

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Doença de Parkinson: o papel do stress oxidativo e o potencial do uso da glutathiona como estratégia terapêutica

Mariana da Silva Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Ana Isabel Azevedo Serralheiro

2023



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Doença de Parkinson: o papel do stress oxidativo e o potencial do uso da glutatona como estratégia terapêutica

Mariana da Silva Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Ana Isabel Azevedo Serralheiro

2023

Doença de Parkinson: o papel do stress oxidativo e o potencial do uso da glutatona como estratégia terapêutica

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos que consta da listagem de referências incluída.

(Mariana Da Silva Fernandes)

Copyright © 2023 Mariana Da Silva Fernandes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha mãe por me apoiar e incentivar a ultrapassar todos os obstáculos e desafios ao longo destes 5 anos. À minha avó Palmira que sempre me apoiou, que luta diariamente com esta patologia e a quem dedico esta minha dissertação.

Aos meus tios e primos, que mesmo longe, me apoiaram incondicionalmente durante toda esta minha caminhada.

A todos os meus amigos e a todos os que este curso me proporcionou, foram fundamentais para estes serem os melhores anos da minha vida. Às minhas madrinhas de curso, que tão bem me acolheram, agradeço por todos os momentos, toda a paciência e todo o suporte que me deram desde o início.

À Feminis Ferventis – Tuna Académica Feminina da Universidade do Algarve, por todas as aventuras e experiências e por todos os valores e ensinamentos que levo comigo e me enriqueceram tanto enquanto pessoa.... Foi sem dúvida uma decisão que melhorou o meu percurso académico.

A toda a equipa da Farmácia Lagoa, que durante 4 meses, me ajudou a aprofundar os meus conhecimentos e por todo o carinho e paciência, proporcionando-me um estágio espetacular.

Por fim, mas não menos importante, à minha orientadora, Professora Doutora Ana Serralheiro, o meu mais sincero agradecimento por toda a disponibilidade, apoio e paciência que demonstrou nesta minha última etapa no curso de MICF.

A todos os que de alguma forma contribuíram para que tivesse a melhor experiência académica, o meu muito obrigada!

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma doença de progressão lenta, caracterizada pela presença de sintomas motores e não motores, tendo vindo a apresentar uma elevada prevalência entre as diferentes doenças neurodegenerativas. Trata-se de uma doença de fisiopatologia multifatorial, sendo a neurodegeneração dopaminérgica e consequente diminuição dos níveis cerebrais de dopamina, a teoria mais aceite. Muitos estudos apontam o stress oxidativo (SO) como um dos fatores centrais na patogénese deste tipo de doenças, tipicamente caracterizadas por níveis elevados de espécies reativas assim como insuficiente capacidade de resposta dos sistemas antioxidantes. O SO parece estar interligado com diversos fatores implícitos na progressão da patologia tais como, a presença de disfunções mitocondriais, alterações no metabolismo da dopamina, excitotoxicidade e acumulação de ferro, fatores estes que contribuem para o desenvolvimento da DP.

A glutathione é um potente antioxidante, de elevada abundância no nosso organismo, estando envolvida em processos neuroprotetores como o controlo do SO e consequente equilíbrio redox, atuando ainda em processos de regulação da morte celular. Muitos têm sido os estudos realizados com o intuito de avaliar os efeitos benéficos da suplementação deste antioxidante na DP na melhoria da sintomatologia e progressão da doença. Substâncias como a N-acetilcisteína, a piridoxina, a serina e a vitamina E têm sido estudadas pela sua capacidade, direta ou indiretamente, de aumentar os níveis de glutathione.

As terapias atuais utilizadas na DP não contribuem para a inibição da progressão da doença, pelo que o estudo de novas estratégias terapêuticas é de extrema relevância. Deste modo, a presente dissertação centra-se na revisão da informação existente sobre a contribuição do processo de SO na patogénese da DP, e na aferição do potencial do uso da glutathione como estratégia terapêutica tendo como alvo a diminuição da degeneração dopaminérgica inerente à patologia.

Palavras-chave: Antioxidantes, Doença de Parkinson, Dopamina, Estratégia Terapêutica, Glutathione, Stress Oxidativo.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a disease of slow progression, characterized by the presence of motor and non-motor symptoms, and has been presenting a high prevalence among the different neurodegenerative diseases. It is a disease with a multifactorial pathophysiology, with dopaminergic neurodegeneration and the consequent decrease in brain levels of dopamine being the most widely accepted theory. Many studies point out the oxidative stress (OS) as one of the central factors in the pathogenesis of this type of diseases, typically characterized by high levels of reactive species as well as insufficient responsiveness of antioxidant systems. OS seems to be interconnected with several factors implicit in the progression of the disease such as the presence of mitochondrial dysfunctions, changes in dopamine metabolism, excitotoxicity and iron accumulation, all of which contribute to the development of PD.

Glutathione is a powerful antioxidant, of high abundance in our body, being involved in neuroprotective processes such as the control of OS and the consequent redox balance, as well as acting in the regulation of cell death. Many studies have been carried out with the aim of evaluating the beneficial effects of this antioxidant supplementation in PD for the improvement of symptoms and disease progression. Substances such as N-acetylcysteine, pyridoxine, serine and vitamin E have been studied for their ability, directly or indirectly, to increase glutathione levels.

The current therapies used in PD do not contribute to inhibiting the progression of the disease, therefore, the study of new therapeutic strategies is extremely relevant. Thus, this dissertation focuses on reviewing existing information on the contribution of the OS process to the pathogenesis of PD, and on assessing the potential use of glutathione as a therapeutic strategy aimed at reducing the dopaminergic degeneration inherent to the pathology.

Keywords: Antioxidants, Parkinson's disease, Dopamine, Therapeutic Strategy, Glutathione, Oxidative Stress.

Índice

Índice de Figuras	xii
Índice de Quadros	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
1. Secção Introdutória	1
1.1 Introdução	1
1.2 Metodologia	3
2. Doença de Parkinson	4
2.1 Nota Histórica	4
2.2 Epidemiologia	5
2.3 Tipos de Doença de Parkinson	6
2.4 Fisiopatologia e Patogénese	7
2.4.1 Circuito dos Gânglios Basais	7
2.4.2 A Proteína alfa-sinucleína	10
2.5 O Stress Oxidativo	11
2.5.1 Agentes Oxidantes	12
2.5.2 Agentes Antioxidantes	15
2.6 O Papel do Stress Oxidativo na Doença de Parkinson	16
2.6.1 Disfunção Mitocondrial	17
2.6.2 Excitotoxicidade	18
2.6.3 Metabolismo da Dopamina	19
2.6.4 Acumulação de Ferro	21
2.7 Fatores de risco	21
2.7.1 Genéticos	22
2.7.2 Ambientais	23
2.8 Sintomatologia	24
2.8.1 Sintomas motores	25
2.8.2 Sintomas não motores	26
2.9 Diagnóstico	28
3 Abordagem Terapêutica da Doença de Parkinson	30
3.1 Levodopa	30
3.2 Agonistas da Dopamina	31
3.3 Anticolinérgicos	33
3.4 Inibidores seletivos da monoaminoxidase B	34

3.5	Inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT).....	35
3.6	Amantadina	37
4.	Uso de Glutathione na Abordagem Terapêutica	38
4.1	Estrutura da glutathione.....	38
4.2	Síntese e metabolismo da glutathione.....	39
4.3	Mecanismos de ação da glutathione.....	40
4.4	Potencial do uso da glutathione na Doença de Parkinson	41
5.	Substâncias que Interferem com os Níveis de Glutathione	45
5.1	N-acetilcisteína	45
5.2	Piridoxina.....	48
5.3	Serina.....	50
5.4	Vitamina E	51
6.	Conclusão	52
7.	Referências Bibliográficas.....	54

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Comparação do circuito dos gânglios basais em uma situação normal e na Doença de Parkinson.....	9
Figura 2.2 – Aspeto histológico da agregação da proteína α -sinucleína formando os corpos de Lewy.	11
Figura 2.3 – Representação da reação química de geração do anião superóxido.	12
Figura 2.4 – Geração de ROS e RNS pela reação de Haber-Weiss (A), pela reação de Fenton (B) ou pela decomposição do peroxinitrito (C).....	13
Figura 2.5 – Representação da reação química de geração do óxido nítrico.	14
Figura 2.6 – Representação simplificada do metabolismo da dopamina.	20
Figura 3.1 - Representação das estruturas químicas do neurotransmissor dopamina e da L-DOPA, um pró-fármaco que após biotransformação endógena dá origem à dopamina.	31
Figura 3.2 - Representação das estruturas químicas de alguns agonistas da dopamina.	32
Figura 3.3 - Representação da estrutura química de anticolinérgicos.	33
Figura 3.4 - Representação das estruturas químicas de inibidores seletivos da MAO-B.	34
Figura 3.5 - Representação das estruturas químicas de inibidores da COMT.	35
Figura 3.6 - Representação da estrutura química da amantadina.....	37
Figura 4.1 – Representação das estruturas químicas da glutathiona na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).	38
Figura 5.1 – Representação da estrutura química da N-acetilcisteína (NAC).....	45
Figura 5.2 – Representação das estruturas da piridoxina e do seu metabolito ativo, o piridoxal 5'-fosfato (PLP), respetivamente.	48

Índice de Quadros

Quadro 2.1 – Síntese das principais espécies reativas de oxigénio e de azoto.	15
Quadro 2.2 – Principais genes relacionados com o desenvolvimento da DP, a sua hereditariedade e principal função.	22

Lista de Abreviaturas

- aS** – Proteína alfa-sinucleína
- ATP** – Adenosina trifosfato
- COMT** – Catecol-O-metiltransferase
- DA** – Dopamina
- DOPAC** – Ácido 3,4 – dihidroxifenilacético
- DOPAL** – 3,4 -dihidroxifenilacetaldeído
- DP** – Doença de Parkinson
- D1 a D5** – Recetores dopaminérgicos
- EAAT** – Transportadores de aminoácidos excitatórios
- GABA** – Ácido gama-aminobutírico
- GCS** – Gama-glutamilcisteína sintetase
- Glu** – Glutamato
- GO** – Glutaciona oxidase
- GP** – Glutaciona peroxidase
- GPe** – Globo pálido externo
- GPi** – Globo pálido interno
- GR** – Glutaciona redutase
- GS** – Glutaciona sintetase
- GSH** – Glutaciona
- GSSG** – Glutaciona oxidada
- IV** – Via Intravenosa
- LB** – Corpus de Lewy
- L-DOPA** – L-3,4-dihidroxifenilalanina
- LRRK2** – *Leucine-rich repeat Kinase 2*
- MAO** – Monoamina oxidase
- MPP⁺** – 1-metil-4-fenilpiridinium
- MPTP** – 1-metil-4-fenil-1,3,4,6- tetrahidropiridina
- 3-MT** – 3 –metoxitiramina
- NAC** – N-acetilcisteína
- NADH** – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NM – Neuromelanina

Nrf2 – Fator nuclear eritoide 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

PINK1 – Putativa quinase 1 induzida por PTEN

PKM2 – Piruvato quinase M2

PLP – Piridoxal 5'-fosfato

RBD – Perturbação comportamental do sono REM

REM – *Rapid eye movement*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RNS – Espécies reativas de azoto

SAL – Sistema de autofagia lisossomal

SN – *Substantia nigra*

SNC – Sistema nervoso central

SNC – *Substantia nigra* parte compacta

SNr – *Substantia nigra* parte reticulada

SO – Stress oxidativo

STN – Núcleo subtalâmico

SOD – Superóxido dismutase

SUP – Sistema ubiquitina-proteossoma

TH – Tálamo

UKPDSB – *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*

1. Secção Introdutória

1.1 Introdução

A DP é uma doença neurodegenerativa crónica, caracterizada geralmente por distúrbios motores e não motores, sendo considerada como a segunda mais frequente. Esta é uma patologia de progressão lenta, tipicamente potenciada pela perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra* (SN), localizada no mesencéfalo. A diminuição dos níveis cerebrais de dopamina (DA) estão associados às complicações motoras da DP uma vez que, a DA é o neurotransmissor cerebral associado à função motora (1-3).

Estima-se que, aproximadamente, 1% da população mundial acima de 60 anos sofra de DP, o que corresponde a cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo (4). De acordo com o *The Global Burden of Diseases Study*, a incidência desta doença apresenta uma tendência crescente face ao aumento da esperança média de vida, calculando-se que em 2040, o número total de indivíduos com DP seja de 13 milhões (5). Embora seja uma patologia mais frequente em indivíduos com mais de 60 anos, esta pode atingir qualquer idade, sendo o sexo masculino o mais afetado (4).

Clinicamente, a doença é caracterizada pela presença de parkinsonismo, ou seja, por um conjunto de sintomas motores, que incluem: bradicinesia, instabilidade postural, rigidez e/ou tremores de repouso, tipicamente unilaterais. Para além dos sintomas referidos, a DP pode ser acompanhada de sintomas não motores, nomeadamente alterações sensoriais ou do sono, comprometimento cognitivo, alterações do humor, entre outros. Estes sintomas foram descritos pela primeira vez, em 1967, por Hoehn e Yahr (5,6).

Atualmente, ainda não se dispõe de um exame específico ou biomarcador que nos permita realizar um diagnóstico precoce da doença, sendo que o diagnóstico atual é baseado na existência ou não de parkinsonismo e a presença de bradicinesia é uma característica fundamental. Este diagnóstico deve ser, posteriormente, suportado pela resposta favorável à terapêutica dopaminérgica (7).

Sendo a DP uma doença idiopática, a sua etiologia não é, até à data, totalmente conhecida, no entanto, diversos fatores genéticos e ambientais têm sido identificados como potenciadores na génese desta patologia. O SO tem sido proposto como um dos mecanismos responsáveis pela patogénese da doença, visto que se trata de uma condição na qual é instalado um desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas de oxigénio e insuficiente destoxificação, conduzindo a um aumento da deterioração celular e contribuindo para processos neurodegenerativos (7,8).

A Glutathione é o antioxidante endógeno com maior abundância no organismo humano, estando envolvida em diversos processos neuroprotetores e tendo um papel importante no controlo e destoxificação de espécies reativas. Assim sendo, sugere-se que uma elevada concentração de espécies reativas de oxigénio (ROS) acompanhada de uma baixa síntese de glutathione, contribuam para o desenvolvimento de disfunções celulares que intensificam o processo de génese da DP. Têm sido muitos os estudos que afirmam o benefício da suplementação antioxidante nesta patologia, existindo evidências de substâncias que promovem o aumento da síntese de glutathione, o que, teoricamente, resultaria num aumento da neuroproteção e, conseqüentemente, a uma diminuição da perda dopaminérgica (9).

Posto isto, a DP é uma doença que acarreta um impacto clínico significativo na vida dos doentes e dos seus familiares, sendo de extrema importância o estudo contínuo de novas estratégias terapêuticas que visam o retardamento desta patologia e a melhoria da qualidade de vida.

1.2 Metodologia

No âmbito desta dissertação, foi realizada uma pesquisa e revisão bibliográfica de várias fontes de informação de cariz científico. A recolha de informação sobre o tema apresentado, foi realizada através de bases de dados *online* como *PubMed*, *Scopus*, *ScienceDirect* e *Scholar Google*, tendo por base a utilização de várias palavras-chave, nomeadamente “*parkinson’s disease*”, “*oxidative stress*”, “*glutathione*”, entre outras. Apenas foram incluídos na revisão documentos de língua portuguesa e inglesa. Para além das bases de dados referidas, foram também consultadas outras fontes de informação, tais como a Organização Mundial De Saúde (OMS), a Associação Europeia de Doentes de Parkinson e Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson.

2. Doença de Parkinson

2.1 Nota Histórica

Foi em 1817, que *James Parkinson*, um médico britânico, publicou o artigo “*An Essay on the Shaking Palsy*”, sendo este o primeiro documento médico a debater a DP (11,15). James Parkinson analisou clinicamente seis indivíduos que, aparentemente, possuíam uma doença angustiante que não tinha sido estudada e para a qual não havia denominação. Anos mais tarde, foi intitulada de “Doença de Parkinson” pelo *Dr. Jean-Martin Charcot*, que descreveu a rigidez e a bradicinesia como características centrais da doença (11,12,15). Em meados de 1855, praticamente 40 anos após esta ser descrita pela primeira vez, cerca de 22 indivíduos em Inglaterra e no País de Gales vieram a falecer da doença (13).

Em 1893, *Blocq* e *Marinesco*, após análise neurológica de um doente que sofria de tremor unilateral verificaram a presença de um tumor na região da SN, o que fez com que sugerissem a hipótese de existir uma ligação entre a etiologia da DP e esta região cerebral (14,15). Do mesmo modo, em 1919, *Tretiakoff*, um neuropatologista, relatou pela primeira vez a presença de *Corpos de Lewy* nesta mesma região dos seus doentes (14,15). No entanto, foi apenas no final da década de 1950, que *Carlsson* descobriu que o precursor da DA provocava um alívio significativo nos doentes, propondo a DA como um neurotransmissor associado ao controlo motor (14). Mais tarde, *Rosengren* e *Bertler*, em Oxford, confirmaram a presença de níveis baixos de DA em seis indivíduos portadores deste distúrbio, evidenciando o contributo deste neurotransmissor na patogénese da DP (15). Desde que a DP foi descrita pela primeira vez, a causa que inicia o processo neurodegenerativo ainda permanece desconhecida, colocando-se a hipótese de resultar de um conjunto de fatores que desencadeiam a sua génese (14).

Assim sendo, apesar de durante grande parte da sua história, a DP ter sido considerada uma doença rara, passado pouco mais de dois séculos, esta está cada vez mais presente na população a nível global.

2.2 Epidemiologia

A DP, como referido anteriormente, é uma patologia que tem vindo a tornar-se cada vez mais frequente na população face ao aumento da esperança média de vida. Globalmente, esta afeta cerca de 1% da população com idade superior a 60 anos, sendo considerada rara na população com idade inferior a 50 anos. Segundo a OMS (Organização mundial da Saúde), em 2019, as estimativas globais realizadas revelaram que mais de 8,5 milhões de indivíduos são afetados pela DP, o que corresponde a cerca de 1 a 2 doentes em cada 1000 indivíduos. Na Europa, as estimativas apontam entre 257 a 1400 casos por cada 100 mil habitantes, sendo que em Portugal, cerca de 18 a 20 mil indivíduos são afetados pela doença (8, 16-20).

