

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**PROTEÍNA α -SINUCLÉINA COMO ALVO TERAPÊUTICO
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Miguel António Brazão Caldeira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos
Santos Cristiano

2020

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**PROTEÍNA α -SINUCLÉINA COMO ALVO TERAPÊUTICO
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Miguel António Brazão Caldeira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos
Santos Cristiano

2020

Proteína α -Sinucleína como Alvo Terapêutico no Tratamento da Doença de Parkinson

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 9 de outubro de 2020

© 2020 Miguel António Brazão Caldeira

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 a toda a minha família que se esforçou por me dar a melhor educação possível e por me poderem fornecer a possibilidade de estudar e tirar um curso superior. Em particular aos meus avós que muitos conselhos sábios me deram e que me fizeram estar aqui, aos meus pais que desde criança deram tudo para que eu tivesse a melhor educação possível e ao meu irmão que sempre me ajudou a abrir as portas para o meu futuro. Um especial agradecimento a todas as pessoas que fizeram parte do meu percurso até hoje, sem necessidade de enunciar porque eles sabem quem são. É um privilégio ter essas pessoas a minha volta, que sempre me apoiaram e apoiam. Gradualmente todas as etapas foram conquistadas ao longo do meu percurso, não só graças a mim, mas a todas as pessoas que me ensinaram, e a todos os colegas que me ajudaram. Grande parte dos desafios foram superados através da partilha, da amizade e apoio. Um especial agradecimento à Ângela, que foi um pilar muito importante para mim durante praticamente todo o percurso do ensino superior, apoiando-me em todas as dificuldades, ajudando-me a ser o melhor que posso ser. Quero também agradecer à minha orientadora, professora Doutora Lurdes Cristiano, uma líder exemplar, que sempre dá as suas aulas de forma motivadora, espontânea e alegre, que sempre transmite a importância do conhecimento para que futuramente o usemos para darmos um contributo significativo para uma sociedade melhor.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) apresenta uma elevada prevalência entre as doenças neurodegenerativas, acarretando um impacto clínico muito significativo nos pacientes, familiares e cuidadores, especialmente através dos seus efeitos degenerativos progressivos na mobilidade do doente. As evidências científicas apontam para a centralidade da alfa sinucleína, uma proteína intrinsecamente desordenada no citosol que é tida como fundamental no desenvolvimento da doença. A etiologia da DP é variada e, consoante o fator desencadeante da patologia, podem ocorrer várias alterações nas vias fisiológicas e na alfa-sinucleína monomérica. Alterações na proteína podem levar a danos nas vias celulares, bem como danos nestas vias podem provocar alterações na proteína. Em última instância ocorre morte neuronal, e em neurónios resilientes são encontrados corpos de Lewy compostos maioritariamente por alfa-sinucleína. Estes corpos são formados porque numa fase inicial ocorrem alterações na homeostase celular que induzem perturbações nos equilíbrios entre as diferentes formas de alfa sinucleína, originando a formação de oligómeros e fibrilas tóxicas. Além dos danos que causam sobre as vias celulares, estas espécies têm a capacidade de se disseminarem de forma semelhante a um prião, interferindo com a homeostase de células vizinhas.

As terapias atualmente utilizadas em quadros clínicos de DP apenas controlam sintomas e não inibem a progressão da doença, pelo que o estudo de novas estratégias e fármacos que impeçam essa progressão são de extrema relevância. A presente dissertação centra-se na análise das formas tóxicas da alfa-sinucleína e dos seus mecanismos de toxicidade, abordando estudos conducentes a novas estratégias que atuem sobre esta proteína. De entre as estratégias descritas na literatura, as mais promissoras envolvem a diminuição da produção da alfa-sinucleína, a inibição da sua agregação, a potenciação da autofagia, a redução de formas extracelulares tóxicas bem como inibição da captação das mesmas por células vizinhas.

Palavras-chave: alfa-sinucleína, oligómeros alfa-sinucleína, fibrilas alfa-sinucleína e estratégias baseadas em alfa-sinucleína.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) presents a high prevalence among the neurodegenerative diseases, resulting on a significant clinical impact on patients, their family and care takers, especially through its progressive degenerative effects on patient's mobility. Scientific evidence points to the centrality of alpha-synuclein, an intrinsically disordered protein in the cytosol known to be crucial for the development of the disease.

The etiology of the PD varies, largely depending on the triggering factor of the pathology. Several changes to the physiological pathways and in the monomeric alpha-synuclein may occur. Changes to the protein can lead to damage on the cellular pathways as well as damages in the physiological pathways may alter the protein. At last, neuronal death occurs and Lewy bodies composed mainly of alpha-synuclein are found in resilient neurons. These bodies are formed because in an initial phase changes in cell homeostasis occur, causing disturbances in the balance between the different forms of alpha synuclein which lead to formation of toxic oligomers and fibrils. Aside from the damages caused on cellular pathways, these species have de capacity to spread like a prion, interfering with the homeostasis of neighboring cells. The therapies currently available for PD only control symptoms, not slowing the progression of the disease. The study of new strategies that prevent this progression are thus extremely important.

This dissertation focuses on the analysis of toxic forms of alpha-synuclein and their mechanisms of toxicity, together with recent studies described in the literature aiming at the development of new strategies targeting this protein. The most promising approaches are related to reducing alpha-synuclein production, inhibiting its aggregation, potentiating autophagy, reducing toxic extracellular forms as well as inhibiting their uptake by neighboring cells.

