 723-743. doi: 10.2165/00023210-200519090-00001
- (35) Ferraz H.; Azevedo-Silva S. Apomorfina – Uma alternativa no controle das flutuações motoras na doença de Parkinson. *Neuropsiquiatr.* [série na internet]. 1995; 53(2): 245-251.
- (36) Stacy M. Medical Treatment of Parkinson Disease. *Neurol Clin* [série na internet]. 2009; 27 : 605-631.
- (37) Black KJ., Koller JM., Campbell MC, et al. Quantification of Indirect Pathway Inhibition by the Adenosine A2a Antagonist SYN115 in Parkinson Disease. *The Journal of Neuroscience*. 2010; 30(48) : 16284: 16292.
- (38) LeWitt PA., Taylor DC. Protection Against Parkinson's Disease Progression: Clinical Experience. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc.* 2008; 5 : 210-225.
- (39) Gene Therapy. Disponível em: <http://www.genetics.edu.au/pdf/factsheets/fs27.pdf>
- (40) American Society of Gene & Cell Therapy [página web] Learn About Gene Therapy; c2011. Disponível em: [http://www.asgct.org/about\\_gene\\_therapy/defined.php](http://www.asgct.org/about_gene_therapy/defined.php)
- (41) Pereira N. Vectores em Terapia Génica: A boleia do gene. Disponível em: <http://www1.ci.uc.pt/rnam/artigos/001.htm>
- (42) Genetics Home Reference. Handbook Gene Therapy. 2010 [acedido em 27 de Novembro 2010]. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/therapy.pdf>
- (43) Dani SU. Terapia Gênica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*; 28-33.
- (44) Liga de neurocirurgia [página web] Método de transfecção para a Terapia Gênica; c2005. Disponível em: [http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia\\_id=200&materiaver=1](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=200&materiaver=1)
- (45) Ronchera CL., Gonzalez JM. Terapia Génica. *Farmacia Hospitalaria*. Disponível em: <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf>



- (46) Nardi NB., Teixeira LAK., Silva EFA. Terapia gênica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 109-116.
- (47) Valle D. Genética e Doença. In: Fauci, Braunwald, Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, et al, Harrison Medicina Interna. 14ª ed. Volume I. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda; 1998. p. 431-433.
- (48) Ribeiro C. O medicamento e a sua prescrição. In Esteves A, Mota A, Matias A, Sebastião A, Teixeira A, Gouveia A, et al, Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas. 4ª ed. Porto: Porto Editora; 2004. p.1245-1252.
- (49) Gene Therapy in Germany. An Interdisciplinary Survey. Supplement of the German Gene Technology Report.
- (50) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [página web]. Charts&Tables; c2007 [atualizado em Março 2011; acessado em 18 de Março 2011]. Disponível em: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- (51) Rozalen J., Gomez FJF., Cena V, et al. Aplicaciones de la terapia génica. Âmbito Farmacêutico.
- (52) Human Genome Project Information [página web]. Gene Therapy; c2009 [atualizado em 11 de Junho 2009]. Disponível em: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml)
- (53) Penque D. Terapia Génica: um Objectivo ou uma Realidade?. Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações.
- (54) European Medicines Agency [página web]. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=search.jsp&q=Gene+therapy&btnG=Search&menu1=menus%2Fregulations%2Fregulations.jsp&mid=>
- (55) Kaplitt MG. Another Player in Gene Therapy for Parkinson Disease. Nature Reviews Neurology. 2010
- (56) Mochizuki H., Yasuda T., Mouradian MM. Advances in Gene Therapy for Movement Disorders. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 2008; 5 : 260-269.
- (57) Feng LR., Zeiss KAM. Gene Therapy in Parkinson's Disease. CNS Drugs. 2010; 24(3) : 177-192.
- (58) Berry AL., Foltynie T. Gene therapy: a viable therapeutic strategy for Parkinson's disease? J Neurol. 2010.
- (59) Bjorklund T., Kordower JH. Gene Therapy for Parkinson's Disease. Movement Disorders. 2010; 25 : 161-173.
- (60) Bjorklund A., Bjorklund T., Kirik D. Gene Therapy for Dopamine Replacement in Parkinson's Disease. ScienceTranslationalMedicine. 2009; 1 : 1-5.
- (61) Lawlor PA., During MJ. Gene Therapy for Parkinson's disease. Expert reviews. 2004; 6 : 1-18.