A incidência da DP varia consoante a região geográfica e de acordo com a metodologia utilizada nos estudos epidemiológicos, assim sendo, a incidência anual situa-se entre os 10 e 20 casos por cada 100 mil habitantes (18). Como referido, a tendência crescente de incidentes desta patologia pode ser resultado do elevado crescimento populacional e do envelhecimento, bem como da melhoria dos métodos de diagnóstico. Mundialmente, o sexo masculino é o mais afetado, especialmente na faixa etária dos 50-59 anos, contando com uma incidência, e por consequência uma prevalência superior ao sexo feminino. Em um estudo realizado em 2014, que teve como objetivo avaliar a prevalência da doença em diferentes faixas etárias, revelou que no sexo masculino, no intervalo de idades referido, a patologia estava presente em 134 em cada 100 mil indivíduos, em comparação com a estimativa de 41 casos em cada 100 mil indivíduos no sexo feminino (21,22). Em um outro estudo realizado em indivíduos acima de 40 anos, verificou-se uma incidência de 37,6 casos em cada 100 mil mulheres, enquanto os homens possuíam uma incidência de 61,2 (23).

Um aspeto importante no prognóstico da DP é a mortalidade, esta foi analisada num estudo que utilizou dados a nível mundial de modo a examinar as suas tendências no período de 1994 e 2019 (18). Nos resultados obtidos, foram totalizadas mais de 1 milhão de mortes em todo o mundo e como expectável, ocorreu um maior número de mortes no sexo masculino em relação ao sexo feminino, uma vez que este também possui uma incidência superior. A taxa de mortalidade (por cada 100 mil habitantes) que em 1994 era de 1,76, atingiu em 2019 o valor de 5,67, o que corrobora com o aumento da esperança média de vida que se tem vindo

a verificar ao longo dos anos (18,23).

Relativamente ao impacto económico, a despesa anual que compreende os gastos diretos e indiretos, determinados em 2017, ascenderam os 51,9 mil milhões de dólares nos Estados Unidos (25,28). Já na Europa, segundo um estudo realizado em 2010, os gastos anuais ascenderam os 13,9 mil milhões de Euros, estimando-se que, em 2050, a despesa total atinja o valor de 357 mil milhões, o que vai ao encontro do aumento previsto da incidência da patologia (24,26,27).

Posto isto, devido ao impacto clínico significativo que interfere com o normal funcionamento e desenvolvimento de atividades quotidianas dos indivíduos afetados, e aos efeitos a nível pessoal e económico que esta patologia acarreta, é evidente a necessidade de intervir e dar continuidade à investigação e descoberta de novos fármacos que visam a diminuição da sua progressão.

2.3 Tipos de Doença de Parkinson

Como muitas outras patologias neurodegenerativas, a DP pode ser clinicamente subdividida em diferentes tipos devido à sua extensa heterogeneidade. Os critérios de divisão entre os diferentes grupos podem ser baseados na sintomatologia motora, características cognitivas, idade de início da doença ou taxa de progressão desta. Estas discrepâncias entre subtipos devem ser encaradas como oportunidades para um estudo etiológico cada vez mais profundo, assim como o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes. Posto isto, de seguida serão descritos os principais subtipos desta patologia: DP juvenil, DP familiar e DP esporádica/idiopática (29).

De acordo com a idade de início da patologia, a DP de início precoce é definida como a manifestação dos sintomas motores em indivíduos com idade inferior a 60 anos, sendo que este grupo pode ser subdividido em DP juvenil (DPJ), definida como o aparecimento da doença em doentes com idades até aos 21 anos. A síndrome de Kufor-Rekab, principal tipo de DPJ, tem como patogénese a mutação genética na enzima ATP13A2, comprometendo o normal funcionamento de diferentes mecanismos biológicos. Esta mutação pode ser herdada de forma autossómica recessiva, sendo importante o despiste genético a nível familiar (30).

Em relação à DP familiar e DP esporádica/idiopática, estas são muitas vezes confundidas devido à contribuição de fatores genéticos em ambos os casos. A DP familiar manifesta-se em indivíduos que possuam história familiar da doença, sendo usualmente reconhecida pela presença de variantes raras e patogénicas. No caso da DP esporádica/idiopática, que corresponde à grande maioria dos casos, sugere-se a hipótese de possuir uma etiologia multifatorial baseada na interação entre fatores genéticos e fatores ambientais, que serão enunciados mais à frente nesta dissertação (31). Por fim, em relação à sintomatologia, não existe uma padronização dos sintomas que se manifestam em cada tipo de DP, o que contribui para a heterogeneidade característica desta patologia.

2.4 Fisiopatologia e Patogénese

Os mecanismos fisiopatológicos associados à DP permanecem, até à atualidade, um assunto gerador de controvérsia. A degeneração não se restringe aos neurónios dopaminérgicos na SN, colocando-se a hipótese de se estender para diversas áreas cerebrais e envolvendo diferentes neurotransmissores. Deste modo, a DP caracteriza-se como um distúrbio multifatorial, sendo que as alterações que ocorrem a nível celular são de elevada complexidade, verificando-se o surgimento contínuo de novas propostas de mecanismos celulares que poderão estar envolvidos e que potenciam o desencadeamento desta patologia.

2.4.1 Circuito dos Gânglios Basais

O circuito dos gânglios basais ou núcleos da base, anatomicamente, corresponde a um conjunto de estruturas e ligações que atuam como uma unidade funcional, nomeadamente o corpo estriado (constituído pelo núcleo caudado e o putamen), a SN que se encontra dividida em *substantia nigra* parte compacta (SNc) e *substantia nigra* parte reticulada (SNr), o núcleo subtalâmico (STN) e a sua ligação ao tálamo (TH) que por sua vez está interligado ao córtex motor, e o globo pálido composto pelo segmento interno (GPi) e externo (GPe) (34). A principal alteração morfológica verificada no cérebro de indivíduos com DP é a perda de área pigmentada localizada na SNc e cerebelo, encontrando-se este fenómeno diretamente correlacionado com a sucessiva morte celular de neurónios dopaminérgicos, o que leva a uma consequente depleção de dopamina na via nigroestriatal (32,33). Esta via estende-se desde a

SN até ao corpo estriado, onde se localizam os diferentes recetores da DA (36). Existem, atualmente descritos, cinco tipos de recetores dopaminérgicos, os recetores D1 a D5, sendo que os recetores D1 e D2 são os principais estimuladores e inibidores de dopamina no Sistema Nervoso Central (SNC), possuindo uma maior abundância no corpo estriado, e por conseguinte, têm uma maior relevância na fisiopatologia da doença (36). O circuito dos gânglios basais pode ser dividido em duas vias: a via direta e a via indireta, envolvendo não só a DA como também outros neurotransmissores, como são exemplo o ácido gama-aminobutírico (GABA) que exerce uma resposta inibitória, e o glutamato (Glu) que exerce uma resposta excitatória (34,35). Dependendo da via envolvida, a DA exerce uma influência distinta: enquanto na via direta atua como um neurotransmissor excitatório sobre o recetor D1 no estriado, na via indireta atua como neurotransmissor inibitório sobre o recetor D2 (34).

Na via direta, via que promove o movimento voluntário, o estriado é estimulado pelo córtex através de neurónios glutamatérgicos, enviando a informação do tipo GABAérgica para o GPi e SNr, inibindo a sua atividade e promovendo a estimulação talâmica e cortical. Na via indireta, após estimulação do estriado, os neurónios GABAérgicos inibem o GPe, cessando a atividade inibitória que este tinha sobre STN e sobre GPi. Enquanto este último é responsável pela inibição do movimento (através da inibição talâmica), o STN é responsável pela estimulação do GPi através de neurónios glutamatérgicos, o que acaba por intensificar a atividade inibitória deste. Assim sendo, enquanto a via direta é considerada como excitatória pela promoção do movimento, a via indireta é encarada como um mecanismo de inibição do mesmo (35,37).

Relativamente ao que se verifica na DP, representado na **Figura 2.1**, na via direta ocorre uma menor resposta excitatória do recetor D1, mediada pela DA, o que se traduz em uma menor libertação do neurotransmissor GABA no GPi/SNr, estimulando a sua atividade. Dado que o GPi/SNr fica em estado hiperativo, ocorre uma maior libertação do neurotransmissor inibitório sobre o TH, que por sua vez exerce um menor efeito excitatório sobre o córtex motor, contribuindo para a dificuldade de iniciar e executar movimentos. Em paralelo, na via indireta, a redução da DA conduz a uma diminuição do efeito inibitório sobre o recetor D2, o que se traduz numa maior libertação do neurotransmissor inibitório sobre o GPe, e posteriormente uma redução da libertação de GABA sobre GPi/SNr, que fica em estado

hiperativo, o que leva ao aumento da sua libertação no tálamo, que ao ser inibido, exerce uma maior resposta inibitória no córtex motor (34,35,37).

Posto isto, o resultado da perda da influência da DA estriatal que ocorre na DP, é o aumento da ação gabaérgica inibitória, e deste modo há uma maior inibição da atividade motora iniciada pelo córtex, o que leva ao aparecimento dos sintomas motores característicos desta patologia.

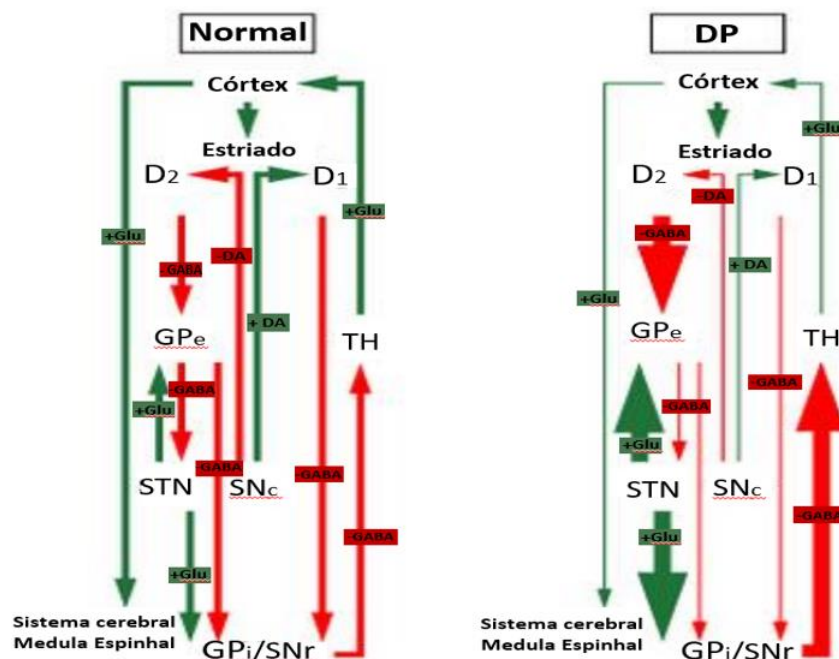


Figura 2.1 - Comparação do circuito dos gânglios basais em uma situação normal e na Doença de Parkinson. Encontra-se representada a relação entre o córtex cerebral, os núcleos da base e o tálamo. A via direta, estimulada pela dopamina através dos recetores D1, atua na inibição do GPi e na consequente estimulação do tálamo, o que resulta na promoção do movimento voluntário. A via indireta, inibida pela dopamina através dos recetores D2, inibe o GPe, responsável pela inibição do GPi, aumentando deste modo a sua atividade e inibindo o tálamo, o que resulta na inibição do movimento voluntário. Na DP, com a depleção de dopamina na via nigroestriatal, a redução da sua ação excitatória na via direta e inibitória sobre a via indireta, resulta em ambos os casos na inibição da atividade do tálamo, o que exerce uma menor resposta excitatória sobre o córtex, comprometendo os movimentos voluntários. Legenda: dopamina (DA), ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato (Glu), recetores de dopamina (D1 e D2), *substantia nigra* parte compacta (SNc), *substantia nigra* parte reticulada (SNr), globo pálido interno (GPi), globo pálido externo (GPe), núcleo subtalâmico (STN), tálamo (TH). As setas a vermelho representam a transmissão de sinais inibitórios e as setas verdes a transmissão de sinais excitatórios. A espessura das setas está diretamente relacionada com a intensidade da transmissão de sinal. Adaptado de (30).

A progressiva degeneração dopaminérgica na via nigroestriatal está associada ao desenvolvimento de corpos de Lewy (LB), compostos por membranas e proteínas, nomeadamente a proteína α -sinucleína. Esta última possui um importante papel ao nível dos processos celulares envolvidos na patogénese da DP (38).

2.4.2 A Proteína alfa-sinucleína

A proteína α -sinucleína (α S), é uma pequena proteína neuronal pré-sináptica com elevada expressão no SNC, que tem sido extensamente estudada devido ao seu papel na fisiopatologia da DP. Embora a sua função fisiológica não seja totalmente conhecida, existem evidências da sua interação, ao nível dos terminais pré-sinápticos, com inúmeras proteínas reguladoras da homeostase da DA (39,41). Sugere-se, ainda, que esta proteína seja reguladora da atividade catalítica da enzima tirosina hidroxilase, principal enzima responsável pela síntese de DA (40).

A formação de agregados proteicos é um fenómeno comum no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo que os corpos de Lewy, um biomarcador histopatológico característico que integra o diagnóstico de DP, têm na sua principal composição, agregados de α -sinucleína. O processo de agregação da proteína envolve a formação de estruturas intermediárias denominadas de oligómeros que se convertem em agregados constituídos por um conjunto de fibras insolúveis com uma conformação em folhas-beta, que se depositam nos neurónios interferindo nas sinapses. Como resultado, assiste-se ao comprometimento da função neuronal, conduzindo à ativação de diferentes vias apoptóticas, com a consequente morte celular (39,42).

No SNC, a proteína α S alterada é reparada e removida através de vias intracelulares, tais como o Sistema Ubiquitina Proteossoma (SUP), o sistema de autofagia mediada por chaperones e o sistema de autofagia lisossomal (SAL). A não atuação destes sistemas, responsáveis pela degradação proteica, a ocorrência de determinadas mutações genéticas que provocam alterações funcionais no SUP e no SAL, mais especificamente em genes como Parkin, DJ-1 e Pink1, e em genes como LRRK2, GBA, ATP13A2 e VPS35, respetivamente, e a posterior acumulação da α S ao longo do tempo, corrobora com a maior prevalência desta patologia na população mais envelhecida. As mutações que ocorrem nestes genes em

específico estão associadas a um tipo de DP, a DP familiar (43-45).

Em suma, a identificação de mutações, duplicações e polimorfismos no gene da α S (SNCA), assim como nos genes das suas vias de eliminação e a tendência da α -sinucleína para se agregar interferindo na homeostasia dos organelos celulares, constituem fatores que evidenciam a relação causal entre esta proteína e a fisiopatologia da DP (46).

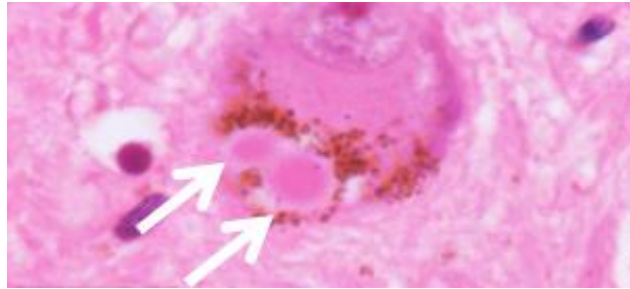


Figura 2.2 - Aspeto histológico da agregação proteica da α -sinucleína, formando os corpos de Lewy. As setas brancas apontam para estas estruturas presentes na *substantia nigra*, num cérebro com Doença de Parkinson. Adaptado de 47.

2.5 O Stress Oxidativo

O oxigénio é um componente químico crucial para a sobrevivência e produção de energia pelas células aeróbias, que se encontra presente em grande abundância na atmosfera. É na respiração aeróbia, que o oxigénio atua como aceitador de eletrões, e que num processo secundário há a geração de metabolitos como o radical livre superóxido que é, posteriormente, convertido noutras espécies reativas de oxigénio (ROS). Existem, ainda, outro tipo de espécies reativas, que podem resultar do metabolismo celular, nomeadamente as espécies reativas de azoto (RNS). O SO é então definido como um fenómeno que resulta de um desequilíbrio entre a produção e acumulação de ROS e RNS nos tecidos celulares e a capacidade dos sistemas antioxidantes de manterem os níveis de ROS dentro dos limites de segurança para as células. É em resultado deste desequilíbrio que ocorre a deterioração celular devido à toxicidade induzida pelo excesso destas espécies. O SO, é um processo natural que ocorre em todas as células em condições fisiológicas, no entanto é perante o aumento excessivo da concentração deste tipo de espécies reativas que são gerados danos celulares como consequência. As ROS em excesso podem promover a peroxidação lipídica, a oxidação

do ADN/ARN que pode levar a mutações genéticas, inflamação e modificação da conformação de proteínas promovendo a agregação das mesmas, o que conduz à sua disfunção e consequente morte celular. Fatores exógenos, como a exposição a metais pesados que promovem a produção de ROS, interferindo na sinalização dos gânglios basais, a exposição a radiações ou a poluentes atmosféricos podem, igualmente, contribuir para danos oxidativos. Assim sendo, e como referido, apesar de se tratar de um processo fisiológico, o SO pode tornar-se patológico na presença de diferentes condições (48-50).

2.5.1 Agentes Oxidantes

Os principais agentes oxidantes são as ROS e as RNS. Estas espécies reativas possuem, em condições fisiológicas, funções de regulação da homeostasia celular, através da sinalização redox e da defesa contra agentes patogénicos.

Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)

No processo de produção de energia, a molécula de oxigénio é reduzida, na membrana mitocondrial interna (complexo I a V), no final da cadeia de transporte de eletrões (CTE) com a finalidade de produção de água. Nesta reação química (**Figura 2.3**), paralelamente à formação de água, há adição de um único eletrão à molécula de oxigénio dando origem ao anião superóxido, um radical livre, ou seja, uma molécula ou fragmento molecular que é constituído por eletrões de valência desemparelhados. As moléculas reativas, pertencentes a este grupo e, mais estudadas são: o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (OH^{\bullet}), e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (51).

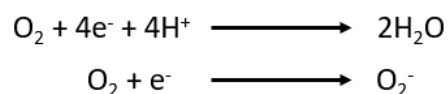


Figura 2.3 – Representação da reação química de geração do anião superóxido.

É principalmente na mitocôndria que ocorre a produção destas espécies, uma vez que este é o organelo onde ocorre a respiração celular aeróbia. O radical superóxido é a ROS produzida com maior abundância, sendo considerado o precursor da maioria das restantes ROS. Este radical e o peróxido de hidrogénio são produzidos maioritariamente pela dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH)-ubiquinona oxirredutase (Complexo I) e pela

ubiquinol-citocromo c oxirredutase (Complexo III), enzimas que fazem parte da CTE. O radical hidroxilo é conhecido como um dos agentes oxidantes mais potentes da CTE, podendo ser formado através de diferentes reações: durante a reação de Haber-Weiss, pela decomposição do peroxinitrito, que se trata de um composto oxidante que promove a nitração, ou pela reação de Fenton (**Figura 2.4**) (52-54).

Na reação de Haber-Weiss, ocorre a formação do radical hidroxilo através da interação do peróxido de hidrogénio com o radical superóxido. A reação de Fenton consiste numa reação redox, onde o Ferro (II) sofre oxidação, sendo convertido em Ferro (III) através da sua interação com o peróxido de hidrogénio, o qual é seguidamente reduzido, formando o radical hidroxilo. Por fim, a reação de decomposição do peroxinitrito integra a interação entre o radical superóxido e óxido nítrico, dando origem ao agente oxidante, peroxinitrito. Este composto sofre, então uma reação de decomposição, o que leva à formação do radical hidroxilo (53).

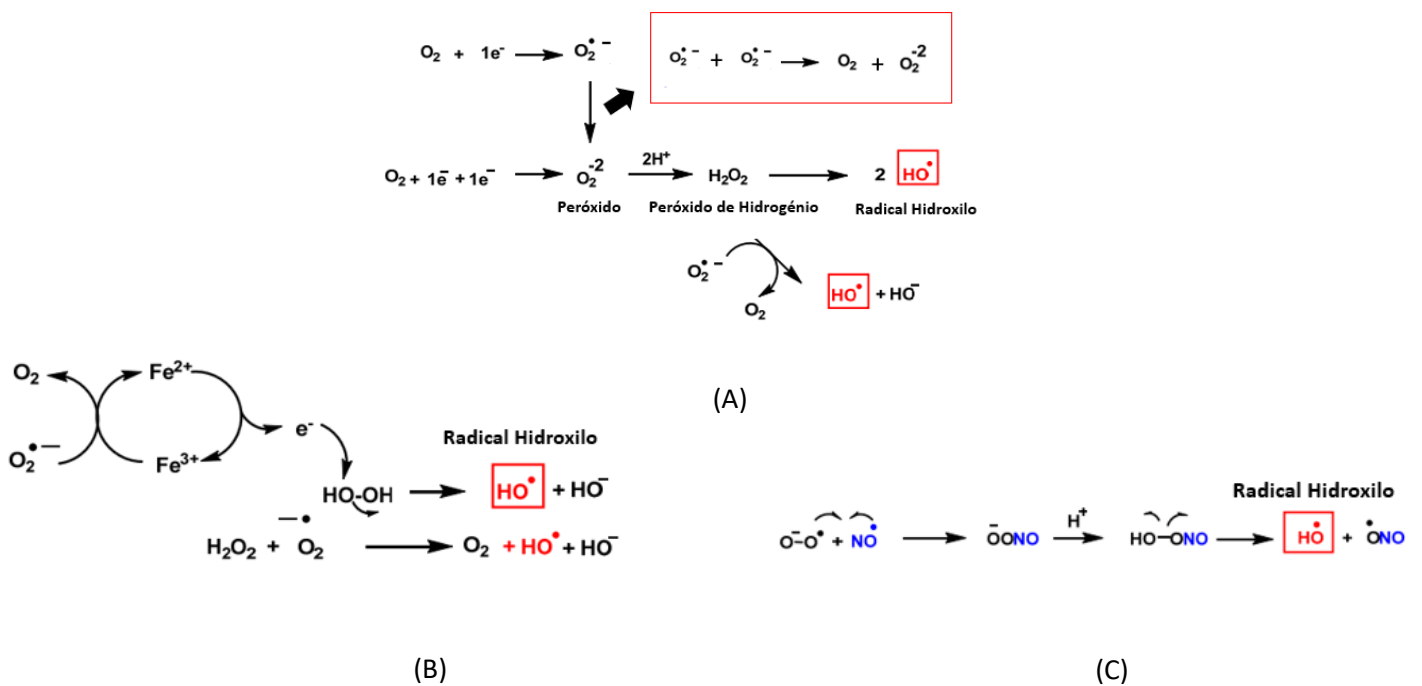


Figura 2.4 – Geração de ROS e RNS pela reação de Haber-Weiss (A), pela reação de Fenton (B) ou pela decomposição do peroxinitrito (C). Adaptado de (53).

Posto isto, apesar de serem espécies que regulam o normal funcionamento da célula, produzidas em excesso têm a capacidade de aumentar o SO, tornando-se patológicas.

Espécies Reativas de azoto (RNS)

Neste grupo de espécies reativas estão incluídos o óxido nítrico (NO•), o anião peroxinitrito (ONOO⁻), o anião nitroxilo (NO⁻) e o catião nitrosónio (NO⁺). No organismo, estas espécies têm como precursor, principalmente, o NO•. O óxido nítrico é uma pequena molécula, com ação vasodilatadora, cuja origem ocorre por intermédio de uma enzima, a óxido nítrico sintetase, que converte a arginina e a citrulina em óxido nítrico na presença de cofatores como o O₂ e NADPH ou então, pode ser formado através da redução do nitrito pela ação de diversas proteínas (**Figura 2.5**) (51).

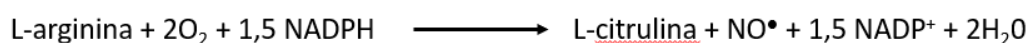


Figura 2.5 – Representação da reação química de geração do óxido nítrico.

O óxido nítrico possui grande afinidade para reagir com o radical superóxido o que promove a formação de peroxinitrito (ONOO⁻) e este pode, ainda, interagir com o oxigénio levando à formação de dióxido de azoto (NO₂•). Em relação ao peroxinitrito e ao dióxido de azoto, enquanto o primeiro tem a capacidade de promover a oxidação de aminoácidos, causando lesões celulares, o segundo possui um grande potencial para iniciar o processo de peroxidação lipídica em ácidos gordos saturados como o ácido linoleico (51,53).

Desta forma e como referido, a produção excessiva deste tipo de espécies em adição à sua baixa eliminação contribui para o aumento do SO, o que causa efeitos nocivos para as estruturas celulares, como danos no ADN/ARN, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. Estes efeitos constituem danos irreversíveis nos componentes celulares, o que os impede de exercer as suas funções originais (53). No **Quadro 2.1**, apresentado de seguida, estão sintetizadas as principais ROS e RNS, enunciadas anteriormente.

Quadro 2.1 – Síntese das principais espécies reativas de oxigénio e de azoto.

Radical anião superóxido – $O_2^{\bullet-}$	Radical óxido nítrico - NO^{\bullet}
Peróxido de hidrogénio – H_2O_2	Radical dióxido de azoto – NO_2^{\bullet}
Radical hidroxilo – OH^{\bullet}	Catião nitrilo – NO_2^+
	Anião nitroxilo – $NO^{\bullet-}$
	Anião peroxinitrito – $ONOO^{\bullet-}$

2.5.2 Agentes Antioxidantes

Com a finalidade de contrabalançar a excessiva produção de ROS e RNS, as células possuem mecanismos antioxidantes de defesa, podendo estes ser mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos. O grupo dos antioxidantes enzimáticos inclui: a glutathione peroxidase, a catalase, a GSH redutase e a superóxido dismutase (SOD). Já no grupo dos antioxidantes não enzimáticos estão incluídas moléculas como o ácido ascórbico, mais conhecido como vitamina C, vitamina E, melatonina, a GSH tioredoxina e proteínas como por exemplo a albumina (55).

A glutathione reduzida é um antioxidante não enzimático que atua em sistemas de detoxificação de radicais livres. Esta atua também, como cofator de diferentes enzimas antioxidantes particularmente a GSH peroxidase, a glutathione-S-transferase e as glioxalases (56). Todos os processos onde a glutathione está inserida serão elucidados detalhadamente mais à frente.

Como mencionado, o SO resulta, então, de um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os agentes antioxidantes que foram enunciados, deste modo é possível quantificá-los, estando nesta patologia os primeiros aumentados enquanto os segundos se encontram diminuídos.

2.6 O Papel do Stress Oxidativo na Doença de Parkinson

O SO, como tem sido evidenciado ao longo desta dissertação, tem sido proposto como um dos mecanismos potenciadores da patogênese de doenças neurodegenerativas como a DP. O SO é um mecanismo que ocorre em todas as células, no entanto o cérebro é um órgão especialmente suscetível aos efeitos nocivos que este provoca. Esta característica do cérebro parece ser consequência do grande consumo de oxigênio por este órgão, da grande abundância de mitocôndrias, (que são o organelo onde há maior produção de ROS/RNS) e da ação insuficiente das enzimas antioxidantes, fatores que contribuem direta ou indiretamente para a morte neuronal (9).

O SO pode ser induzido através de diversos mecanismos, os mais comuns são a indução por metais ou por ativação da microglia. No caso do SO induzido por metais, este ocorre, geralmente, através da reação do radical superóxido, que como referido anteriormente, trata-se de uma das maiores fontes de ROS uma vez que a partir deste podem ser produzidas inúmeras outras espécies, com o ferro livre. O ferro livre, em condições de SO, pode atuar como catalisador na produção do radical hidroxilo (OH^\bullet), pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, já demonstradas anteriormente (57).

As células da glia dizem respeito a um conjunto de células onde estão incluídos os astrócitos, a microglia e os oligodendrócitos. As células da microglia caracterizam-se por serem mais pequenas que as restantes, estando envolvidas na homeostasia celular e em mecanismos de defesa, possuindo características de macrófagos e sendo responsáveis pela remoção de células danificadas. Estas células microgliais encontram-se usualmente inativas e têm a sua reatividade induzida por estímulos como ROS/RNS, envelhecimento, libertação de agentes inflamatórios e no caso de ocorrer lesão neuronal. A reatividade destas células resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa, interleucinas, na promoção de mecanismos de fagocitose e no aumento da formação de superóxido como mecanismo de defesa. O radical, como já evidenciado, pode dar origem a diferentes agentes promotores de lesões neuronais. Este processo resulta num ciclo destrutivo de *feedback* positivo que termina apenas quando uma etapa do processo sofre inibição ou quando o tecido morre. Desta forma, a ativação da microglia pode ser encarada

como uma causa ou consequência do SO no cérebro (51,58,59).

Posto isto, diversos fatores implícitos na progressão da morte celular que contribuem para o desenvolvimento da DP parecem todos estar interligados com o SO. Este pode ser causa ou consequência de diferentes processos, que por sua vez culminam em DP. De seguida, descrevem-se algumas dessas disfunções como a própria disfunção mitocondrial e as toxinas ambientais que promovem essa alteração, o metabolismo da dopamina, a excitotoxicidade, e a acumulação de ferro.

2.6.1 Disfunção Mitocondrial

A mitocôndria é um organelo intracelular fundamental para a produção de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) através de processos de fosforilação oxidativa. Neste processo a glicose é a principal fonte de energia cerebral, esta é transportada para os neurónios e astrócitos onde é, posteriormente, convertida em piruvato. O piruvato, resultado da glicólise, é então transportado para as membranas mitocondriais onde sofre descarboxilação de modo a formar a acetil-coenzima A, que entra no ciclo do ácido tricarboxílico para produzir NADH e o dinucleótido de flavina e adenosina (FADH), coenzimas necessárias para a síntese de ATP pela respiração celular. A mitocôndria não se limita a atuar na bioenergética celular, esta possui um importante papel no controlo dos níveis de ROS, na homeostase do cálcio e na biossíntese de macromoléculas (60,61).

As primeiras evidências de disfunção mitocondrial surgiram na sequência de um estudo de observação que envolveu a exposição a uma toxina ambiental, a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). A MPTP após sofrer duas oxidações é transformada na neurotoxina ativa, o 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺). Esta molécula é internalizada pelos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais, inibindo o transporte de eletrões ao interferir seletivamente com o funcionamento do complexo mitocondrial I. Este processo conduz a consequências prejudiciais para a célula nomeadamente: aumento da produção de ROS e consequente SO, comprometimento da homeostasia do cálcio e excitotoxicidade, entre outros. A rotenona, anteriormente utilizada como pesticida é um potente inibidor do complexo I, que tem sido, igualmente, estudada por estar envolvida na morte celular dopaminérgica. A toxicidade da rotenona envolve dano oxidativo mediado pela excessiva

produção de radicais livres e pelo aumento da formação de inclusões de aS na SN, que levam ao desenvolvimento de sintomas motores semelhantes aos da DP (62,63).

Como referido, as mitocôndrias são a principal fonte de energia celular, no entanto são também uma fonte de produção de ROS, como o radical superóxido. De modo a controlar os níveis intracelulares deste radical, a enzima SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio, sendo posteriormente, degradado sob ação da enzima catalase. Outro fator que se encontra envolvido na degradação e consequente disfunção mitocondrial é a presença de mutações em genes como o PINK1 que ao ativar a proteína parkina favorece a degradação proteossomal através da ubiquitinação de proteínas da membrana mitocondrial. Enquanto as proteínas referidas anteriormente, estão envolvidas na depuração de mitocôndrias danificadas, por autofagia, neurónios que possuam mutações na proteína LRRK2 estão associados a uma maior vulnerabilidade a toxinas mitocondriais (64-66).

Deste modo, e tendo em consideração o que foi referido ao longo deste tópico, sugere-se que a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial atua como um forte potenciador do SO devido ao aumento da produção de ROS, e que este pode ser originado por esta disfunção ou ser causador da mesma culminando este processo na progressão da morte celular e contribuindo, direta ou indiretamente para a fisiopatologia da DP esporádica.

2.6.2 Excitotoxicidade

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC, no entanto este exerce um efeito prejudicial sobre os neurónios dopaminérgicos da SN. A excitotoxicidade é um processo patológico induzido por uma exposição excessiva ao glutamato. O aumento dos níveis de concentração de glutamato, deve-se ao aumento da reatividade das projeções glutamatérgicas sobre o STN, o que conduz a uma sobreativação dos seus recetores, nomeadamente os do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). A hiperativação destes recetores tem como resultado um abundante influxo de cálcio para o interior da célula, o que provoca uma despolarização mitocondrial e ativação de diversas enzimas dependentes do mesmo. Estas enzimas através da degradação de proteínas e de outros componentes celulares, promovem a formação de novas ROS/RNS. Por consequência, a ativação destas vias pode culminar na morte neuronal por disfunções mitocondriais e consequentes processos de

apoptose (67,68).

Desta forma, alterações energéticas resultantes de disfunções mitocondriais na DP, podem provocar excitotoxicidade e vice-versa.

2.6.3 Metabolismo da Dopamina

A DA é um neurotransmissor produzido maioritariamente na SN, onde atua sobre o controlo da função motora. Sendo assim, e apesar do seu metabolismo estar bem estudado e ser de grande complexidade, é relevante abordar alguns conceitos relacionados com o seu processo de degradação e oxidação, que irão ajudar a compreender a sua relação com o SO e consequente contributo na patogénese da DP.

A síntese da DA está dividida em duas etapas e tem como precursor o aminoácido tirosina. Numa primeira etapa a tirosina, na presença de oxigénio, sofre hidroxilação dando origem à L-3,4-dihidroxi-fenilalanina, também denominada de levodopa (L-DOPA), através da ação da tirosina hidroxilase. Na segunda etapa, a L-DOPA é então convertida na DA pela ação da descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (69). Após a sua síntese, esta é armazenada em vesículas sinápticas e aquando da captação de um estímulo esta é libertada na fenda sináptica. A DA extracelular, com o término do processo de sinalização, pode seguir dois caminhos distintos: sofrer recaptação ou ser metabolizada nas células gliais pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) ou pela catecol O-metiltransferase (COMT) (69,70). Através da **Figura 2.6**, podemos observar que no processo de metabolização através da enzima MAO, a DA é primeiramente transformada em 3,4-dihidroxi-fenilacetaldeído (DOPAL), este produto intermédio é então convertido em ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) por ação da enzima aldeído desidrogenase. Por outro lado, na via de metabolização através da COMT, a DA é transformada em 3-metoxitiramina (3MT). Tanto o DOPAC como o 3MT, após sucessivas reações, são convertidos no produto final, o ácido homovanílico (69,70).

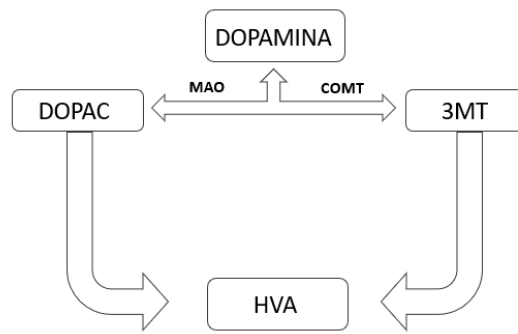


Figura 2.6 - Representação simplificada do metabolismo da dopamina. MAO – monoamina oxidase; COMT – catecol-O-metiltransferase; 3MT – 3-metoxitiramina; DOPAC – ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA – ácido homovanílico.