Keywords: *“alpha synuclein”, “alpha synuclein oligomers”, “alpha synuclein fibrils”, “alpha synuclein-based strategies” e “alpha synuclein novels”.*

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE REMISSIVO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença de Parkinson.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Terapêuticas.....	3
1.4. Fisiopatologia da doença de Parkinson	4
1.4.1. Circuito dos Gânglios da Base ou Sistema Extrapiramidal	4
1.5. Processos celulares associados à DP	6
1.6. Tratamento Farmacológico da DP	12
1.6.1. Anticolinérgicos	12
1.6.2. Dopaminérgicos.....	13
1.7. Fatores de Risco	20
2. A PROTEÍNA ALFA SINUCLEÍNA	27
2.1. Âmbito do trabalho.....	27
2.2. A proteína α S	27
2.3. Alterações na proteína α S.....	31
2.3.1. Alterações genéticas.....	31
2.3.2. Modificações pós traducionais.....	32
2.4. Formas patogénicas da proteína α S	33
2.5. Mecanismos de toxicidade da α S	37
3. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS COM FOCO NA PROTEÍNA α S	40
3.1. Redução da produção de α S	40
3.2. Inibição da agregação	42
3.3. Potenciação da autofagia.....	45
3.4. Redução da disponibilidade de agregados extracelulares de α S	47
3.5. Captação celular de α S.....	49
4. CONCLUSÕES.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1 – Representação do circuito dos gânglios da base ou sistema extrapiramidal.</i>	6
<i>Figura 1.2 – Representação da estrutura química do biperideno e do tri-hexifenidilo, antagonistas dos recetores muscarínicos utilizados clinicamente em DP.</i>	12
<i>Figura 1.3 – Representação das estruturas químicas da levodopa, um precursor da dopamina, e representação das estruturas da carbidopa e da benserazida, inibidores da IAADC.</i>	13
<i>Figura 1.4 - Representação das estruturas químicas de agonistas dos recetores de dopamina. Estes dividem-se em dois subtipos, os agonistas derivados da ergotamina, que incluem a bromocriptina, o mesilato de di-hidroergocriptina e a cabergolina, e os agonistas não ergonómicos, que incluem o piribedil, a apomorfina, o pramipexol, o ropinirol e a rotigotina.</i>	15
<i>Figura 1.5 – Representação das estruturas químicas da selegilina, rasagilina e safinamida, inibidores seletivos da MAO-B.</i>	16
<i>Figura 1.6 - Representação das estruturas químicas da entacapona, tolcapona e opicapona, inibidores da COMT.</i>	18
<i>Figura 1.7 - Representação da estrutura química da amantadina.</i>	20
<i>Figura 2.1 – A) Localização cromossómica do gene SNCA. B) Representação do gene SNCA. C) mRNA da proteína αS. D) Esquemas de representação das regiões da proteína αS e suas mutações. Adaptado de (6)</i>	28
<i>Figura 2.2 - (A) Representação das cargas negativas e positivas da αS; das 7 regiões KTKEGV; dos resíduos aa hidrofóbicos na zona NAC. (B) Representação da αS ligada à membrana e em estado citosólico. Adaptado de (100).</i>	30
<i>Figura 2.3 – Representação da cinética de agregação de α-sinucleína, caracterizada como uma reação de polimerização dependente de nucleação. Adaptado de (100).</i>	35
<i>Figura 2.4 – Mecanismos de toxicidade da αSO e fibrilar.</i>	37
<i>Figura 3.1 - Estratégias terapêuticas para o tratamento da DP com foco na proteína αS.</i>	40
<i>Figura 3.2 – Representação da estrutura química do NPT200-11, uma pequena molécula com possíveis propriedades inibidoras da agregação de αS. https://www.medkoo.com/products/33420</i>	43

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Os vários genes relacionados com risco acrescido de desenvolver DP, com associação a diferentes tipos de mecanismo fisiopatológico, hereditariedade e fase etária comum de incidência.</i>	25
<i>Tabela 2 - Modificações pós traducionais da αS</i>	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

α S – Alfa-sinucleína

α SO – Alfa-sinucleína Oligomérica

β S – Beta-sinucleína

γ S – Gama-sinucleína

A β – Beta-amiloide

AA- β 2 – Agonistas adrenérgicos β 2

AADC – L-aminoácido aromático descarboxilase

Ach – Acetilcolina

ADRB2 – Recetor β 2 adrenérgico

AINE's – Anti-inflamatórios não esteroides

AMC – Autofagia mediada por chaperões

BHE – Barreira hematoencefálica

c-Abl – Tirosina-proteína quinase ABL1

CHCHD2 – Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domaincontaining 2

CK – Caseína quinase

CL – Corpos de Lewy

CT – Cauda ácida C-terminal

COMT – Catecol-o-metil-transferase

COX4I2 – Isoforma da subunidade 4 do complexo mitocondrial

D1, D2, D3, D4 e D5 - Receptores dopaminérgicos

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

DJ-1 – Proteína *deglycase* DJ-1

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

ERO – Espécies reativas de oxigénio

ERN – Espécies reativas de nitrogénio

FRET – Transferência de energia por ressonância de Förster

FV – Fragmento variável (*Variable fragment*)

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GAIM – Motivo de interação amiloide geral (*General amyloid interaction motif*)

Glu – Glutamato

GPe – Globus pallidus externo

GPI – Globus pallidus interno

GRK – G protein-coupled receptor kinases

GUV – Vesículas unilamelares gigantes (*Giant unilamellar vesicles*)

IAADC – Inibidores da L-aminoácido aromático descarboxilase

ICOMT – Inibidores da catecol-o-metil-transferase

IDP – Proteína intrinsecamente desordenada

IgG – Imunoglobulina G

IMAO-B – Inibidores da monoaminoxidase tipo B

IMC – Índice de Massa Corporal

KLK6 – Neurosina

LAG3 – Recetor do gene 3 de ativação de linfócitos

LAMP-2A - Proteína de membrana 2A associada a lisossomas do tipo 2A

LAT – Transportador de L-aminoácido

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LRRK2 – *Leucine-rich repeat kinase 2*