- (62) Bartus RT., Herzog CD., Bishop K., et al. Issues regarding gene therapy products for Parkinson's disease: The development of CERE-120 (AAV-NTN) as one reference point. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2007; 13 : s469-s477.
- (63) Fiandaca M., Forsayeth J., Bankiewicz K. Current status of gene therapy trials for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2007; 209 : 51.57.
- (64) Bjorklund T., Kirik D. Scientific rationale for the development of gene therapy strategies for Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica*. 2009; 1792 : 703-713.
- (65) Jarraya B., Boulet S., Ralph GS., et al. Dopamine Gene Therapy for Parkinson's Disease in a Nonhuman Primate Without Associated Dyskinesia. *Sci Trans Med*. 2009; 1 : 1-11.
- (66) Porras G., Bezaud E. Preclinical development of gene therapy for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2007; 209 : 72-81.
- (67) Christine CW., Starr PA., Larson PS., et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. 2009; 73:1662-1669.
- (68) Eberling JL., Jagust WJ., Christine CW., et al. Results from phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. 2008; 70(21) : 1980-3.
- (69) Biomedica [página web]. Oxford Biomedica Announces two-year Phase I/II Results of ProSavin in Parkinson's Disease; c2011 [actualizado em 2011]. Disponível em: <http://www.oxfordbiomedica.co.uk/page.asp?pageid=59&newsid=259>
- (70) Kaplitt MG., Feigin A., Tang C., et al. Safety and Tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*. 2007; 369 : 2097-105.
- (71) Chapter 21. Non Viral Transfection. Disponível em: [http://www.phys.sinica.edu.tw/TIGP-NANO/Course/2006\\_Spring/classnotes/Nanobio%20051206.pdf](http://www.phys.sinica.edu.tw/TIGP-NANO/Course/2006_Spring/classnotes/Nanobio%20051206.pdf)
- (72) Lim ST., Airavaara M., Harvey BK. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: A gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS. *Pharmacological Research*. 2010; 61 : 14-26.
- (73) Isacson O., Kordower JH. Future of Cell and Gene Therapies for Parkinson's Disease. *Ann Neurol*. 2008; 64(suppl) : 122-138.
- (74) Kordower JH., Olanow CW. Regulatable promoters and gene therapy for Parkinson's disease: Is the only thing to fear, fear itself? *Experimental Neurology*. 2008; 209 : 34-40.
- (75) Zang Y., Pardridge WM. Near Complete Rescue of Experimental Parkinson's Disease with Intravenous, Non-viral GDNF Gene Therapy. *Pharmaceutical Research*. 2009; 26 : 1059- 1063.



- (76) Herzog CD., Dass B., Gasmi M. Transgene Expression, Bioactivity, and Safety of CERE-120 (AAV2-Neurturin) Following Delivery to the Monkey Striatum. *Molecular Therapy*. 2008; 16 : 1737-1744.
- (77) Marks WJ., Bartus RT., Siffert J., et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*. 2010; 9 : 1164-72.
- (78) Mochizuki H. Parkin gene therapy. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2009; 1 : 43-45.
- (79) Svendsen C. The first steps towards gene therapy for Parkinson's disease. *Reflection and Reaction*. 2007; vol6.
- (80) Havert MB. A regulatory perspective on the development of gene therapy for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 2008; 209 : 48-50.
- (81) FDA US Food and Drug Administration [página web]. Approved Products ; c2010 [actualizado em 29 de Abril 2010] . Disponível em: <http://www.fda.gov/Biologics/BloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/default.htm>
- (82) Lewis TB., Standaert DG. Design of clinical trials of gene therapy in Parkinson disease. *Experimental Neurology*. 2008; 209 : 41-47.
- (83) Cress DE. The need for regulatable vectors for gene therapy for Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*. 2008; 209 : 30-33.