A DA, em ambiente básico ou seja, na presença de pH elevado, sofre oxidação do anel catecol, produzindo ROS como o peróxido de hidrogénio e o radical superóxido que, como já referido, podem reagir com iões metálicos. A DA pode ainda sofrer oxidação pelas enzimas ciclogénase e tirosinase, dando origem a ortoquinonas como a dopamina-quinona e a L-DOPA-quinona (69). Estes produtos são, posteriormente, convertidos em neuromelanina (NM), um pigmento presente nos neurónios dopaminérgicos e que se encontra diminuído em doentes com DP (71). Sugere-se que a NM possa desempenhar um papel neuroprotetor, ao sequestrar espécies metálicas reativas, no entanto ao ter afinidade para reagir com o H_2O_2 , esta pode ser um ponto de partida para a formação de mais espécies reativas, desempenhando, paralelamente, um papel neurotóxico (71).

Em condições de SO, a DA tem potencial para a formação de ROS que contribuem para danos oxidativos, o que irá comprometer o normal funcionamento das estruturas celulares, e acelerar a morte neuronal dopaminérgica. O dano oxidativo resultante deste processo, compromete ainda, a degradação proteica realizada pelo SUP, induzindo uma maior agregação proteica e consequente disfunção lisossomal, características presentes na DP (69,70).

Os níveis diminuídos de DA, presentes em doentes com DP, são cruciais para o desenvolvimento dos sintomas motores característicos da doença, facto comprovado pela resposta favorável à terapêutica com L-DOPA, dado que este é um precursor da DA.

2.6.4 Acumulação de Ferro

O Ferro é um elemento essencial para o normal funcionamento das diversas funções metabólicas do organismo, este participa no transporte de oxigénio para os tecidos, na síntese e reparação de ADN e na respiração mitocondrial (72).

Como mencionado anteriormente, o Ferro possui um contributo relevante no processo de SO e conseqüentemente constitui um dos demais fatores que condicionam o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP. Os níveis de Ferro encontram-se distribuídos de forma heterogênea nas diferentes regiões cerebrais, no entanto, elevados níveis de Ferro, que resultam da desregulação da sua homeostasia, aumento da taxa de metabolismo oxidativo ou devido à presença de mutações em genes envolvidos no metabolismo e homeostase do Ferro, têm sido verificados em cérebros de doentes com Parkinson, verificando-se o maior aumento na região da SN (72,73). Sendo assim, a acumulação de iões metálicos como o Ferro, nesta região, interfere na homeostasia celular, o que acaba por induzir reações redox com conseqüente produção de ROS/RNS. O peróxido de hidrogénio, produzido pelas mitocôndrias, numa tentativa de sequestrar o radical superóxido, pode este próprio ser convertido em mais ROS, na presença de Ferro, através de reações de Fenton e Haber-Weiss, explicadas anteriormente (72,73).

Em suma, a combinação do Ferro com estas espécies reativas gera um ciclo redox que culmina em neuroinflamação, disfunções mitocondriais, aumento da produção desregulada de espécies reativas e danos celulares irreparáveis, o que resulta na progressão da morte neuronal que se verifica nesta patologia.

2.7 Fatores de risco

Como tem vindo a ser evidenciado ao longo desta dissertação, a fisiopatologia da DP é de grande complexidade. A idade tem sido proposta como o principal fator de risco para o seu desenvolvimento, dado que a produção de DA nos neurónios diminui ao longo da vida, contribuindo para o aparecimento dos sintomas característicos da patologia. De seguida irão ser descritos os principais fatores de risco genéticos e ambientais que potenciam a gênese da doença (69).

2.7.1 Genéticos

A DP pode ser classificada como esporádica/idiopática, hereditária ou juvenil, como referido. A DP esporádica hipoteticamente resulta de interações entre fatores genéticos e ambientais, ao passo que a DP hereditária resulta de mutações genéticas, sendo estimado o seu envolvimento em pelo menos 10% dos casos (74). Existem inúmeros genes estudados, que de alguma forma se encontram associados a processos relacionados com a gênese da DP, e muitos outros ainda estarão por estudar. No **Quadro 2.2** encontram-se sistematizados os principais genes, cujas mutações se encontram envolvidas na patogénese da DP: SNCA, VPS35, PINK1, ATP12A2, CHCHD2, DJ-1 e LRRK2. Estão também referidos alguns aspetos relacionados com a sua hereditariedade e função que desempenham (74-76).

Quadro 2.2 - Principais genes relacionados com o desenvolvimento da Doença de Parkinson, a sua hereditariedade e principal função.

GENE	HEREDITARIEDADE	FUNÇÃO
<i>SNCA – ALFA SINUCLEÍNA</i>	Autossómico dominante	Codificação α -sinucleína
<i>VP35 – VACUOLAR PROTEIN SORTING-ASSOCIATED PROTEIN 35</i>	Autossómico dominante	Regulação mitocondrial
<i>PINK1 – PTEN INDUCED PUTATIVE KINASE 1</i>	Autossómico recessivo	Regulação mitocondrial
<i>ATP12A2 – ATPASE 13A2</i>	Autossómico recessivo	Lisossomal
<i>CHCHD2 – COILED-COIL-HELIX-COILED-COIL-HELIX DOMAIN CONTAINING 2</i>	Autossómico dominante	Indefinida
<i>DJ-1 – PARKINSONISM ASSOCIATED DELYCASE</i>	Autossómico recessivo	Regulação mitocondrial
<i>LRRK2 – LEUCINE RICH REPEAT KINASE 2</i>	Autossómico dominante	Regulação mitocondrial

As variantes mutantes do gene SNCA aceleram o processo de agregação da α S, que como revisto anteriormente, constitui o principal componente dos LB, contribuindo para o aumento do SO devido à sua excessiva acumulação (74,75). O gene VP35 mutante dá origem a perturbações no transporte de endossomas para os neurónios, o que conduz a uma acumulação anormal de ROS e consequentemente de SO, promovendo o desenvolvimento da patologia. Em relação aos genes PINK1 e DJ-1, estes são considerados em conjunto uma vez que possuem funções semelhantes (75,76). Diversas evidências afirmam a interação destes genes no sistema de degradação proteossomal bem como o seu papel na manutenção da

estrutura mitocondrial, deste modo, variantes mutantes destes genes contribuem para o desenvolvimento de disfunções mitocondriais, o que leva ao aumento do SO, constituindo um ciclo que promove a degradação celular e consequente contributo para a patologia (76). Mutações no gene ATP13A2 relacionam-se com o comprometimento da função lisossomal, potenciando a acumulação de aS e ROS, estando associados a casos de parkinsonismo juvenil com aparecimento de sintomas considerados atípicos como alucinações e ocorrência precoce de demência (77). Por fim, a expressão excessiva de variantes mutantes do gene LRRK2 está associada a uma maior vulnerabilidade mitocondrial que compromete o seu normal funcionamento, promovendo a produção de ROS (76).

Desta forma, o avanço científico na área da genética, tem vindo a permitir uma maior compreensão dos diferentes fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento desta patologia, possuindo grande impacto na diferenciação dos tratamentos e cuidados clínicos utilizados.

2.7.2 Ambientais

No que diz respeito a fatores ambientais, estudos científicos têm vindo a analisar os efeitos prejudiciais da exposição contínua a pesticidas e metais pesados. Como referido anteriormente neste trabalho, pesticidas como a rotenona e o MPTP, desencadeiam reações intracelulares dando origem a características físicas semelhantes ao parkinsonismo. A exposição prolongada a metais tóxicos, como o ferro, alumínio, mercúrio, chumbo, manganês, arsénico, cádmio e selénio, devido à sua capacidade de atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE), desempenha um papel importante no contributo da degeneração dopaminérgica. Desta forma, concentrações excessivas destes componentes podem aumentar o risco de desencadear processos neurodegenerativos, pela sua acumulação em regiões como a SN, estimulando mecanismos de SO (50).

Apesar de existirem fatores ambientais que aumentam o risco de desenvolver DP, existem igualmente fatores que conferem efeitos protetores nesta doença. Em relação a hábitos de estilo de vida, uma ingestão moderada de álcool, devido à sua influência nos mecanismos de regeneração dopaminérgica e no aumento dos níveis de ácido úrico no organismo, parece estar relacionado com efeitos neuroprotetores, no entanto existem ainda

estudos contraditórios neste sentido (24,78). Relativamente ao tabaco, diversos estudos têm demonstrado uma redução do risco de desenvolver DP associado ao seu consumo, uma vez que a nicotina é uma molécula com efeito antioxidante e estimulante da libertação de DA no organismo (79). Está, atualmente, evidenciado que o consumo de café e a prática regular de exercício físico diminuem o risco de desenvolver esta patologia, entre os mecanismos propostos destacam-se o aumento da libertação de DA, contributo na redução de SO e aumento dos níveis de ácido úrico, um antioxidante potente que atua na redução de ROS/RNS, contribuindo para a diminuição da morte celular (80). Em relação ao padrão alimentar diário, uma ingestão rica em frutas, vegetais, cereais e pobre em alimentos lácteos, tem sido associada a um risco de desenvolvimento de DP reduzido (24). Posto isto, é provável que um aumento do aporte de antioxidantes como vitaminas E, C, luteína e licopeno, estejam associados a efeitos protetores devido à sua função de sequestrar radicais livres, o que contribui para o controlo dos níveis de SO, processo central no desenvolvimento desta patologia (81).

Assim sendo, apesar da fisiopatologia da DP permanecer desconhecida, a hipótese de que esta resulta de uma combinação entre diversos fatores genéticos e ambientais tem vindo a ser confirmada e sustentada pelos inúmeros estudos realizados.

2.8 Sintomatologia

Como tem vindo a ser salientado ao longo deste capítulo, a DP caracteriza-se clinicamente pela presença de parkinsonismo: bradicinesia, tremor de repouso e rigidez, desenvolvendo ainda instabilidade postural com a progressão da doença. O início da manifestação dos sintomas motores ocorre quando se verifica uma perda dopaminérgica de aproximadamente 40 a 60% do total de neurónios nigroestriatais, no entanto a manifestação de sinais/sintomas não motores pode ocorrer anos ou até décadas antes do diagnóstico da patologia (82). Posto isto, é de extrema relevância o estudo de novas terapêuticas que atuem na modificação da doença em fases mais iniciais. De seguida serão descritos os principais sinais/sintomas motores e não motores da DP.

2.8.1 Sintomas motores

- Bradicinesia: Corresponde ao principal sintoma motor que se verifica nesta doença, sendo caracterizada pela diminuição progressiva da velocidade de reação, da amplitude dos movimentos (ex: abrir e fechar a mão, bater o pé no chão repetidamente), dificuldade na execução de tarefas simultâneas, dificuldade na motricidade fina, podendo ser acompanhada de dificuldade na deglutição. A hipotomia, ou seja, alterações na expressão facial, que permanece imóvel ou sem expressão e com diminuição do pestanejo, e a hipofonia (diminuição do volume da voz) são também, manifestações de bradicinesia (82,83).
- Rigidez: Segundo sintoma mais comum da DP, descrito como a instabilidade e resistência na movimentação dos membros. A limitação do movimento, que se verifica, deve-se à redução da sua amplitude, acompanhada da incapacidade de relaxamento muscular. É testado através da avaliação de exercícios físicos como a flexão e extensão cervical, articulação do joelho e no punho. Tratando-se de uma característica transversal a outras patologias, é habitualmente confundido e diagnosticado como artrite (8,82).
- Tremor de repouso: Sintoma presente em aproximadamente 75% dos casos de DP e usualmente um dos primeiros sintomas a manifestar-se. Consiste num movimento rítmico e involuntário principalmente nas extremidades, podendo estender-se a regiões como língua e mandíbula. Trata-se de uma característica heterogênea, podendo manifestar-se de forma moderada ou severa, sendo extremamente influenciada pelos níveis de stress do indivíduo. É avaliado através da observação, numa superfície plana, dos músculos relaxados, sendo a fricção repetida do polegar e indicador, o movimento mais comum nesta patologia. Na DP verifica-se, ainda, a presença de tremor postural. O tremor postural é um tipo de tremor que consiste na presença de movimentos involuntários em posição horizontal e contra a gravidade, evidenciando-se mais proeminente que o tremor de repouso e é considerado como um dos primeiros sinais da manifestação da doença. Tanto o tremor postural como o de repouso respondem de forma favorável à terapêutica dopaminérgica (8,82,84).

- Instabilidade postural: Principal sintoma da perda da capacidade de manter o equilíbrio em condições de repouso e preparação de movimentos. Diz respeito, ainda, à perda de reflexos, marcha lenta, desequilíbrio postural, redução do normal balanceio dos membros superiores aquando da marcha e é considerada a principal causa da maioria das quedas e consequentes fraturas que ocorrem na DP. A perda da coordenação motora que se verifica encontra-se relacionada com a desregulação dos circuitos sensoriais, visuais, motores e cognitivos, sendo consequente da doença. Trata-se de um sintoma que se manifesta nas fases mais tardias da doença e é avaliado introduzindo uma força para trás dos ombros do doente e observando a forma como este reage ao desequilíbrio aplicado (8,82,85).

2.8.2 Sintomas não motores

- Movimentos oculares rápidos e perturbações no sono: A RBD (perturbação comportamental do sono REM (*rapid eye movement*)), síndrome das pernas inquietas e apneia do sono constituem distúrbios do sono, os principais sintomas não motores da DP. O RBD corresponde a uma parassónia que se caracteriza pela encenação repetitiva de sonhos acompanhada de movimentos oculares rápidos, geralmente confundido com sonambulismo. Este distúrbio tem sido associado à acumulação de LB que se verifica em indivíduos com esta patologia. A apneia do sono é caracterizada por uma perturbação respiratória que consiste na interrupção do fluxo respiratório durante o sono. Estes distúrbios contribuem para a diminuição da qualidade de vida dos doentes, sendo importante haver uma maior sensibilização da parte de todos para este tipo de sintomas, de modo a conduzir a um diagnóstico mais precoce e a um tratamento mas especializado (8,82,86).
- Obstipação: Este sintoma resulta da diminuição dos movimentos intestinais, sendo considerada como uma das primeiras manifestações da doença na sua fase mais inicial. Esta pode ter como causas, o comprometimento do sistema nervoso autónomo, a fraqueza física e diminuída ingestão de líquidos, a excessiva deposição de aS e pode, ainda, resultar de um efeito adverso à medicação (8,82).

- Disfunção olfativa: A disfunção olfativa foi descrita, em indivíduos com DP, pela primeira vez em 1975, desde então tem sido observado que mais de 80% dos doentes apresentam este sintoma nos estádios mais iniciais da doença (82). Este pode ser considerado como um potencial marcador de neurodegeneração uma vez que sugere-se que a perda olfativa esteja associada ao processo de acumulação de agregados protéicos no bolbo olfativo. Estas disfunções podem ainda estar relacionadas com alterações no processo de sinalização de neurotransmissores, o que compromete a normal transmissão de sinais elétricos entre os neurónios. Contudo, não é um sintoma específico da DP, podendo manifestar-se em diferentes doenças neurodegenerativas não sendo possível estabelecer um diagnóstico baseado neste sintoma isolado (8,82,87).
- Depressão e perturbações cognitivas: A depressão é uma perturbação emocional estando associada a níveis diminuídos de neurotransmissores como a serotonina e a dopamina. Este é um dos principais sintomas não motores presente em mais de 50% de doentes com DP (82). Em relação às perturbações cognitivas, estas resultam da progressão da deterioração neuronal e caracterizam-se por disfunções de memória, de atenção, de execução de tarefas simples e eventualmente da linguagem (8,82). A presença deste sintoma pode estar associado com a predisposição genética de alguns indivíduos, manifestando-se com maior severidade em doentes com mutações nos genes PARKIN e PINK1 em comparação com doentes com DP idiopática (87).

2.9 Diagnóstico

O processo de diagnóstico nas fases mais iniciais da DP, continua até aos dias de hoje a ser um desafio. Um dos principais desafios no diagnóstico é a grande heterogeneidade de sintomas, gravidade e progressão da doença entre os diferentes doentes e o facto dos sintomas cardinais poderem se sobrepor a características comuns a outras doenças neurodegenerativas. Historicamente, o diagnóstico de DP baseava-se na presença de determinados sintomas, como tremor, rigidez muscular e bradicinesia. Foi apenas, em meados de 1988, que o *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* (UKPDSB), estabeleceu os primeiros critérios para o diagnóstico clínico desta patologia, considerando a presença de bradicinesia, seguida de resposta positiva a terapêutica dopaminérgica características principais (82). Anos mais tarde, *Gelb* definiu como sintomas cardinais, não só a presença de bradicinesia, como também a assimetria no comprometimento motor e o tremor de repouso (82). Em 2015, a *International Parkinson and Movement Disorder Society*, tendo como base os critérios de UKPDSB e *Gelb*, propôs a inclusão de sintomas não motores nos critérios de diagnóstico e a divisão da DP em estádios: DP pré-clínica, no início do processo de neurodegeneração e ausência de sintomas ou sinais clínicos; DP prodrómica, que se manifesta por sinais e sintomas não motores insuficientes para um diagnóstico conclusivo; DP clínica, na presença de sinais e sintomas motores e não motores, suficientes para um diagnóstico conclusivo de DP (88). Desta forma, é de destacar a importância do estudo aprofundado dos sintomas não motores na DP, para que seja possível um diagnóstico precoce nas fases iniciais da doença. Em adição ao exame físico, testes genéticos têm se mostrado úteis para identificar indivíduos que possuam risco aumentado de desenvolver a doença. Exames imagiológicos, que raramente são utilizados, são igualmente úteis na identificação da degenerescência dopaminérgica no estriado (82,88).

Atualmente, não existe ainda nenhum biomarcador que permita afirmar o diagnóstico da doença, no entanto muitos têm sido os estudos realizados nesta área. A presença de SO no organismo leva, então, à geração de diversas moléculas, sendo possível identificá-las nas distintas patologias associadas a este desequilíbrio. De seguida são apresentados os biomarcadores que têm demonstrado maior relevância (9).