LUV – Vesículas unilamelares grandes (*Large unilamellar vesicles*)

MAM – Membranas associadas às mitocôndrias

MAO-A – Monoaminoxidase tipo A

MAO-B – Monoaminoxidase tipo B

MAP-1 – Proteína 1 associada a microtúbulos (*Microtubule-associated protein 1*)

MAP-2 – Proteína 2 associada a microtúbulos (*Microtubule-associated protein 2*)

miRNA – *micro RNA*

MMP1, 2, 9, e 14 – Metaloproteases de matriz

MPP+ – 1-metil-4-fenilpiridinium

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MPT – Modificações pós traducionais

mRNA – mensageiros RNA

mTOR – Alvo de rapamicina em mamíferos (*Mammalian target of rapamycin*)

NAC – Domínio central de ligação amiloide

NL – Neutrites de Lewy

OMG – Organização Mundial de Saúde

PGC1a – *Peroxisome proliferator-activated recetor gamma coactivator 1-a*

PINK1 – Putativa quinase 1 induzida por PTEN

PLK – Polo-like Kinase

PrP – Proteína do Prião

PSH – Proteoglicanos de sulfato de heparano

RE – Retículo endoplasmático

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ribonucleic Acid

RNAi – RNA de interferência

SAL – Sistema de autofagia lisossomal

Sc-FV – Fragmento variável de cadeia única (*Single-chain variable fragment*)

shRNA – *short hairpin RNA*

siRNA – pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*)

SN – Substância nigra

SNC – Substantia nigra pars compacta

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNr – Substantia nigra pars reticulada

STN – Núcleo subtalâmico

SUP – Sistema ubiquitina-proteossoma

SUV – Vesículas unilamelares pequenas (*Small unilamellar vesicles*)

TH – Tálamo

TLR2 – *Receptor Toll-like 2*

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TPM – Transportador de piruvato mitocondrial

VPS35 – *vacuolar protein sorting-associated protein 35*

WT – Tipo Selvagem (*Wild Type*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa progressiva crónica essencialmente associada à desordem do movimento, considerando-se atualmente que as manifestações desta patologia extravasam as alterações motoras. Ao nível motor, as principais características da DP são o tremor, a bradicinesia, a rigidez e a instabilidade postural, embora esta seja menos relevante para o diagnóstico por surgir em estágios mais tardios da doença. A sintomatologia não motora inclui alterações cognitivas e do humor, depressão, distúrbios do sono e constipação intestinal. Devido à dificuldade na deteção de sinais na fase inicial da DP, a obtenção de um diagnóstico precoce depende da capacidade do profissional de saúde para reconhecer os sinais característicos e sintomas associados à patologia.

A DP foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, há mais de 200 anos, na monografia *“An Essay on the Shaking Palsy”*. Posteriormente, Jean-Martin Charcot juntou um contributo bastante importante ao separar a DP de outros distúrbios caracterizados por tremor, como por exemplo a esclerose múltipla. Em 1913 Fritz Lewy identificou pela primeira vez corpos de inclusão eosinófilos em neurónios de certos núcleos cerebrais. Mais tarde, os investigadores que se dedicaram ao estudo desta doença degenerativa passaram a designar essas estruturas presentes na DP por corpos de Lewy.

Fisiologicamente, o aparecimento dos sintomas motores associados à DP é atribuído à perda de neurónios dopaminérgicos do estriado, sendo a dopamina (DA) o neurotransmissor cerebral associado ao controlo do movimento. A perda neuronal em áreas não dopaminérgicas conduz ao aparecimento de outros sintomas relacionados com a DP. A etiologia da doença de Parkinson não é totalmente conhecida, embora seja sugerido que possa ter origem na combinação de fatores ambientais e genéticos. Independentemente da origem, a nível celular a DP está associada ao desenvolvimento de agregados proteicos em várias partes do cérebro, conhecidos como corpos de Lewy (CL) e neutrites de Lewy (NL). A α -sinucleína (α S) é uma proteína maioritariamente

sináptica que está presente em grandes quantidades no cérebro, sendo o composto principal destes agregados. Alguns estudos conduziram a resultados que apontam para um efeito prejudicial da α S na DP, posicionando a α S como um alvo terapêutico preferencial em estudos conducentes ao desenvolvimento de terapêuticas que impeçam a progressão desta patologia. (1–14)

1.2. Epidemiologia

A DP apresenta uma elevada prevalência entre as doenças neurodegenerativas, acarretando um impacto clínico muito significativo nos pacientes, familiares e cuidadores, especialmente através dos seus efeitos degenerativos progressivos na mobilidade do doente. Deste modo, o estudo de novas terapias que impeçam a progressão da DP são de extrema importância.

A DP é uma patologia que afeta 1% da população mundial com idade superior a 60 anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima mais de 6,1 milhões de indivíduos afetadas por esta patologia no mundo, correspondendo a cerca de 1 em cada 1000 pessoas. Na Europa, as estimativas apontam para 1,2 milhões de pessoas afetadas, das quais cerca de 18 mil em Portugal. Mundialmente, a incidência da doença é ligeiramente maior nos homens (3,2 milhões) do que nas mulheres (2,9 milhões). Os sintomas da DP surgem frequentemente depois dos 55 anos, sendo pouco frequente o diagnóstico de DP em indivíduos com idades inferiores. A incidência da DP em indivíduos com idade inferior a 40 anos corresponde a cerca de 5% dos casos. Sendo que o impacto desta doença aumenta com a idade, e a população mundial está cada vez mais envelhecida, as previsões da OMS apontam para um aumento considerável no número de afetados, principalmente nos países mais desenvolvidos. As estimativas apontam para uma duplicação do número de afetados com DP até 2040, podendo atingir 12,9 milhões de pessoas. Relativamente ao impacto económico da DP, os gastos anuais na Europa ascendem a 13,9 € biliões de euros, e nos Estados Unidos da América US\$ 14,4 biliões de dólares, correspondendo às previsões de aumento da incidência da doença um elevado incremento no seu impacto económico. Deste modo, pelos seus efeitos ao nível pessoal e familiar, como ao nível económico, a DP surge como uma doença crónica de intervenção prioritária, apresentando um impacto clínico significativo nos pacientes,

devido às consequências da perda neuronal, e afetando as vidas dos familiares e cuidadores. De modo a combater esta patologia, cujo desenvolvimento impede os doentes e as famílias de viverem as suas vidas de forma normal e desejada, a investigação dos mecanismos de ação e descoberta de novos fármacos que alterem a progressão da doença é de extrema importância. (15–22)

1.3. Terapêuticas

Os tratamentos farmacológicos da DP foram inicialmente baseados em observações empíricas, recorrendo sobretudo aos fármacos anticolinérgicos usados na época. A descoberta científica de que a DP está associada a insuficiências dopaminérgicas e o desenvolvimento da produção sintética da dopamina conduziram aos primeiros testes em humanos utilizando levodopa e, em 1961, ocorreu a primeira administração de levodopa em pacientes com DP, por via intravenosa. Posteriormente surgiram novas moléculas relevantes para o tratamento da DP: em 1969 surgiu a amantadina, em 1970 a apomorfina, um agonista dopaminérgico; em 1988 foi introduzida a combinação de carbidopa com levodopa; em 1989 surgiu a selegilina, um inibidor da monoaminoxidase do tipo B (MAOB); em 1993 surgiu a tolcapona, um inibidor da enzima catecol-o-metil-transferase (COMT). Em 1983 foi publicado um estudo que incidiu num grupo de jovens consumidores de estupefacientes que desenvolveram parkinsonismo devido à exposição a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), uma molécula associada à síntese de drogas ilícitas. Esta observação foi muito relevante do ponto de vista etiológico, pois comprovou que a DP pode ser induzida por toxinas ambientais. Em 1997 foi observada a primeira mutação associada a DP no gene SNCA que origina a α S e em 1998 foi estabelecido que esta proteína representa o principal componente dos CL e NL. Em 2003 observaram-se multiplicações do gene SNCA como causa de DP. Nos últimos anos foram identificadas várias mutações em outros genes causadores desta doença. Mais recentemente, em 2008, foi proposto que a α S malconformada pode ser transmitida célula a célula, como um prião. À luz destes novos conhecimentos iniciaram-se várias investigações com o objetivo de desenvolver terapias moleculares e biológicas que impeçam a progressão da DP, tendo como alvo terapêutico a α S. Alguns destes projetos atingiram as fases de investigação clínica. (1,2,5,23–35)

1.4. Fisiopatologia da doença de Parkinson

Através de modelos simples de funcionamento dos gânglios basais e das suas alterações na DP foi possível obter informação importante para compreender a ligação das disfunções fisiológicas com os sintomas motores que surgem nesta patologia. No entanto, sabe-se que a fisiopatologia na DP extravasa estes modelos simples. As alterações associadas à DP que ocorrem a nível celular são muito complexas e surgem frequentemente novas propostas de mecanismos celulares desencadeadores da doença, sendo necessárias constantes revisões dos mesmos. Seguidamente são apresentados os mecanismos mais estudados.

1.4.1. Circuito dos Gânglios da Base ou Sistema Extrapiramidal

A característica principal associada ao desenvolvimento da DP é a morte dos neurónios dopaminérgicos da substância negra, parte compacta (SNc), o que leva a uma depleção de DA na via nigroestriatal. Esta via envolve os neurónios dopaminérgicos originados na SNc com fim no corpo estriado, onde se encontram os recetores de DA, nos quais este neurotransmissor exerce o seu efeito na transmissão de sinais. Existem cinco categorias de recetores dopaminérgicos descritos, os recetores D1 a D5, sendo que os mais importantes na DP são os D1 e D2, que se encontram presentes, com elevada concentração, no corpo estriado. Ao circuito global, no qual está integrada a via nigroestriatal, dá-se o nome de circuito dos gânglios da base, ou sistema extrapiramidal, representado na **Figura 1**. Este circuito envolve a substância negra (SN) dividida em parte compacta (SNc) e parte reticulada (SNr), o estriado, o globo pálido interno (GPi) e externo (GPe), o núcleo subtalâmico (STN) e a sua ligação ao tálamo (TH), com uma posterior ligação ao córtex motor, sistema cerebral e medula espinhal. As modificações neste circuito permitem explicar de forma simples as alterações básicas que levam ao surgimento de alguns sintomas da DP, como a lentificação dos movimentos. Este circuito envolve vários neurotransmissores, nomeadamente a DA, presente na via nigroestriatal, tendo esta uma função como neurotransmissor inibitório na via indireta e excitatório na via direta. Fora do sistema nigroestriatal surgem dois neurotransmissores também relevantes, o ácido gama-aminobutírico (GABA) com função de resposta inibitória e o glutamato (Glu) com função de resposta excitatória. (36–39)

Recorrendo à **Figura 1.1**, vemos que na DP a via indireta, mediada por D2, se encontra hiperativada, enquanto que a via direta, mediada por D1, se encontra subativada. Estas alterações resultam da redução dos neurónios produtores de dopamina na DP, com a consequente redução de dopamina na via nigroestriatal e a sua libertação no estriado. Relativamente a via indireta, a redução da dopamina leva a um menor efeito inibitório sobre o recetor D2 do estriado, o que causa uma maior libertação de GABA sobre GPe, que posteriormente conduz a uma redução na libertação de GABA sobre GPi/SNr, que fica hiperativado, conduzindo à libertação de uma maior quantidade de GABA sobre o tálamo que, sendo inibido, exerce uma resposta excitatória menor sobre o córtex motor, levando ao aparecimento dos sintomas motores característicos da doença, como a bradicinesia. Relativamente à via direta, ocorre uma menor excitação do recetor D1 mediada pela dopamina, o que conduz a uma menor libertação de GABA inibitório sobre GPi e SNr e, conseqüentemente, a uma maior libertação de GABA sobre o tálamo, resultando igualmente num menor efeito excitatório sobre o córtex motor. Assim, a morte dos neurónios dopaminérgicos conduz a uma maior inibição do tálamo em ambas as vias, o que compromete a resposta excitatória promotora do movimento.