Peroxidação Lipídica

O ácido linoleico e o ácido araquidónico são ácidos gordos polinsaturados que fazem parte da constituição das membranas neuronais e são considerados os maiores alvos de oxidação. No caso de comprometimento das capacidades antioxidantes da célula, é desencadeado um ciclo de reações *redox*, o que dá origem ao aumento de mais espécies oxidantes, conseqüente aumento do SO e danos prejudiciais à célula o que pode culminar em morte celular. O processo de peroxidação lipídica, pode ser definido como uma cascata de reações bioquímicas, que conduzem à geração de ROS, pela oxidação de espécies lipídicas. Este mecanismo possui assim a capacidade de alterar a estrutura membranar das células, pela danificação de moléculas como os fosfolípidos, o que compromete a sua função de barreira protetora. Em relação aos produtos da peroxidação lipídica que são passíveis de serem quantificados, sendo exemplos de bons indicadores de SO, são: a acroleína, o malonaldeído e o 4-hidroxi-2-nonenal (51).

Estes produtos, podem contribuir para o desencadeamento de doenças do SNC, através da capacidade de induzir uma descompensação *redox* nas células. A sua acumulação contribui para fenómenos prejudiciais ao normal funcionamento celular como alterações nos mecanismos de defesa antioxidante, degradação proteica, disfunções mitocondriais ou ativação glial (51).

8-Hidroxi-guanosina

A 8-Hidroxi-guanosina (8-OHG) é uma molécula que resulta da oxidação da guanosina no radical hidroxilo, tendo sido avaliada em diferentes estudos e proposta como um bom marcador de dano oxidativo. Em resultado dos estudos realizados, verificou-se que a 8-OHG se encontrava aumentada na região da SN em doentes com DP, o que corrobora com o aumento do SO que se verifica nesta patologia (89,90).

3. Abordagem Terapêutica da Doença de Parkinson

A terapêutica utilizada na DP pode ser dividida em: terapêutica farmacológica, terapêutica não farmacológica e estimulação cerebral profunda. A terapêutica farmacológica, que será apresentada de seguida, tem como principal objetivo a melhoria da sintomatologia associada à patologia, uma vez que não existe, atualmente, terapêutica modificadora da doença ou neuro-restauradora. Desta forma, não existe uma estratégia terapêutica padronizada, sendo que os regimes de tratamento são individualizados tendo em consideração os sintomas que o doente apresenta, assim como o seu grau de gravidade (8,90,91).

3.1 Levodopa

O tratamento farmacológico atual, tem como base a terapêutica de substituição dopaminérgica, que atua na melhoria de sintomas como a bradicinesia, o tremor e a rigidez muscular. A DA é uma molécula sem capacidade para transpor a BHE, deste modo é administrado a levodopa (L-DOPA), um pró-fármaco que atravessa esta barreira e sofre metabolização pelas DOPA descarboxilases, sendo convertida em DA na região cerebral (90). Ambas as estruturas destes componentes encontram-se representadas na **Figura 3.1**. De forma a maximizar a quantidade de fármaco que atinge o alvo (cérebro) e minimizar os efeitos da sua conversão a nível periférico, é aconselhada a administração da levodopa em combinação com inibidores da DOPA descarboxilase, como a carbidopa ou a benserazida (90-92). Apesar deste ser o tratamento mais comum e eficaz até à atualidade, a L-DOPA tem sido alvo de diversas investigações que evidenciam o contributo do uso prolongado deste fármaco no desenvolvimento de complicações motoras posteriores como discinesias e flutuações (91). As discinesias são movimentos musculares involuntários, que ocorrem usualmente quando o fármaco se encontra no seu pico de concentração, assim sendo a utilização da dose mínima eficaz é o mais indicado para a prevenção de complicações motoras significativas (90). Ocorrem, ainda, flutuações na mobilidade que se caracterizam por um estado *on* onde as capacidades motoras estão controladas e um estado *off*, aquando da diminuição do efeito do fármaco. Estas flutuações têm como causas as oscilações, que se verificam nos níveis de DA na via nigroestriatal e a diferente captação de L-DOPA nos vários tecidos (90,91). Adicionalmente, este fármaco pode provocar alterações gastrointestinais, alterações

neuropsiquiátricas e hipotensão ortostática, sintomas bastante comuns em doentes com esta patologia (91).

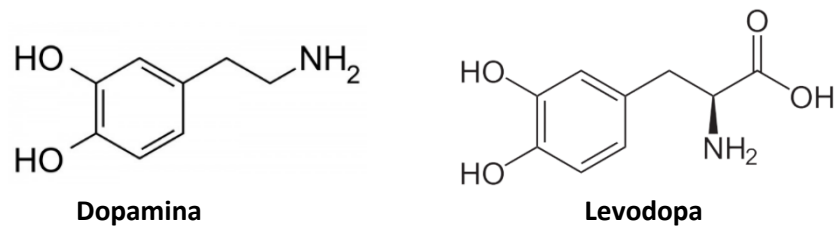


Figura 3.1 - Representação das estruturas químicas do neurotransmissor dopamina e da L-DOPA, um pró-fármaco que após biotransformação endógena dá origem à dopamina.

3.2 Agonistas da Dopamina

Os agonistas da dopamina são fármacos que atuam na estimulação do sistema dopaminérgico através da sua ligação direta com os recetores da DA. Estes agonistas, podem ser subdivididos em dois grupos: os agonistas derivados da ergotamina, que incluem a bromocriptina, pergolida, cabergolina e mesilato de di-hidroergocriptina, e os agonistas não derivados da ergotamina, como o piribedil, o pramipexol, o ropinirol, a apomorfina e a rotigotina (**Figura 3.2**) (93).

Contrariamente à L-DOPA, estes fármacos não necessitam de sofrer bioativação metabólica, sendo frequentemente prescritos como terapêutica farmacológica inicial em casos de DP em pacientes mais jovens, sendo que o seu principal objetivo corresponde à prevenção de possíveis complicações motoras após o tratamento prolongado com L-DOPA (90,93). Apesar deste grupo farmacológico ter como vantagem o atraso no aparecimento de discinesias e flutuações, a L-DOPA continua, até à atualidade, a ser o fármaco de eleição em termos de efetividade na terapêutica, desta forma, a estratégia mais aconselhada é o uso de agonistas da dopamina como terapêutica adjuvante (90,91). No entanto, parte destes agonistas podem ser indicados em monoterapia em casos de intolerância ou presença de complicações associadas à toma da L-DOPA. De um modo geral, este grupo de fármacos possui uma maior incidência de efeitos adversos em comparação com a L-DOPA, nomeadamente, hipotensão ortostática, edema dos membros inferiores e desenvolvimento de sonolência e alucinações, principalmente em doentes que já possuem alguma deficiência cognitiva. O principal efeito secundário que tem vindo a ser associado à terapêutica com esta classe é o

desenvolvimento de problemas comportamentais como perturbações no controlo de impulsos e consequente desenvolvimento de sintomas psiquiátricos como depressão, psicoses e transtorno obsessivo-compulsivo (90-93).

Posto isto, a utilização de agonistas da DA é atualmente indicada no tratamento inicial da DP ou em doentes que já apresentam complicações motoras, de modo a maximizar a resposta terapêutica da L-DOPA. A escolha de um agonista em detrimento de outro depende apenas do seu tempo de ação e tolerabilidade do indivíduo ao fármaco (92).

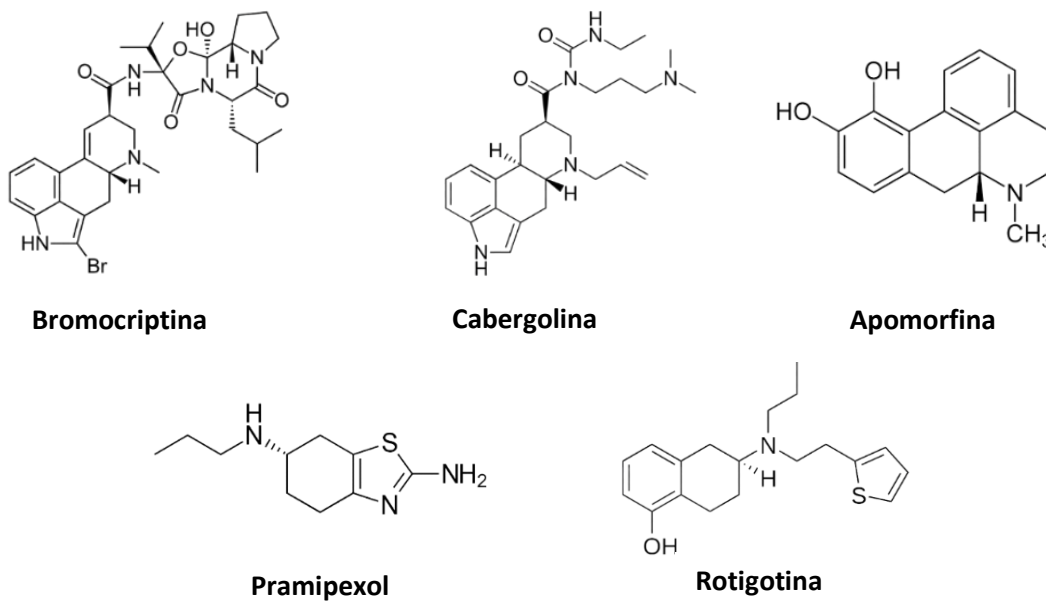


Figura 3.2 - Representação das estruturas químicas de alguns agonistas da dopamina.

3.3 Anticolinérgicos

Os anticolinérgicos são fármacos que atuam na DP através de mecanismos não dopaminérgicos. Pensa-se que uma das causas para o desenvolvimento dos sintomas motores desta doença seja o desequilíbrio que se verifica entre os neurotransmissores acetilcolina e DA. Com a finalidade de restaurar o seu equilíbrio surgiram, então, os antagonistas não seletivos dos recetores muscarínicos da acetilcolina (anticolinérgicos), que inibem a ação deste neurotransmissor. Dentro desta classe farmacológica podemos destacar a benztropina, biperideno e tri-hexifenidilo (**Figura 3.3**) (90,92).

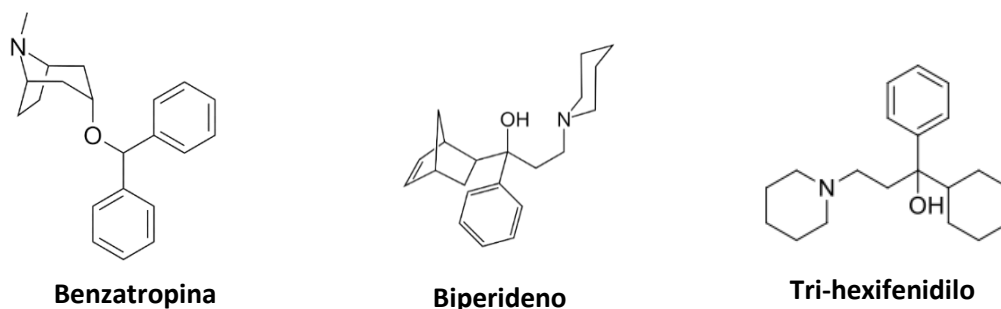


Figura 3.3 - Representação da estrutura química de anticolinérgicos.

Este grupo de fármacos é geralmente indicado em combinação com a L-DOPA no tratamento de doentes com DP recente, sendo eficazes na melhoria da rigidez muscular e tremores de repouso, não tendo qualquer efeito sobre a bradicinesia. Dado que se tratam de fármacos não seletivos para apenas um tipo de recetor muscarínico, o seu uso é limitado e acarreta efeitos secundários, tais como visão turva, xerostomia, retenção urinária, obstipação, dificuldades de deglutição e desenvolvimento de problemas a nível cognitivo e neuropsiquiátrico. Posto isto, são fármacos que devem ser evitados em doentes com idade mais avançada ou que já apresentem comprometimento cognitivo (90,94).

3.4 Inibidores seletivos da monoaminoxidase B

Existem, distribuídas pelo sistema nervoso, duas isoformas das enzimas mitocondriais MAO, a MAO-A e a MAO-B. Enquanto a MAO-A metaboliza neurotransmissores como a noradrenalina, serotonina e DA, a MAO-B é a enzima que está envolvida na metabolização seletiva da DA. Os principais inibidores da MAO-B (IMAO-B) comercializados são a selegilina, a rasagilina e mais recentemente a safinamida (95).



Figura 3.4 - Representação das estruturas químicas de inibidores seletivos da MAO-B.

Este grupo de fármacos, atuam na inibição da enzima MAO-B, interferindo na metabolização da DA, com a finalidade de prolongar a atividade dopaminérgica. São usualmente indicados em monoterapia nos primeiros estadios da doença ou em conjunto com outros fármacos antiparkinsonianos. A selegilina, um inibidor irreversível seletivo da MAO-B, atua na diminuição da degradação da DA ao inibir a atividade da enzima, no entanto, não possui benefícios significativos quando utilizada em monoterapia (91). Deste modo, é geralmente indicada como fármaco adjuvante em situações de resposta decrescente à L-DOPA ou na presença de flutuações motoras, os denominados fenômenos *on/off*. É importante referir que este fármaco apresenta alguns efeitos adversos, sendo o principal o desenvolvimento de insônia, uma vez que a sua metabolização dá origem a anfetamina e metanfetamina. Pode ainda causar confusão mental, alucinações e agravamento de discinesias provocadas pela toma da L-DOPA (90-92,95).

A rasagilina, para além de ser um inibidor reversível, a sua potência e tolerabilidade é superior em relação à selegilina, podendo ser utilizada em monoterapia ou como terapêutica adjuvante em doentes que apresentem flutuações de fim de dose. A sua eficácia no tratamento da DP é modesta e apesar de ter demonstrado propriedades neuroprotetoras em modelos animais, os estudos para investigar a sua capacidade de modificar a progressão da patologia têm produzido resultados incertos, pelo que a hipótese continua em aberto,

tornando a decisão de usá-la com esta finalidade, do médico. (91,95,96). Em relação a efeitos adversos, este fármaco deve ser utilizado com precaução em doentes com comprometimento hepático grave, podendo, ainda, provocar efeitos como alucinações, confusão mental e distúrbios do controlo de impulsos (96).

A safinamida é um fármaco mais recente, que entrou para o mercado em 2015, enquadra-se no grupo dos IMAOB, no entanto é um derivado da α -aminoamida, por esta razão o seu modo de ação pode ser dopaminérgico, através da inibição da MAO-B ou não dopaminérgico, através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, bloqueio dos canais de cálcio e redução da libertação de glutamato. Efeitos neuroprotetores têm sido alvo de discussão, uma vez que as suas ações não dopaminérgicas contribuem para a diminuição da formação de ROS/RNS, o que conduz a uma redução do SO e consequente melhoria da sintomatologia da doença (90,91,95).

3.5 Inibidores da catecol-o-metiltransferase (COMT)

Como evidenciado anteriormente, a enzima Catecol-O-Metil-Transferase é uma enzima que também está envolvida no metabolismo da DA, desta forma os inibidores da COMT (ICOMT) são fármacos que diminuem a degradação de DA, prolongando a sua ação. Atualmente, os principais ICOMT comercializados são a tolcapona, a entacapona e a opicapona, sendo que a tolcapona não se encontra comercializada em Portugal. (Figura 3.5) (90-92,97).

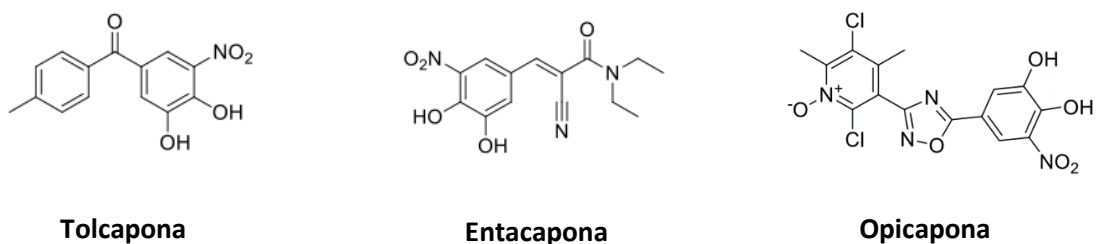
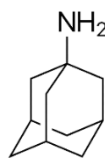


Figura 3.5 - Representação das estruturas químicas de inibidores da COMT.

Estes fármacos possuem um efeito limitado sobre os sintomas da DP, sendo assim são indicados como terapêutica adjuvante da L-DOPA em doentes que possuam flutuações motoras como resultado da ineficácia de terapêuticas baseadas na sua combinação com inibidores da DOPA descarboxilase. Estes fármacos atuam na redução da metilação da L-DOPA a nível periférico, o que contribui para o aumento do seu tempo de semi-vida e prolongamento dos seus efeitos terapêuticos (90-92). Em relação aos COMT referidos, enquanto a entacapona e a opicapona estão envolvidas apenas na inibição periférica desta enzima, não possuindo a capacidade de transpor a BHE, a tolcapona inibe a COMT tanto a nível central como periférico (97). Em termos de efeitos secundários, estes estão associados a um aumento da estimulação dopaminérgica devido ao prolongamento da exposição à L-DOPA, podendo destacar-se a elevada incidência de diarreia, agravamento de discinesias, náuseas, confusão mental e coloração alaranjada da urina (91,92). A tolcapona possui algumas restrições à sua utilização, devido ao seu efeito hepatotóxico, sendo apenas aconselhada em casos de ineficácia de outros fármacos (97). Em um estudo realizado em 2022, com o objetivo de avaliar a farmacocinética da opicapona em comparação com a entacapona em terapêutica adjuvante com a L-DOPA/Carbidopa, revelou a superioridade da opicapona em relação à entacapona, uma vez que esta proporciona uma maior disponibilidade plasmática de levodopa por um maior período de tempo, contribuindo para a diminuição das flutuações motoras derivadas da variação da sua concentração no organismo do doente (98).