(39,40)

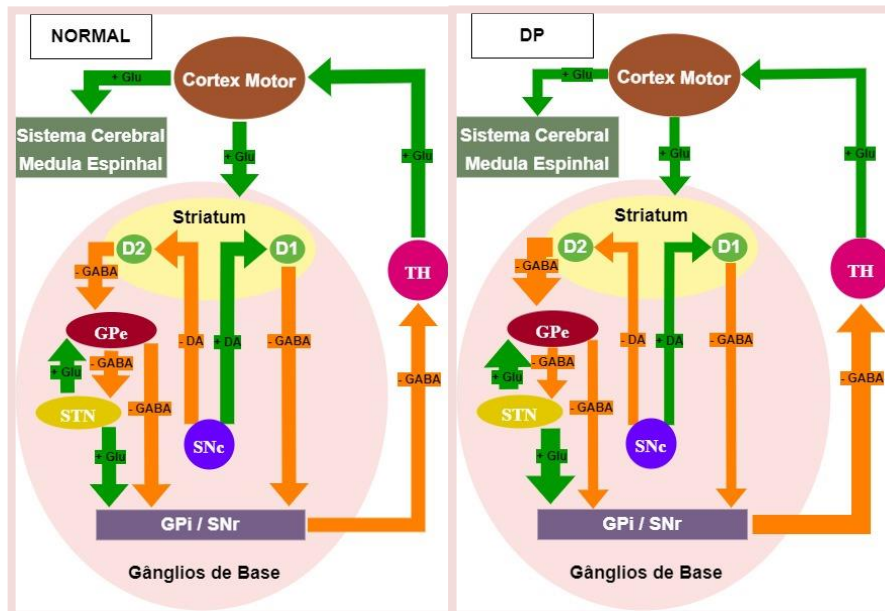


Figura 1.1 – Representação do circuito dos gânglios da base ou sistema extrapiramidal. À esquerda encontra-se representado o circuito dos gânglios de base sem alterações, em que a via nigroestriatal é normal. À direita está representado o circuito após perda de neurónios dopaminérgicos na via nigroestriatal, com consequente redução da libertação de dopamina sobre os recetores D1 e D2 do estriado, ocorrendo alterações nos sinais promotores do movimento. Legenda: ácido 4-aminobutanóico (GABA), dopamina (DA), globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPI), glutamato (Glu), núcleo subtalâmico (STN), recetor de dopamina 1 e 2 (D1 e D2), substância negra parte compacta (SNc), substância negra parte reticulada (SNr), tálamo (TH). Setas a laranja e símbolo (-) representam a transmissão de sinais inibitórios. Setas a verde e símbolo (+) representam a transmissão de sinais excitatórios. Maior espessura das setas representa maior intensidade de sinal. Menor espessura das setas representa menor intensidade de sinal. Adaptado de, (39,40).

A perda de neurónios dopaminérgicos na via nigroestriatal está fortemente relacionada com a formação de corpos de Lewy (CL), compostos maioritariamente pela proteína α S. Consequentemente, para se entender melhor a DP, com o objetivo de desenvolver terapêuticas específicas para a doença, tornou-se necessário aprofundar esta temática em busca de mais informação, principalmente ao nível dos processos celulares.

1.5. Processos celulares associados à DP

A DP caracteriza-se como um distúrbio multifatorial causado por alterações em vários mecanismos celulares. Os mecanismos exatos da neurodegeneração na DP ainda não são totalmente compreendidos, mas muitos destes mecanismos interferem, direta e indiretamente, com a proteína α S, que é central da DP. Considera-se que a morte dos neurónios dopaminérgicos está associada a uma série de ocorrências, tais como: perturbação dos sistemas de reparação e degradação de α S; neuroinflamação; disfunção mitocondrial; stress oxidativo; e formação de oligómeros de α S, podendo também estar associada a fatores genéticos. Evidências científicas sugerem uma

propagação célula a célula da α S, em que as vias estão inter-relacionadas e, deste modo, são gerados ciclos de *feedback* prejudiciais que conduzem à neurodegeneração e ao aparecimento da DP. (40,41)

1.5.1. Disfunções nos sistemas de reparação e degradação de α S

A proteína α S é reparada e removida no interior da célula, principalmente através do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), do sistema de autofagia lisossomal (SAL) e da autofagia mediada por chaperonas (AMC). A inibição ou diminuição da função destes sistemas pode levar ao emparelhamento incorreto da proteína e à sua agregação, promovendo um desequilíbrio nas vias celulares e conduzindo à morte celular. Várias evidências interligam estes sistemas e a α S. Por exemplo, o aumento da idade está associado a uma diminuição da função do SAL e do SUP, o que é consistente com o aumento de α S em neurónios dopaminérgicos da substância negra. A estimulação farmacológica da macrofagia conduz a uma diminuição de α S intracelular. Existe a ocorrência de um “círculo vicioso”, pois os oligómeros de α S conseguem inibir o SUP, promovendo a sua acumulação, o que resulta numa inibição do SAL, pela inibição da macrofagia. Diferentes formas de α S diminuem a função de AMC. (42–48)

Mutações em determinados genes provocam alterações no SUP e no SAL. Especificamente, mutações nos genes Parkin, Pink1 e DJ-1 provocam alterações no SUP e mutações nos genes LRRK2, GBA, VPS35 e ATP13A2 conduzem a alterações no SAL, promovendo a agregação de α S. Em relação às proteínas Parkin, Pink1 e DJ-1, estas ligam-se para formar um complexo que promove a degradação de proteínas de má conformação pela via SUP. Mutações individuais nestes três genes estão associadas a uma forma recessiva autossómica de DP. Alterações em ATP13A2 causam disfunção na LAS, potenciando a acumulação de α S *in vitro*. Verificou-se que esta mutação está associada a formas de parkinsonismo juvenil. (49–53)

A descoberta da libertação de α S no espaço extracelular suscitou a necessidade de compreender os processos que conduzem a sua remoção nesse meio. Não sendo os mecanismos e os intervenientes na remoção da α S extracelular claros, os estudos já realizados apontam para um conjunto de evidências que sugerem mecanismos de endocitose e fagocitose, bem como proteólise por protéases extracelulares. Algumas

enzimas proteolíticas extracelulares foram implicadas na degradação da α S, nomeadamente a KLK6 (neurosina), metaloproteases de matriz (MMP1, 2, 9, e 14) e a plasmina. Em relação aos processos de endocitose e fagocitose, foi sugerido que as células adjacentes, incluindo neurónios e astrócitos, sistema imunitário inato, como microglia, e sistema imunitário adaptativo, linfócitos e autoanticorpos, estejam envolvidos na *clearance* de α S. (14,54,55)

As alterações nos mecanismos complexos de *clearance* de α S, tanto ao nível intracelular como extracelular, podem conduzir a um desequilíbrio da homeostase proteica, o que pode desencadear a agregação e propagação de α S. Se promovermos a inibição da ação, especificamente das α S prejudiciais, com recurso a novas moléculas, podemos conseguir uma melhoria de SUP e SAL, retardando a morte de neurónios dopaminérgicos através da promoção da homeostase proteica e reduzindo assim a progressão da DP.

1.5.2. Disfunção mitocondrial

Existem evidências sólidas de disfunção mitocondrial na DP e foram sugeridos vários processos que podem desencadear esta disfunção, tais como a exposição a certas moléculas, biogénese deficiente, alterações nos níveis de Ca^{2+} , alteração nas dinâmicas mitocondriais, redução da atividade da cadeia transportadora de eletrões, alterações no transporte das mitocôndrias, mitofagia deficiente e *stress* oxidativo. Estes processos estão também associados a alterações em vários genes, tais como SNCA, LRRK2, Parkin, PINK1, CHCHD2 e VPS35. (56,57)

A primeira associação entre a mitocôndria e a DP surgiu na sequência de estudos que envolveram a exposição a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina denominada por MPTP, que é oxidada formando o catião 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+). Esta molécula é captada pelos terminais dopaminérgicos, inibindo seletivamente a atividade do complexo I da cadeia transportadora de eletrões e alterando a homeostasia do cálcio. Outra molécula que está ligada à DP e que inibe igualmente a atividade do complexo I é a rotenona, um pesticida. O complexo I encontra-se reduzido em muitos tecidos isolados de doentes com DP. Deficiências no complexo I conduzem a *stress* oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) que podem interferir com a

proteostase da α S. Como os processos intracelulares estão interligados, estabelece-se um “círculo vicioso” entre α S e mitocôndrias que conduz a danos celulares. A existência de baixos níveis de α S na mitocôndria é um fenómeno aparentemente normal, mas α S em excesso pode causar deficiência no complexo I. Níveis elevados de α S WT e mutantes induzem fragmentação mitocondrial e ERO, *in vitro* e *in vivo*. Oligómeros de α S reduzem os níveis celulares de *peroxisome proliferator-activated recetor gamma coactivator 1-a* (PGC1), o que aparentemente lhes confere a capacidade de influenciar a biogénese da mitocôndria por regulação PGC1, o que levará a uma diminuição da biogénese mitocondrial. A proteína α S foi também localizada em membranas associadas às mitocôndrias (MAM), numa estrutura especializada que forma uma *interface* entre o retículo endoplasmático (RE) e a mitocôndria, que é importante para regular o Ca^{2+} e a apoptose. Em quadros clínicos de DP as α S ligam-se menos às MAM, aumentando a fragmentação mitocondrial, considerando-se que a α S tem como função conferir morfologia as mitocôndrias. A proteína CHCHD2 (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2*) está associada ao espaço intermembranar mitocondrial e foi implicada no desenvolvimento da DP, estando envolvida nos processos de respiração mitocondrial. A proteína CHCHD2 existe na mitocôndria, ligada principalmente ao complexo IV, e tem sido consistentemente demonstrado que a redução da sua expressão desencadeia uma redução da atividade do complexo IV que provoca um aumento na produção de ERO e fragmentação mitocondrial. Aparentemente a proteína CHCHD2 consegue translocar para o núcleo, atuando como fator de transcrição sob condições de *stress* e regulando a expressão da isoforma subunidade 4 do complexo mitocondrial IV (COX4I2). A *parkina* é uma ubiquitina ligase E3 citosólica que ubiquitina as proteínas alvo para sinalização ou degradação proteossomal. Tem diversas funções na manutenção da homeostase mitocondrial, regulando a sua biogénese e degradação através de um processo de mitofagia. Nos estágios iniciais da degradação mitocondrial a *parkina* é envolvida pelas mitocôndrias danificadas ou disfuncionais e aí ativada pela proteína quinase 1 induzida por PTEN (PINK1), outra proteína relacionada com o desenvolvimento da DP, levando à ubiquitinação de proteínas da membrana mitocondrial externa e subsequente degradação proteossomal. Estudos recentes demonstraram mitofagia endógena mediada pela *parkina* nos axónios distais de neurónios de roedores. A *parkina* e a PINK1 cooperam na depuração de mitocôndrias