3.6 Amantadina

A amantadina (**Figura 3.6**) é um fármaco antiviral, inicialmente desenvolvido como tratamento na infecção pelo vírus *influenza*. Mais tarde, foi descoberto o seu potencial, apesar de limitado, na terapêutica da DP, uma vez que para além de ser um fármaco antiviral, a amantadina é antagonista dos recetores de glutamato NMDA (90,98). O mecanismo de ação deste fármaco não está completamente esclarecido, no entanto verifica-se que o bloqueio da atividade glutaminérgica confere efeito terapêutico ao interferir na excessiva neurotransmissão de glutamato e sugere-se que esteja envolvida, ainda, na estimulação de libertação de DA, diminuição da sua recaptação na fenda sináptica e possíveis propriedades anticolinérgicas (99). Através da sua ação terapêutica, a amantadina pode melhorar sintomas como os tremores de repouso, a bradicinesia, rigidez muscular, assim como reduzir discinesias associadas à exposição prolongada de L-DOPA. Apesar de ser menos eficaz que esta, é útil na melhoria da sintomatologia a curto prazo em indivíduos com doença leve, sendo habitualmente indicada como seu adjuvante, permitindo a redução da sua dose. Em relação a efeitos secundários desta terapêutica, estes incluem: comprometimento cognitivo, edema dos membros inferiores, perda de apetite, náuseas, vômitos, insónia, confusão/agitação, cefaleias e alucinações (90-92,99).



Amantadina

Figura 3.6 - Representação da estrutura química da amantadina.

4. Uso de Glutathiona na Abordagem Terapêutica

4.1 Estrutura da glutathiona

A relevância da GSH tem sido investigada desde que foi descrita pela primeira vez, em 1888, por *Rey-Pailhade*, tendo sido denominada de “*phiothion*” após ser demonstrada a sua capacidade de reduzir o enxofre a sulfureto de hidrogênio em extratos de leveduras (100). Desde esse tempo, muitos investigadores têm-se dedicado à extração e síntese da GSH. Foi apenas em 1929, após algumas controvérsias acerca da estrutura deste elemento, que o investigador Hopkins determinou que a GSH consistia num tripéptido linear constituído por aminoácidos não essenciais: a cisteína, a glicina e o glutamato (100).

Este antioxidante encontra-se distribuído de forma ubíqua em todas as células, podendo apresentar-se em duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (**Figura 4.1**), sendo que aproximadamente 98% da GSH total no organismo se encontra na forma reduzida. A glutathiona é considerada como o antioxidante endógeno com maior abundância no organismo, desempenhando um papel neuroprotetor através de processos como: controlo de ROS/RNS e consequente equilíbrio redox, regulação do ciclo celular sinalização celular, defesa imunológica, expressão de genes e diferenciação celular, encontrando-se também envolvida no metabolismo de xenobióticos e de alguns compostos endógenos como leucotrienos e prostaglandinas (100-102).

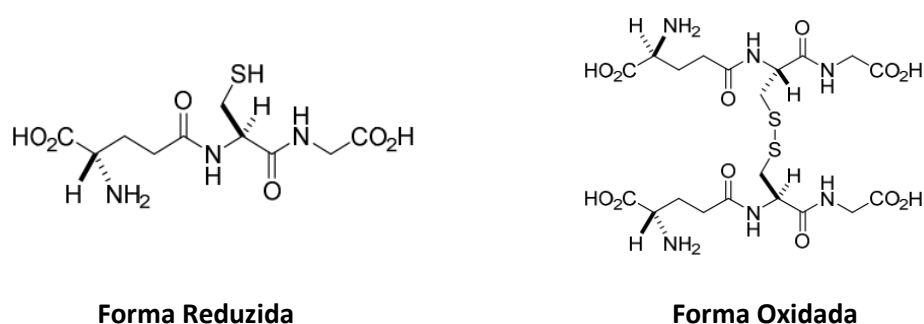


Figura 4.1- Representação das estruturas químicas da glutathiona na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

4.2 Síntese e metabolismo da glutathiona

A síntese de GSH, que ocorre no citoplasma das células, pode ser dividida em duas etapas consecutivas dependentes de ATP (102). Na primeira reação, através da γ -glutamilcisteína sintetase (GCS) é estabelecida a ligação peptídica entre o grupo amina do aminoácido cisteína e o grupo carboxilo do glutamato, dando origem à γ -glutamilcisteína, a qual é combinada com a glicina numa reação catalisada pela enzima glutathiona sintetase (GS) para a geração do produto final, a GSH (102). Esta está envolvida no processo de regulação da enzima GCS através de um mecanismo de *feedback* negativo, prevenindo a acumulação de GSH ou do seu intermediário, a γ -glutamilcisteína (100). A cisteína é considerada o fator limitante na síntese deste antioxidante uma vez que dos três aminoácidos, este é o mais escasso, podendo esta ser obtida através da degradação da GSH extracelular ou pela transulfuração do aminoácido metionina no fígado (102). Este órgão é assim considerado como o mais importante na homeostase da GSH, pelo seu envolvimento na síntese deste fator (102,103).

O fornecimento de cisteína para a síntese de GSH é realizado pelo sistema de transporte da cistina, um aminoácido natural formado por duas moléculas de cisteína, verificando-se uma elevada expressão deste sistema nos astrócitos (102). Nestas células gliais, a cistina é captada através do transportador de troca cistina-glutamato, onde é posteriormente reduzida a cisteína para a síntese de GSH, sendo esta última posteriormente transportada para o espaço extracelular através dos transportadores resistentes a múltiplos fármacos (100,102). Após a sua libertação, a GSH produzida pelos astrócitos tem a capacidade de reduzir a cistina extracelular a cisteína, podendo esta ser imediatamente transportada, através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) tipo 3, para os neurónios para nova síntese de GSH (103). Até à atualidade, foram descritos 5 tipos de EAAT: no cérebro, mais precisamente nos astrócitos encontram-se distribuídos os EAAT1 e EAAT2, enquanto o transportador EAAC1 é exclusivamente expresso nos neurónios (100,103).

Os níveis de GSH que se encontram a nível neuronal são inferiores aos níveis presentes nos astrócitos, desta forma foram realizados diversos estudos *in vitro* que demonstraram que a co-incubação de células neuronais e astrócitos promove o aumento de GSH nos neurónios,

uma vez que estas células da glia têm a capacidade de fornecer os precursores necessários para a síntese de GSH, nomeadamente a cisteína, como descrito anteriormente (100,101).

O metabolismo da GSH, ocorre maioritariamente na superfície externa das membranas plasmáticas, por ação inicial das enzimas γ -glutamiltanspeptidases que se encontram na superfície celular. A GSH sofre hidrólise por ação destas enzimas, e é convertida no dipéptido glicina-cisteína e em glutamato, sendo a ligação peptídica entre a glicina e a cisteína posteriormente clivada através das dipeptidases ligadas à membrana celular. Estes produtos, obtidos da degradação da GSH, são reabsorvidos, tornando-se precursores de nova síntese de GSH, o que contribui para a regeneração endógena contínua deste antioxidante (100-102).

4.3 Mecanismos de ação da glutathione

Como revisto anteriormente, o SO resulta de uma produção excessiva de radicais livres, o que conduz à danificação do sistema celular e conseqüente dano oxidativo. A GSH pode atuar como antioxidante de forma direta ou indireta, uma vez que tem a capacidade de reagir diretamente com radicais livres, particularmente o radical superóxido, óxido nítrico e o radical hidroxilo, e de forma indireta, através da ação da glutathione peroxidase (GP) (104). A GP é uma enzima envolvida no processo de destoxificação de peróxidos orgânicos, nomeadamente o peróxido de hidrogénio, contribuindo assim para a ação antioxidante da GSH (100,102). Neste processo de destoxificação, inicialmente a enzima SOD provoca uma dismutação do radical superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio. De seguida o H_2O_2 é neutralizado, por ação da GP, e convertido em oxigénio e água, pela oxidação do grupo tiol da cisteína da GSH reduzida, sendo esta última transformada na sua forma oxidada (102,105). No controlo de RNS, estas espécies são neutralizadas pela sua conjugação com a GSH, dando origem ao produto S-nitrosoglutationa, reduzindo assim o stress nitrosativo e evitando possíveis danos celulares (105).

A GSH possui outras funções importantes para o normal funcionamento celular, como o seu envolvimento no transporte e armazenamento de moléculas de cisteína, dado que esta pode sofrer auto-oxidação sendo convertida na cistina, aminoácido que produz radicais tóxicos para o organismo (104). Sugere-se, ainda, que esta esteja igualmente envolvida em mecanismos de desintoxicação de xenobióticos, quer por ser utilizada como substrato de

reações de conjugação quer por conjugação direta desta, sendo que todo o controlo de transcrição de genes necessários à formação das enzimas envolvidas neste processo de desintoxicação é realizado pelo fator nuclear eritide 2 (Nrf2), que atua, assim, como um importante regulador da resposta antioxidante (101-103). A GSH desempenha, ainda, diversas outras funções, nomeadamente na manutenção da homeostase de metais, visto que está envolvida no seu transporte e entrega a moléculas-alvo, evitando o aumento da geração de ROS e diminuindo a toxicidade oxidativa que estes podem provocar (103,104).

Para que a glutathiona exerça a sua função protetora e antioxidante, é essencial que o seu processo de regeneração seja mantido. Na sua regeneração encontram-se envolvidas três enzimas: a GP, a glutathiona oxidase (GO) e a glutathiona redutase (GR), enquanto as duas primeiras catalisam a reação de oxidação da GSH em GSSG, a última, na presença do co-fator NADPH, é responsável pela regeneração de GSH, a partir da redução da GSSG. A razão GSH/GSSG poderá ser um bom indicador de SO, dado que nessas condições, a GSH é então oxidada em GSSG, o que conduz a uma baixa relação GSH/GSSG e consequentes disfunções celulares pela diminuição da ação antioxidante da GSH (101,102,105).

4.4 Potencial do uso da glutathiona na Doença de Parkinson

Ao longo dos anos, diversos estudos têm relevado a existência de uma diminuição de aproximadamente 30-50% dos níveis de GSH na SN, assim como um rácio GSH/GSSG diminuído em vários tecidos cerebrais, em doentes com DP (106). Estes doentes apresentam, ainda, uma deficiente atividade das enzimas: complexo mitocondrial I, glutathiona-S-transferase, GR, GP e GCS, o que provoca uma diminuição da síntese e regeneração de GSH e consequente diminuição da atividade antioxidante exercida por esta, tornando o cérebro mais suscetível a substâncias tóxicas (106,107).

Como referido anteriormente, em condições de SO, a DA sofre facilmente oxidação sendo convertida nas DA-quinonas, estas quinonas têm tendência para reagir com resíduos de sulfidrilo em proteínas funcionais, o que conduz à formação de quinoproteínas, que induzem a sua disfunção e consequente morte celular (103). A GSH é assim, considerada como um neuroprotetor de elevada relevância principalmente nos neurónios dopaminérgicos, não só pela sua ação no controlo de ROS mas também no controlo da formação de DA-quinonas,

dado que o grupo sulfidrilo da cisteína que constitui a GSH compete com as DA-quinonas, o que evita a formação de quinoproteínas, diminuindo a sua degeneração celular (103,106).

Tendo em conta a função exercida pela GSH no controlo e diminuição do SO, na redução da neurodegeneração dopaminérgica induzida por este e devido aos restantes mecanismos de ação deste antioxidante, muitos têm sido os estudos realizados para avaliar o potencial da suplementação de GSH na melhoria da sintomatologia motora associada à DP (107).

Num estudo realizado em 1996, foram administrados, por um período de 30 dias, 600 mg de GSH por via intravenosa (IV) a 9 participantes diagnosticados com DP idiopática e sem tratamento prévio (108). Apesar de existir discórdia em alguns estudos devido à impossibilidade da GSH atravessar a BHE, após a sua administração, o estudo apresentado relatou uma melhoria na sintomatologia motora de todos os doentes e uma redução de 42% na sua incapacidade (108,109). Após o término do tratamento com este antioxidante, o seu efeito perdurou nos 2 a 4 meses seguintes, evidenciando a possibilidade da GSH possuir um efeito protetor contra a progressão desta patologia, não sendo relatados efeitos adversos significativos à sua utilização (108).

Em 2009, foi realizado um ensaio clínico randomizado duplamente cego, com o objetivo de avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia da administração de GSH IV na DP (110). Deste modo, 21 participantes, cuja sintomatologia não se encontrava controlada com a medicação convencional prescrita, foram aleatoriamente selecionados para receber 1400 mg de GSH IV ou placebo, administrados 3 vezes por semana durante um mês. Após análise, a GSH foi bem tolerada e a sua utilização considerada como segura. Os resultados obtidos revelaram uma ligeira melhoria na sintomatologia dos doentes, sendo que nos meses seguintes à sua administração verificou-se uma regressão na função motora (110).

Ambos os estudos, afirmam a necessidade da realização de ensaios clínicos com amostras maiores e sugerem a existência de uma heterogeneidade na melhoria dos sintomas de cada indivíduo com DP (108,110).

Em 2017, foi publicada uma análise individual a um doente de 61 anos, com terapêutica habitual de L-DOPA/carbidopa, e que apresentava rigidez muscular e disartria, assim como complicações cognitivas (111). Após otimização da frequência de administração da GSH, foram administrados 1400 mg de GSH IV três vezes por semana, bem como suplementação oral de N-acetilcisteína e alterações na dieta do doente, por um período de 1 ano. Após 3 semanas de tratamento alternativo com a GSH, foi demonstrada uma melhoria em sintomas motores como a rigidez muscular, sendo relatada uma melhoria na expressão facial do indivíduo, assim como uma melhoria na função cognitiva do mesmo (111). Uma vez que tanto as alterações na dieta como a suplementação com N-acetilcisteína foram iniciadas ao mesmo tempo, não é claro a extensão do efeito da GSH por si só, no entanto, após tentativa de adiamento ou aumento do espaçamento entre as injeções deste antioxidante, verificou-se uma regressão na função motora sugerindo que a GSH tenha sido a principal causa da melhoria apresentada (111).

Numa meta-análise sistemática que incluiu sete ensaios clínicos randomizados publicados entre 2003 e 2019 e que envolveu um total de 450 participantes distribuídos em três grupos: o grupo controlo, o grupo que recebeu 300 mg de GSH IV, e o grupo que recebeu 600 mg de GSH IV, relatou diferenças estatisticamente significativas entre estes (107). Os resultados desta análise sugeriram que a dose de 300 mg seria mais eficaz que a de 600 mg, não sendo possível considerá-la como dose ótima uma vez que não foram estudadas outras hipóteses. O estudo apresenta diversas limitações que podem ter interferido nos resultados obtidos nomeadamente, a amostra reduzida de estudos incluídos, a sua qualidade variável uma vez que estes demonstraram diferentes níveis de risco de viés, o que pode interferir na confiança dos resultados obtidos, e a elevada heterogeneidade dos participantes em termos da etnia, sexo, idade e nível de severidade da doença, que não foi tomada em conta. Posto isto, e apesar destas limitações, esta análise concluiu que a GSH é segura e pode melhorar ligeiramente a sintomatologia motora dos doentes não tendo qualquer influência na melhoria de sintomas não motores, sugerindo também que a definição da posologia afeta a extensão da eficácia do tratamento, e afirmando a necessidade de uma investigação mais profunda no futuro (107).

Para além destes estudos, até à atualidade, muitos outros têm avaliado o uso da GSH em diferentes abordagens terapêuticas, nomeadamente através da administração de GSH intranasal, do uso de análogos de GSH e seus derivados lipofílicos e pela administração de conjugados de GSH e L-DOPA (109,112,113). Este último método de conjugação, sugere a existência, de uma maior passagem destes conjugados através da BHE evitando a fácil degradação da GSH pelas protéases periféricas, proporcionando uma maior restauração dos níveis de GSH e DA no estriado (103,112).

Em suma, apesar dos resultados destes estudos afirmarem, na generalidade, o potencial da GSH na sintomatologia motora desta patologia e tendo em consideração todas as limitações apresentadas, todos eles sugerem a necessidade de investigações futuras de grande escala, de modo a avaliar a extensão da sua eficácia no tratamento da DP.

5. Substâncias que interferem com os níveis de glutatona

5.1 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) (**Figura 5.1**) é um precursor do aminoácido L-cisteína e consequentemente um precursor da síntese de GSH, sendo amplamente utilizada como mucolítico ou como antídoto na intoxicação por paracetamol (114,115). A NAC através da sua ação na degradação das ligações dissulfureto das glicoproteínas que constituem o muco, promove a diminuição da sua viscosidade, exercendo a ação mucolítica. Desempenha a sua função de antídoto ao proporcionar de forma indireta a síntese de GSH, o que leva ao restabelecimento das suas reservas hepáticas, que se encontram invariavelmente diminuídas devido à administração excessiva de paracetamol (114). A GSH tem, então, a capacidade de se ligar a ROS/RNS promovendo a sua destoxificação, bem como de se conjugar com o metabolito tóxico N-acetil-p-benzoquinona imina produzido pelo metabolismo do paracetamol via citocromo P450, convertendo-o em metabolitos não tóxicos e facilmente eliminados por via renal (114,115).

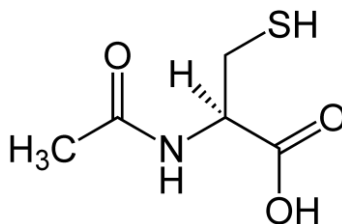


Figura 5.1: Representação da estrutura química da N-acetilcisteína (NAC).

A administração de GSH, como revisto anteriormente, apresenta algumas limitações, deste modo diferentes alternativas que visam aumentar ou restaurar os seus níveis na SN têm sido avaliadas. Posto isto, a administração oral de cisteína tem sido, igualmente, investigada, com o intuito de avaliar a sua capacidade de promover o aumento dos níveis de GSH a nível cerebral (115). No entanto, os estudos realizados revelaram uma insuficiente restauração destes níveis uma vez que a cisteína sofre, facilmente oxidação o que leva à geração de ROS (115,116). Por outro lado, a administração de NAC tem sido sugerida como uma solução a esta limitação, sendo esta mais estável do que a cisteína, mais eficiente no fornecimento de moléculas de sulfidriolo e com maior facilidade de penetrar a BHE, promovendo, assim, uma maior ação antioxidante (114,115). A NAC depois de entrar nas células é rapidamente

hidrolisada, libertando a cisteína que fica livre para, através da ação das enzimas GCS e GS, contribuir para a formação de GSH e estimulação de enzimas envolvidas na sua regeneração (114,116).