danificadas, por autofagia. A principal função da proteína VPS35 (*vacuolar protein sorting-associated protein 35*) nas mitocôndrias parece ser a regulação da dinâmica mitocondrial, através da interação com as proteínas de fissão e fusão mitocondrial. Aparentemente, VPS35 mutante pode desencadear a fragmentação mitocondrial, o que leva à neurodegeneração. Vários modelos que sobre expressam LRRK2 WT ou uma variante mutante associada à DP demonstraram maior vulnerabilidade a toxinas mitocondriais, além de defeitos na dinâmica mitocondrial e aumento da produção de ERO. (56–65)

1.5.3. Stress oxidativo

O *stress* oxidativo associado à DP ocorre pela produção descontrolada de ERO e ERN através do metabolismo da DA, de disfunções mitocondriais e de neuroinflamação, sendo um fator que contribui para o desenvolvimento e agravamento da DP, potenciando a neurodegeneração. As espécies reativas ERO e ERN podem interagir com proteínas alterando as suas conformações, interferir com os processos de proteólise, como SAL, e prejudicar a função de SUP, que degrada proteínas mal dobradas ou danificadas, aumentando a probabilidade de gerar distúrbios sobre a α S, modificando-a e acelerando a sua agregação. Os neurónios dopaminérgicos são constantemente expostos a metabolitos com deficiência de eletrões gerados pelo metabolismo da DA, via enzimática por MAO-B ou por auto-oxidação. Além disso, estes processos metabólicos aumentam com a idade. Seguindo a via da auto-oxidação da DA origina-se neuromelanina, conhecida por estar acumulada no SNc do cérebro humano. A degeneração de neurónios liberta neuromelanina, o que conduz a uma inflamação crónica, com ativação da microglia e formação de radicais livres. Foi demonstrado que o *stress* oxidativo resultante da disfunção mitocondrial assume maior expressão no tecido cerebral de pacientes com DP. Fatores externos, como a exposição a toxinas ambientais inibidoras do complexo I, aumentam a geração de radicais livres. O *stress* oxidativo induz alterações nos poros de transição da permeabilidade nas mitocôndrias cerebrais. Mutações em DJ1, gene que codifica um antioxidante, causam uma DP autossómica recessiva de início precoce, estando associadas a um aumento do *stress* oxidativo celular. Foi demonstrado a remoção do gene DJ1 de murganhos aumenta a oxidação proteica em neurónios dopaminérgicos da substância negra sujeitos a *stress*.

Acresce que os radicais livres, por meio da interação com os lípidos da membrana, causam peroxidação lipídica tóxica que, como foi demonstrado, assume maior expressão na substância negra de cérebros com DP. (66–71)

1.5.4. Mecanismos imunológicos e inflamatórios

A neuroinflamação crónica está associada à perda de neurónios na DP, sendo uma importante característica da doença. A microglia tem um papel importante no controlo da neuroinflamação e a sua ativação excessiva leva à morte dos neurónios dopaminérgicos. Existem alguns fatores desencadeadoras da neuroinflamação, nomeadamente o aumento da concentração de neuromelanina e alterações em certos genes e proteínas associados à DP, tais como, LRRK2 e as, que foram mencionados como ativadoras da microglia. (72–75)

A neuromelanina, um metabolito derivado da metabolização da dopamina, é libertada pelos neurónios dopaminérgicos em degeneração, o que conduz à ativação da microglia e ao aumento da sensibilidade destes neurónios à morte celular mediada pelo *stress* oxidativo. Ao nível genético, o gene LRRK2, associado ao risco de desenvolver DP, parece estar envolvido na autofagia mediada pelas células imunitárias. Por sua vez, a proteína α S intracelular é libertada pelos neurónios para o espaço extracelular, atuando como agonista do recetor TLR2 (*Toll-like 2*) que ativa a resposta inflamatória da microglia. Foi demonstrado que a adição de α S humana a uma cultura de neurónios do mesencéfalo causa neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos por ativação da microglia, o que não ocorre na ausência da mesma. A α S estimula também os astrócitos a produzir moduladores inflamatórios que promovem a ativação da microglia. Foi detetada uma sobreativação da microglia bem como do fator de necrose tumoral α (TNF- α) no estriado na SNc, em murinhos com sobreexpressão de α S WT. Assim, os estudos já realizados apontam para interações entre genes, proteínas e a neuroinflamação, promovendo alterações no enrolamento da α S e conduzindo a um “círculo vicioso” que resulta na degeneração dos neurónios dopaminérgicos. (76–82)

1.6. Tratamento Farmacológico da DP

1.6.1. Anticolinérgicos

Os fármacos anticolinérgicos foram os primeiros a apresentar resultados significativos no controlo dos sintomas da DP. Em Portugal são comercializadas duas moléculas que antagonizam recetores muscarínicos M1, o biperideno e o tri-hexifenidilo (**Figura 1.2**), com eficácia semelhante.

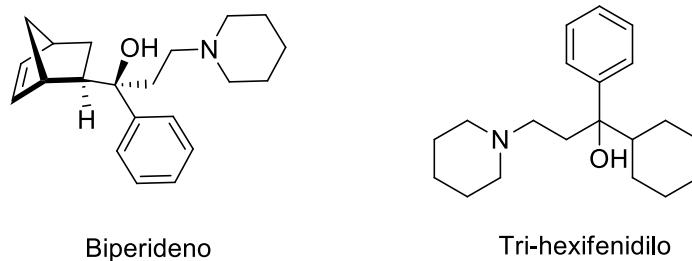


Figura 1.2 – Representação da estrutura química do biperideno e do tri-hexifenidilo, antagonistas dos recetores muscarínicos utilizados clinicamente em DP.