Para além de atuar como antioxidante, a NAC tem sido, também, considerada como um modulador glutamatérgico dado que se encontra envolvida em mecanismos de homeostasia deste neurotransmissor, regulando a sua troca neuronal através da sua ligação ao *antiporter* cistina-glutamato (114,117). Este sistema capta a cistina que é posteriormente transformada em cisteína, podendo esta ser utilizada na síntese de GSH, contribuindo assim, para a redução dos níveis de SO nas células e consequente diminuição da sua apoptose (117).

Uma outra aplicação deste antioxidante tem sido estudada. Após análise, verificou-se que este composto tem a capacidade de contribuir na eliminação de ROS/RNS e DA-quinonas induzidas pelo SO, através da sua contribuição na promoção da síntese de GSH, que atua na formação de conjugados como anteriormente referido (115,116). Em um estudo publicado em 2010, realizado em ratos transgênicos que possuíam uma acumulação excessiva de agregados de aS, foi demonstrada que a suplementação com NAC promoveu o aumento dos níveis de GSH na SN dos seus cérebros e que a degradação dopaminérgica associada à toxicidade proporcionada pelos agregados de aS foi significativamente atenuada, o que destaca a relevância dos diferentes mecanismos de ação da NAC como possíveis adjuvantes no tratamento desta patologia (118).

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos, através da análise da atividade do complexo mitocondrial I nos terminais pré-sinápticos em modelos de ratos, têm demonstrado que após a administração IV de NAC há um aumento significativo dos níveis de GSH na SN e uma estimulação da atividade deste complexo, que geralmente se encontra diminuída nesta patologia o que promove a falta de GSH e consequente degeneração dopaminérgica (116,119). Para além disto, outros estudos têm revelado que a NAC possui propriedades anti-inflamatórias, principalmente nos estados iniciais da resposta imunitária, pela sua capacidade de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa, a interleucina 6 e a interleucina 1beta, evitando possíveis disfunções estruturais e funcionais das mitocôndrias (114,115,120). Através desta inibição, a NAC tem a capacidade de prevenir

a despolarização das membranas celulares das mitocôndrias, contribuindo, assim, para a inibição dos mecanismos de morte celular e prevenindo os danos oxidativos a que estas se encontram sujeitas nas condições de SO que se verificam ao longo da progressão da DP (115).

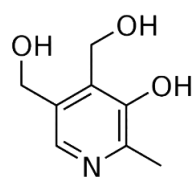
Num estudo aberto e prospetivo publicado em 2018, durante um período de 4 semanas foram administrados, diariamente, 6000 mg de NAC por via oral a 5 indivíduos diagnosticados com DP e 3 controlos saudáveis. Este estudo teve como principais objetivos a avaliação da farmacocinética da NAC e do seu efeito nos níveis sistémicos e cerebrais de GSH, a avaliação da sua tolerabilidade, o seu efeito nos níveis de SO e a avaliação da sua possível ação na sintomatologia dos doentes (121). As amostras de sangue foram recolhidas antes e depois da administração da dose de modo a avaliar os níveis de NAC, cisteína, GSH, rácio GSH/GSSG e avaliar os níveis de SO através do malondialdeído e do 4-hidroxinonanal, produtos do processo de peroxidação lipídica. Após análise, verificou-se um aumento significativo do rácio GSH/GSSG periférico, no entanto este estudo não revelou alterações significativas nos níveis de SO e GSH no cérebro, o que pode estar relacionado com a baixa disponibilidade oral da NAC, sendo necessárias doses mais elevadas para esta ser capaz de exercer um efeito mais proeminente (121). No entanto, doses elevadas de NAC estão associadas a efeitos adversos como dores de cabeça e problemas gastrointestinais, pelo que a produção excessiva de GSH também tem demonstrado efeitos tóxicos nos neurónios (122).

Em suma, serão necessárias investigações futuras de modo a ser possível otimizar a dose de NAC pelas diferentes vias de administração e caracterizar de forma mais concreta o seu possível papel na prevenção e/ou retardamento da progressão desta patologia.

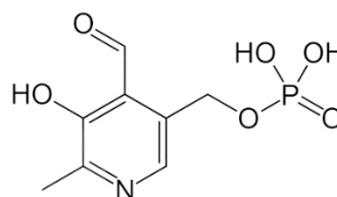
5.2 Piridoxina

A piridoxina (vitamina B6), não é sintetizada endogenamente, encontrando-se presente no organismo humano sob a forma de seis metabolitos hidrossolúveis: piridoxal, piridoxina, piridoxamina e sob as suas formas 5'-fosforiladas: piridoxal 5'-fosfato (PLP), piridoxina 5'-fosfato e piridoxamina 5'-fosfato. Esta vitamina hidrossolúvel pode, então, ser catabolizada em ácido 4-piridóxico, que é posteriormente excretado na urina (123,124).

As formas não fosforiladas, ao contrário do que ocorre com os análogos fosforilados, são facilmente absorvidas por difusão passiva e quando se encontram nos enterócitos sofrem refosforilação e posterior oxidação dando origem ao metabolito ativo PLP (**Figura 5.2**), que após sofrer desfosforilação na superfície intestinal, é libertado na circulação portal (123). Estes compostos atuam, geralmente, como coenzimas em processos metabólicos de aminoácidos tais como a transaminação, descarboxilação, racemização e em reações de eliminação, assim como desempenham função de cofatores na síntese de ácidos nucleicos, hidratos de carbono e de neurotransmissores como a dopamina, a serotonina e o GABA (123,124).



Piridoxina



Piridoxal 5'-fosfato

Figura 5.2: Representação das estruturas da piridoxina e do seu metabolito ativo, o piridoxal 5'- fosfato (PLP), respetivamente.

À piridoxina tem vindo a ser atribuído um papel neuroprotetor, não só pela sua ação na regulação do sistema glutamatérgico e, conseqüentemente, nos níveis de glutamato e GABA, o que contribui para a atenuação dos efeitos provocados pela sua excitotoxicidade, como pela sua intervenção na biossíntese de GSH (125). Através, do seu metabolito ativo, o PLP, esta vitamina atua como coenzima na reação de conversão da homocisteína em cisteína, promovendo a síntese de GSH que irá, então, exercer a sua ação antioxidante através de diversos mecanismos de eliminação de ROS/RNS anteriormente descritos (123,125). Para além da sua ação na síntese de GSH, o PLP pode também ser considerado como um

antioxidante que regula, indiretamente, a homeostase da GSH, dado que ao possuir a capacidade de sequestrar radicais livres, poupa e promove o aumento dos níveis deste potente antioxidante (126). Os possíveis efeitos benéficos da suplementação da piridoxina têm sido amplamente estudados, deste modo, numa análise de vários estudos publicada em 2015, foi demonstrado que esta vitamina, devido à sua contribuição na redução do SO, poderá estar associada a um efeito protetor no desenvolvimento da DP (127).

Num estudo publicado em 2020, foi avaliada a importância do recetor de dopamina D2 nos astrócitos, demonstrando a sua relevância na regulação da síntese de GSH através da ativação do fator de transcrição Nrf2 mediada pela enzima piruvato quinase M2 (PKM2), importantes na regulação da resposta antioxidante (128). Foi também demonstrado neste estudo *in vitro* que a piridoxina possui a capacidade de aumentar a produção de PKM2, assim como de fortalecer a sua ligação ao fator Nrf2, promovendo a síntese de GSH e consequente efeito de neuroproteção (128). Em comparação com a vindolina, um composto que demonstrou igualmente capacidade de promover a produção de PKM2, a piridoxina demonstrou um aumento superior na promoção da síntese de GSH, exercendo uma baixa citotoxicidade nos astrócitos (128). Simultaneamente, foi realizado um ensaio *in vivo* através de modelos animais, os quais foram suplementados com piridoxina antes da administração de MPTP de modo a avaliar os efeitos da biossíntese de GSH induzida por esta no SO induzido pelo MPTP. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento de GSH induzido por esta vitamina proporcionou, não só, uma diminuição da perda dopaminérgica como uma melhoria na locomoção dos animais testados (128).

A piridoxina possui uma interação com a levodopa, fármaco de primeira linha no tratamento da DP, uma vez que está envolvida no seu metabolismo, atuando como coenzima na conversão da L-DOPA em dopamina por ação das dopa-descarboxilases (128,129). Deste modo, a suplementação com piridoxina suscitou a hipótese de promover um aumento do metabolismo periférico da L-DOPA, o que conduziria a uma diminuição da biodisponibilidade de dopamina no cérebro. No entanto, após várias investigações verificou-se que uma suplementação máxima de 50 mg/dia de piridoxina não tem qualquer redução na eficácia da levodopa, sendo inclusivamente essencial para o seu metabolismo (128,129).

Posto isto, e tendo em consideração os diversos mecanismos de ação da piridoxina, estando esta envolvida em múltiplos processos enzimáticos e metabólicos, não podemos excluir a hipótese de esta poder conferir neuroproteção através de processos ainda não estudados.

5.3 Serina

A serina é um aminoácido não essencial que está envolvida na biossíntese de várias moléculas sendo considerada como precursora dos aminoácidos glicina e cisteína (130). Através da reação com tetrahidrofolato e por ação da enzima serina hidroximetiltransferase é convertida em glicina, esta que possui diversas funções metabólicas como a síntese de purinas, evidenciando a sua relevância na proliferação e diferenciação celular e que, através da ativação dos canais de cloreto e consequente redução dos níveis de cálcio celular necessários para a produção de citocinas, contribui para potenciais efeitos anti-inflamatórios (130,131). Para além disto, a glicina desempenha, ainda, um papel essencial na regulação dos níveis de SO, dado que ao ser combinada com a γ -glutamilcisteína pela ação da GS, contribui para a síntese do antioxidante GSH (131).

Por outro lado, a serina pode, ao ser condensada com a homocisteína pela ação da enzima cistationina beta-sintetase em conjunto com a vitamina B6, ser convertida em cisteína, o aminoácido limitante na síntese de GSH, podendo assim promover o aumento da sua produção endógena (126). Atualmente, a investigação sobre o potencial da suplementação e influência deste aminoácido na homeostasia da GSH é bastante limitada, restringindo-se ao uso de modelos animais com elevados níveis de SO (126). Um estudo realizado em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras e suplementados com serina revelou, em comparação com o grupo controlo, o aumento das concentrações hepáticas de GSH, do rácio GSH/GSSG e da expressão de diversas enzimas envolvidas na síntese e metabolismo da GSH, assim como uma redução significativa dos níveis de SO (132).

Posto isto, e tendo em consideração os estudos que têm vindo a ser realizados em modelos animais, a serina parece ter um efeito atenuante nos danos oxidativos provocados pela presença de ROS, possivelmente através da sua contribuição na manutenção dos níveis do antioxidante GSH, sendo necessários dados adicionais de forma a definir melhor os

diferentes mecanismos pela qual esta atua e para avaliar o seu potencial em diferentes patologias nas quais a suplementação antioxidante parece ter um papel central, tal como a DP.

5.4 Vitamina E

As vitaminas lipossolúveis, que possuem atividade antioxidante, também têm sido alvo de investigação, devido ao seu potencial envolvimento na homeostase da GSH (134). A vitamina E, presente maioritariamente nas plantas, diz respeito a um conjunto de moléculas que exibem atividade antioxidante sob a forma de alfa-tocoferol. Esta vitamina exerce diferentes funções, sendo que diversos estudos, sugerem que esta possa possuir um papel na eliminação de ROS, na inibição da peroxidação lipídica e atuar como antioxidante através de reações que envolvem antioxidantes como a GSH (133,134).

No processo de regeneração do alfa-tocoferol é produzido o radical L-ascorbato, que é posteriormente oxidado pela GSH, formando o produto GSSG que por ação da GR é novamente transformada em GSH (134). Alguns estudos sugerem que a suplementação com vitamina E poderá atuar na prevenção desta oxidação da GSH e deste modo aumentar os seus níveis e disponibilidade nos tecidos. Um estudo revelou que a suplementação de um grupo de ratos com vitamina E resultou no aumento dos níveis de GSH no córtex cerebral, sendo que não houve qualquer alteração no grupo controlo submetido a uma dieta normal (135).

A extensão do benefício da vitamina E na homeostasia da GSH tem vindo, também, a ser investigada em estudos clínicos. Em um estudo realizado em crianças diabéticas tipo 1 que apresentavam concentrações baixas de GSH nas hemácias, quando suplementadas com 100 unidades de vitamina E, verificou-se um aumento dos níveis de GSH, assim como uma diminuição do processo de peroxidação lipídica e dos valores de hemoglobina glicada. Para além disto, em voluntários saudáveis suplementados com esta vitamina também se verificou um aumento dos níveis de GSH nas hemácias (136).

Posto isto, e com base nos estudos pré-clínicos e clínicos realizados, a vitamina E, quando tomada em quantidades seguras, possui um potencial para aumentar as concentrações do antioxidante GSH tanto a nível sanguíneo como a nível cerebral.

6. Conclusão

Atualmente, a doença de Parkinson tem vindo a apresentar uma elevada prevalência entre as doenças neurodegenerativas e simultaneamente a sua incidência a nível mundial tem vindo a aumentar de forma acentuada, o que corrobora com o envelhecimento da população. Trata-se de uma patologia de etiologia multifatorial que engloba tanto uma componente genética, que representa cerca de 10% dos casos, como uma componente não genética/ambiental, na sua grande maioria de causa idiopática. Uma das hipóteses mais aceites referentes à fisiopatologia da doença corresponde à neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos e consequente diminuição dos níveis cerebrais de dopamina, o que compromete a função motora dos doentes dando origem, numa fase mais avançada, ao aparecimento de sintomas motores como a bradicinesia, instabilidade postural, rigidez e tremores de repouso, sintomas estes característicos da patologia.

O SO tem sido proposto como um dos mecanismos centrais que potenciam a patogénese de doenças neurodegenerativas como a DP. Este diz respeito a um fenómeno natural que resulta de um desequilíbrio entre a produção e acumulação excessiva de ROS/RNS nos tecidos e a capacidade de resposta dos sistemas antioxidantes. Como resultado deste desequilíbrio, ocorrem danos oxidativos que promovem a deterioração celular, sendo o cérebro o órgão mais suscetível a esta toxicidade. Para além disto, diversos fatores implícitos na progressão da neurodegeneração parecem estar interligados ao aumento do SO, podendo este ser causa ou consequência de diferentes processos que culminam no aumento da degeneração dopaminérgica, potenciando o desenvolvimento da doença de Parkinson. Exemplos destes fatores são: as disfunções mitocondriais, que atuam como fortes potenciadores do SO; a consequente excitotoxicidade provocada por estas disfunções que contribuem para a formação de novas ROS/RNS; a elevada oxidação da dopamina que contribui para o aumento dos danos oxidativos e a excessiva acumulação de metais como o Ferro que, ao se conjugar com espécies reativas, culmina em um ciclo redox, provocando a produção desregulada de mais ROS.

Em relação à terapêutica convencional disponível não existem, de forma geral, fármacos que retardem a progressão da doença, sendo que o tratamento oral de levodopa atua apenas na melhoria da locomoção, não tendo qualquer efeito na diminuição do curso da patologia. O uso prolongado desta, assim como a inevitável diminuição do seu efeito terapêutico que exige a utilização de doses mais elevadas do fármaco dá origem ao aumento da toxicidade associada ao seu uso assim como ao aumento dos seus efeitos adversos. Deste modo, é necessário a constante procura de novas abordagens terapêuticas seguras e eficazes tanto na melhoria da sintomatologia como na proteção ou prevenção da neurodegeneração que potencia o desenvolvimento da doença.

A glutathiona é considerada como o antioxidante endógeno presente em maior abundância no organismo humano, destacando-se o seu papel neuroprotetor através de mecanismos como o controlo do SO e conseqüente ação no equilíbrio redox, através da sua capacidade de conjugação com ROS/RNS convertendo-as em metabolitos não tóxicos. Esta está, ainda, envolvida em processos de diferenciação celular, expressão de genes e no metabolismo de compostos endógenos como os xenobióticos, não excluindo a hipótese de poder atuar como neuroprotetor através de diferentes mecanismos ainda não estudados. Posto isto, e tendo em conta a função exercida por este antioxidante no controlo e diminuição do SO que se verifica nesta doença, o seu potencial como alvo terapêutico tem vindo a ser evidenciado ao longo dos anos, tendo sido demonstrada a sua capacidade na melhoria da sintomatologia motora devido à sua ação na prevenção da oxidação da dopamina induzida pelo aumento do SO.

Em suma, de acordo com a evidência científica disponível e apesar de ser um assunto ainda controverso pelas diversas limitações implícitas ao longo dos estudos apresentados, a glutathiona, na sua generalidade, demonstrou não só um elevado potencial na abordagem terapêutica da doença assim como efeitos benéficos na melhoria da sintomatologia motora. No entanto, é transversal a todos os ensaios realizados, a necessidade de constante investigação científica nesta área, tendo em vista tanto a contínua busca pela diminuição da progressão da DP, como da melhoria da qualidade de vida de pessoas com esta patologia.

7. Referências Bibliográficas

1. Morizane A. Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells. *Inflamm Regen.* **2023**; 43(1):16.
2. Costa HN, Esteves AR, Empadinhas N, Cardoso SM. Parkinson's Disease: A Multisystem Disorder. *Neurosci Bull.* **2022**; 39(1):113–124.
3. Ahlskog JE. The new Parkinson's disease treatment book-partnering with your doctor to get the most from your medications. Oxford University Press; 2nd Ed, **2015**, Cap.2, pp 13-15.
4. Parkinson's Europe. What is Parkinson's? *in:* <http://www.parkinsonseurope.org>. Acedido em março 2023.
5. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **2017**; 16(11):877–897.
6. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* **1967**; 17(5):427-442.
7. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *AM J Med.* **2019**; 132(7):802–807.
8. Cabreira V, Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização. *Acta Med Port.* **2019**; 32(10):661–670.
9. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, *et al.* Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* **2016**; 53(6):4094-4125.
10. Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neurosci Biobehav Rev.* **2021**; 120:470-478.
11. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **2002**; 14(2):223–236.
12. Morris AD, Rose FC. James Parkinson: A Biographical Overview. James Parkinson His Life and Times. Springer Science & Business Media. **1989**;10–22.
13. Deaths associated with neurological conditions in England 2001 to 2014. Public Health England. **2018**.
14. Cuenca L, Gil-Martinez AL, Cano-Fernandez L, Sanchez-Rodrigo C, Estrada C, Fernandez-Villalba E, *et al.* Parkinson's disease: a short story of 200 years. *Histol Histopathol.* **2019**; 34(6):573–591.
15. McDonald C, Gordon G, Hand A, Walker RW, Fisher JM. 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson? *Age Ageing.* **2018**; 47(2):209–214.

16. Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, *et al.* Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. *Front Public Health.* **2021**; 9:776847.
17. Dorsey ER, Elbaz A, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A, Adsuar JC, *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2018**; 17(11):939–953.
18. Lampropoulos IC, Malli F, Sinani O, Gourgoulianis KI, Xiromerisiou G. Worldwide trends in mortality related to Parkinson's disease in the period of 1994–2019: Analysis of vital registration data from the WHO Mortality Database. *Front Neurol.* **2022**; 13:956440.
19. World Health Organisation. Parkinson disease. In: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>. Acedido em Abril de 2023.
20. SPN - Sociedade Portuguesa de Neurologia. Doença de Parkinson afeta entre 18 a 20 mil pessoas em Portugal. In: www.spneurologia.com. Acedido em Abril de 2023.
21. Delamarre A, Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Press Med.* **2017**; 46(2 Pt 1):175–181.
22. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* **2014**; 29(13):1583–1590.
23. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology.* **2016**; 46(4):292–300.
24. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med.* **2020**; 36(1):1–12.
25. Abeynayake I, Tanner CM. The economic impact of OFF periods in Parkinson disease. *Am J Manag Care.* **2020**; 26(12 Suppl):S265–S269.
26. Maresova P, Klimova B, Novotny M, Kuca K. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe—A Call for a Uniform European Strategy. *J Alzheimers Dis.* **2016**; 54(3):1123–1133.
27. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, *et al.* Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* **2011**; 21(10):718–779.
28. Yang W, Hamilton JL, Kopil C, Beck JC, Tanner CM, Albin RL, *et al.* Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. *npj Parkinsons Dis.* **2020**; 6:15.
29. Marras C, Lang A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2013**; 84(4):409–415.
30. Anwar A, Saleem S, Akhtar A, Ashraf S, Ahmed MF. Juvenile Parkinson Disease. *Cureus.* **2019**; 11(8):e5409.

31. Ye H, Robak LA, Yu M, Cykowski M, Shulman JM. Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. *Annu Rev Pathol.* **2023**; 18(1):95–121.
32. Zahoor I, Shafi A, Haq E. Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. In: Stroker TB, Greenland JC. Brisbane (AU): Codon Publications. **2018**, Cap 1, pp 3-26.
33. Dickson DW. Parkinson's Disease and Parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**; 2(8):a009258.
34. Jankovic J. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Up To Date.* **2019**; 72(4906).
35. Purves D. Neuroscience. Sinauer Associates Inc; 3rd Ed, **2004**, Cap. 17, pp 417-430.
36. Zhuang Y, Xu P, Mao C, Wang L, Krumm B, Zhou XE, *et al.* Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell.* **2021**; 184(4):931-942.e18.
37. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.* **2008**; 60(4):543–554.
38. García-Sanz P, M.F.G. Aerts J, Moratalla R. The Role of Cholesterol in α -Synuclein and Lewy Body Pathology in GBA1 Parkinson's Disease. *Mov Disord.* **2021**; 36(5):1070–1085.
39. Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* **2019**; 1867(10):890–908.
40. Drolet RE, Behrouz B, Lookingland KJ, Goudreau JL. Substrate-mediated enhancement of phosphorylated tyrosine hydroxylase in nigrostriatal dopamine neurons: evidence for a role of alpha-synuclein. *J Neurochem.* **2006**; 96(4):950–959.
41. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci.* **2002**; 22(8):3090–3099.
42. Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* **2016**; 137(3):331-359.
43. Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathol Commun.* **2020**; 8(1):189.
44. Henry AG, Aghamohammadzadeh S, Samaroo H, Chen Y, Mou K, Needle E, *et al.* Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression. *Hum Mol Genet.* **2015**; 24(21):6013–6028.
45. Kam TI, Hinkle JT, Dawson TM, Dawson VL. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* **2020**; 144:105028.

46. Tofaris GK. Initiation and progression of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* **2022**; 79(4):210.
47. Outeiro TF, Koss DJ, Erskine D, Walker L, Kurzawa-Akanbi M, Burn D, *et al.* Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol Neurodegener.* **2019**; 14(1):5.
48. Nakai K, Tsuruta D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *Int J Mol Sci.* **2021**; 22(19):10799.
49. Olufunmilayo EO, Gerke-Duncan MB, Holsinger RMD. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants (Basel).* **2023**; 12(2):517.
50. Raj K, Kaur P, Gupta GD, Singh S. Metals associated neurodegeneration in Parkinson's disease: Insight to physiological, pathological mechanisms and management. *Neurosci Lett.* **2021**; 753:135873.
51. Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* **2015**; 84:4-21.
52. Navarro-Yepes J, Zavala-Flores L, Anandhan A, Wang F, Skotak M, Chandra N, *et al.* Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol Ther.* **2014**; 142(2): 206–230.
53. Andrés Juan C, Manuel Pérez de la Lastra J, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci.* **2021**; 22(9):4642.
54. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* **2020**; 37:101674.
55. Snezhkina A V, Kudryavtseva A V, Kardymon OL, Savvateeva M V, Melnikova N V, Krasnov GS, *et al.* ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev.* **2019**; 2019:6175804.
56. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm.* **2023**; 121:109–141.
57. Chang KH, Chen CM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel).* **2020**; 9(7):597.
58. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* **2018**; 21(10):1359-1369.
59. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* **2020**; 9(1):42.

60. Murali Mahadevan H, Hashemiaghdam A, Ashrafi G, Harbauer AB. Mitochondria in Neuronal Health: From Energy Metabolism to Parkinson's Disease. *Adv Biol (Weinh)*. **2021**; 5(9):e2100663.
61. Franco-Iborra S, Vila M, Perier C. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. *Front Neurosci*. **2018**; 12:342.
62. Langston JW. The MPTP story. *J Parkinsons Dis*. **2017**; 7(s1):S11-S19.
63. Rani L, Mondal AC. Emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. *Mitochondrion*. **2020**; 50:25-34.
64. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. **2019**; 24(8):1583.
65. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*. **2015**; 85(2):257-273.
66. Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathol Commun*. **2020**; 8(1):189.
67. Angelova PR, Vinogradova D, Neganova ME, Serkova TP, Sokolov V V., Bachurin SO, *et al*. Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Mol Neurobiol*. **2019**; 56(3):2244–2255.
68. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener*. **2022**; 11(1):3.
69. Latif S, Jahangeer M, Maknoon Razia D, Ashiq M, Ghaffar A, Akram M, *et al*. Dopamine in Parkinson's disease. *Clin Chim Acta*. **2021**; 522:114-126.
70. Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegener*. **2019**; 14(1):35.
71. Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G, *et al*. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res*. **2004**; 17(6):610-617.
72. Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J Neurochem*. **2016**; 139 Suppl 1:179-197.
73. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2019**; 1866(12):118535.
74. Karimi-Moghadam A, Charsouei S, Bell B, Jabalameli MR. Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell Mol Neurobiol*. **2018**; 38(6):1153-1178.

75. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **2020**; 19(2):170-178.
76. Day JO, Mullin S. The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes (Basel).* **2021**; 12(7):1006.
77. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid L.P, *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet.* **2006**; 38(10):1184-1191.
78. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JP. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord.* **2016**; 23:1-9.
79. Nicholatos JW, Francisco AB, Bender CA, Yeh T, Lugay FJ, Salazar JE, *et al.* Nicotine promotes neuron survival and partially protects from Parkinson's disease by suppressing SIRT6. *Acta Neuropathol Commun.* **2018**; 6(1):120.
80. Feng YS, Yang SD, Tan ZX, Wang MM, Xing Y, Dong F, *et al.* The benefits and mechanisms of exercise training for Parkinson's disease. *Life Sci.* **2020**; 245:117345.
81. Zhao X, Zhang M, Li C, Jiang X, Su Y, Zhang Y. Benefits of Vitamins in the Treatment of Parkinson's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* **2019**; 2019:9426867.
82. Váradi C. Clinical features of parkinson's disease: The evolution of critical symptoms. *Biology (Basel).* **2020**; 9(5):103.
83. Bologna M, Paparella G, Fasano A, Hallet M, Berardelli A. Evolving concepts on bradykinesia. *Brain.* **2020**; 143(3):727-750.
84. Dirx MF, Bologna M. The pathophysiology of Parkinson's disease tremor. *J Neurol Sci.* **2022**; 435:120196.
85. Palakurthi B, Burugupally SP. Postural Instability in Parkinson's Disease: A Review. *Brain Sci.* **2019**; 9(9):239.
86. Gros P, Videnovic A. Overview of Sleep and Circadian Rhythm Disorders in Parkinson Disease. *Clin Geriatr Med.* **2020**; 36(1):119–130.
87. Bang Y, Lim J, Choi HJ. Recent advances in the pathology of prodromal non-motor symptoms olfactory deficit and depression in Parkinson's disease: clues to early diagnosis and effective treatment. *Arch Pharm Res.* **2021**; 44(6):588–604.
88. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* **2015**; 30(12):1591-1601.

89. Abe T, Isobe C, Murata T, Sato C, Tohgi H. Alteration of 8-hydroxyguanosine concentrations in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. **2003**; 336(2):105-108.
90. Zahoor I, Shafi A, Haq E. Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. In: Stroker TB, Greenland JC. Brisbane (AU): Codon Publications. **2018**, Cap 7, pp 129–144.
91. Katzung BG. Basic and clinical Pharmacology. McGraw-Hill Education; 12th Ed, **2012**, Cap.28, pp 484–492.
92. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurosurg Psychiatry*. **2020**; 91(8):795–808.
93. Woitalla D, Buhmann C, Hilker-Rogendorf R, Höglinger G, Koschel J, Müller T, *et al*. Role of dopamine agonists in Parkinson's disease therapy. *J Neural Transm (Vienna)*. **2023**; 130(6):863–873.
94. Rajan R, Saini A, Verma B, Choudhary N, Gupta A, Vishnu VY, *et al*. Anticholinergics May Carry Significant Cognitive and Gait Burden in Parkinson's Disease. *Mov Disord Clin Pract*. **2020**; 7(7):803–809.
95. Jost WH. A critical appraisal of MAO-B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. **2022**; 129(5-6):723-736.
96. European Medicines Agency (EMA). Anexo I – Resumo das Características do Medicamento - Rasagilina ratiopharm. **2022**. In:https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rasagiline-ratiopharm-epar-product-information_pt.pdf
97. Fabbri M, Ferreira JJ, Rascol O. COMT Inhibitors in the Management of Parkinson's Disease. *CNS Drugs*. **2022**; 36(3):261–282.
98. Müller T, Schlegel E, Zingler S, Thiede HM. Effects of One-Day Application of Levodopa/Carbidopa/Entacapone versus Levodopa/Carbidopa/Opicapone in Parkinson's Disease Patients. *Cells*. **2022**; 11(9):1511.
99. Marmol S, Feldman M, Singer C, Margolesky J. Amantadine Revisited: A Contender for Initial Treatment in Parkinson's Disease? *CNS Drugs*. **2021**; 35(11):1141–1152.
100. Aoyama K. Glutathione in the brain. *Int J Mol Sci*. **2021**; 22(9):5010.
101. Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*. **2022**; 27(1):324.
102. Vašková J, Kočan L, Vaško L, Perjési P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. **2023**; 28(3):1447.
103. Asanuma M, Miyazaki I. Glutathione and related molecules in parkinsonismo. *Int J Mol Sci*. **2021**; 22(16):8689.

104. Dwivedi D, Megha K, Mishra R, Mandal PK. Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochem Res.* **2020**; 45(7):1461-1480.
105. Panday S, Talreja R, Kavdia M. The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* **2020**; 131:104010.
106. Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neurosci Biobehav Rev.* **2021**; 120:470-478.
107. Wang HL, Zhang J, Li YP, Dong L, Chen YZ. Potential use of glutathione as a treatment for Parkinson's disease. *Exp Ther Med.* **2020**; 21(2):125.
108. Sechi G, Deledda MG, Bua G, Satta WM, Deiana GA, Pes GM, *et al.* Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **1996**; 20(7):1159-1170.
109. Percário S, Da Silva Barbosa A, Varela ELP, Gomes ARQ, Ferreira MES, De Nazaré Araújo Moreira T, *et al.* Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxid Med Cell Longev.* **2020**; 2020:2360872.
110. Hauser RA, Lyons KE, McClain T, Carter S, Perlmutter D. Randomized, double-blind, pilot evaluation of intravenous glutathione in Parkinson's disease. *Mov Disord.* **2009**; 24(7):979-983.
111. Otto M, Magerus T, Langland J. The Use of Intravenous Glutathione for Symptom Management of Parkinson's Disease: A Case Report. *Altern Ther Health Med.* **2018**; 24(4):56-60.
112. Pinnen F, Cacciatore I, Cornacchia C, Mollica A, Sozio P, Cerasa LS, *et al.* CNS delivery of L-dopa by a new hybrid glutathione-methionine peptidomimetic prodrug. *Amino Acids.* **2012**; 42(1):261-269.
113. Mischley LK, Lau RC, Shankland EG, Wilbur TK, Padowski JM. Phase IIb study of intranasal glutathione in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* **2017**; 7(2):289-299.
114. Raghu G, Berk M, Campochiaro PA, Jaeschke H, Marenzi G, Richeldi L, *et al.* The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Curr Neuropharmacol.* **2021**; 19(8):1202-1224.
115. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. *Molecules.* **2018**; 23(12):3305.
116. Martínez-Banaclocha MA. N-acetyl-cysteine in the treatment of Parkinson's disease. What are we waiting for? *Med Hypotheses.* **2012**; 79(1):8-12.
117. Martínez-Banaclocha M. N-Acetyl-Cysteine: Modulating the Cysteine Redox Proteome in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel).* **2022**; 11(2):416.
118. Clark J, Clore EL, Zheng K, Adame A, Masliah E, Simon DK. Oral N-Acetyl-cysteine attenuates

- loss of dopaminergic terminals in α -synuclein overexpressing mice. *PLoS One*. **2010**; 5(8):e12333.
119. Martinez Banaclocha M. N-Acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease. *Brain Res*. **2000**; 859(1):173-175.
120. Chen C, Yin M, Hsu C, Liu T. Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. *Nutrition*. **2007**; 23(7-8):589–597.
121. Coles LD, Tuite PJ, Öz G, Mishra UR, Kartha R V., Sullivan KM, *et al*. Repeated-Dose Oral N-Acetylcysteine in Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Effect on Brain Glutathione and Oxidative Stress. *J Clin Pharmacol*. **2018**; 58(2):158–167.
122. Frye RE, Andrus JP, Lemley KV, De Rosa SC, Ghezzi P, Holmgren A, *et al*. Pharmacology, Formulations, and Adverse Effects. The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine. **2018**; 387–394.
123. Dalto DB, Matte JJ. Pyridoxine (Vitamin B6) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation. *Nutrients*. **2017**; 9(3):189.
124. Ramos RJ, Albersen M, Vringer E, Bosma M, Zwakenberg S, Zwartkruis F, *et al*. Discovery of pyridoxal reductase activity as part of human vitamin B6 metabolism. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. **2019**; 1863(6):1088–1097.
125. Calderón-Ospina CA, Nava-Mesa MO. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neurosci Ther*. **2019**; 26(1):5-13.
126. Gould RL, Pazdro R. Impact of supplementary amino acids, micronutrients, and overall diet on glutathione homeostasis. *Nutrients*. **2019**; 11(5):1056.
127. Shen L. Associations between B vitamins and Parkinson's disease. *Nutrients*. **2015**; 7(9):7197–7208.
128. Wei Y, Lu M, Mei M, Wang H, Han Z, Chen M, *et al*. Pyridoxine induces glutathione synthesis via PKM2-mediated Nrf2 transactivation and confers neuroprotection. *Nat Commun*. **2020**; 11(1):941.
129. Sato Y, Yasumiishi C, Chiba T, Umegaki K. A Systematic Review to Identify Unacceptable Intake Levels of Vitamin B6 among Patients Taking Levodopa. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **2017**; 58(6):268–274.
130. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol*. **2016**; 214(3):249-257.
131. Coleman DN, Lopreiato V, Alharthi A, Loor JJ. Amino acids and the regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. *J Anim Sci*. **2020**; 98(Suppl 1):S175-S193.
132. Zhou X, He L, Zuo S, Zhang Y, Wan D, Long C, *et al*. Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione

synthesis-related genes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **2018**; 1864(2):488–498.

133. Gould RL, Pazdro R. Impact of supplementary amino acids, micronutrients, and overall diet on glutathione homeostasis. *Nutrients.* **2019**; 11(5):1056.
134. Blaner WS, Shmarakov IO, Traber MG. Vitamin A and Vitamin E: Will the Real Antioxidant Please Stand Up? *Annu Rev Nutr.* **2021**; 41(1):105-131.
135. Marcus, S.R., Chandrakala M.V., Nadiger, H.A. Interaction between vitamin E and glutathione in rat brain—effect of acute alcohol administration. *J Nutr Biochem.* **1993**; 4(6): 336–340.
136. Jain, S.K., McVie, R., Smith, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care.* **2000**; 23(9):1389-1394.