O mecanismo de ação desta classe farmacológica traduz-se na reposição do equilíbrio entre os efeitos dos neurotransmissores DA e acetilcolina (Ach) nos gânglios da base, através de *feedback* negativo. A diminuição dos níveis de DA provoca um aumento de Ach. Na DP, a redução de DA resultante da degradação dos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais provoca igualmente um aumento da atividade colinérgica entre os neurónios do estriado. A Ach atua nos recetores muscarínicos dos terminais nervosos dopaminérgicos exercendo efeito inibitório. Deste modo, fármacos anticolinérgicos reduzem o efeito da Ach e compensam a falta de DA. Um dos problemas dos anticolinérgicos são os efeitos adversos, sendo os jovens mais capazes de os tolerar, mas devendo ser evitados em doentes com idade avançada. Estas moléculas melhoram essencialmente o tremor, com alguma ação na rigidez e pouco efeito na bradicinesia, não sendo mais eficazes que os agentes dopaminérgicos. Podem ser utilizados em monoterapia, no tratamento de doentes com elevado tremor, mas sem bradicinesia ou distúrbios na marcha de forma significativa, e em doentes que apresentem tremor persistente, apesar do tratamento com levodopa ou agonistas da dopamina, ou em doentes que recebem fármacos antipsicóticos que são antagonistas da dopamina e, assim, contrariam o efeito da levodopa. (7,83–86)

1.6.2. Dopaminérgicos

1.6.2.1. Precursores da Dopamina

A associação entre levodopa e um inibidor da L-aminoácido aromático descarboxilase (IAADC), nomeadamente, a carbidopa ou a benserazida (**Figura 1.3**), representam o tratamento de primeira linha para a DP, sendo um tratamento sintomático eficaz, particularmente ao nível do controlo da bradicinesia.

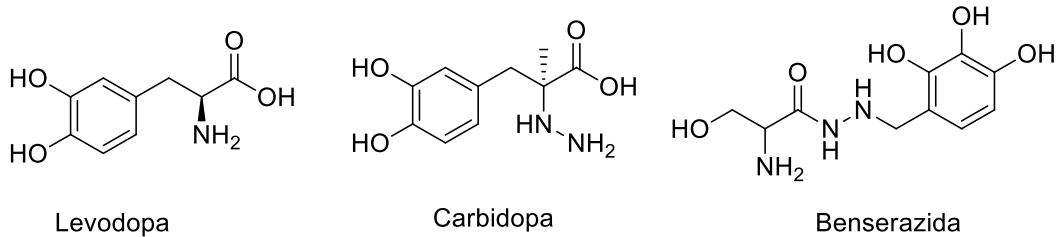


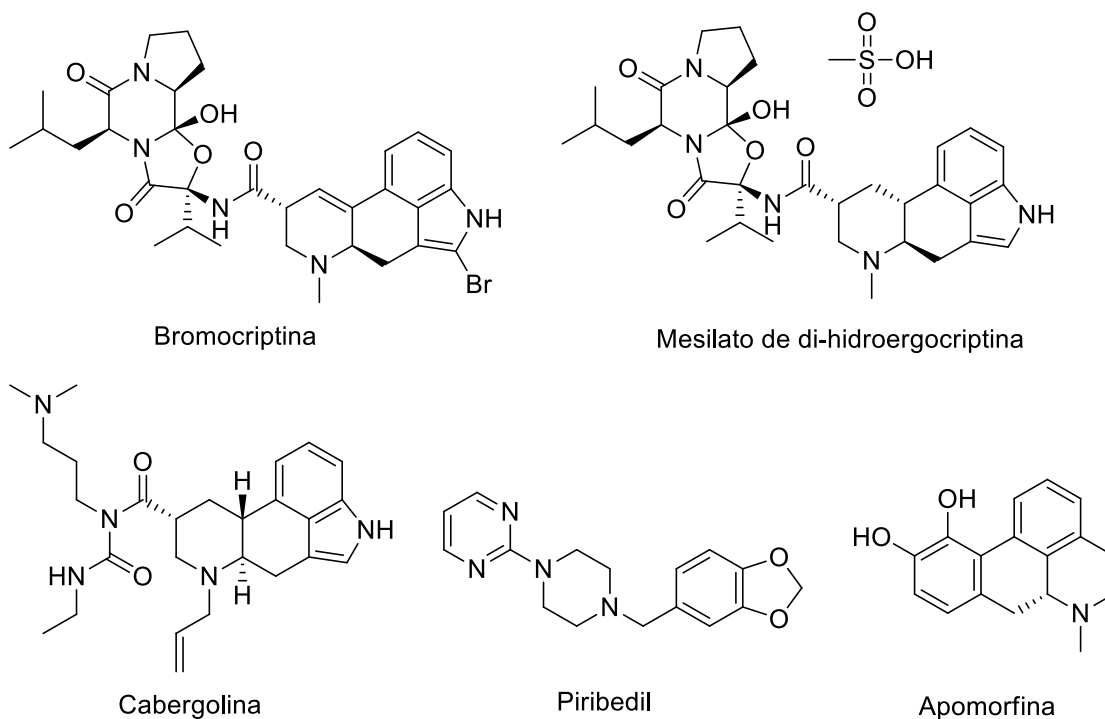
Figura 1.3 – Representação das estruturas químicas da levodopa, um precursor da dopamina, e representação das estruturas da carbidopa e da benserazida, inibidores da IAADC.

Outros sintomas como o tremor e a rigidez também podem responder positivamente à terapêutica com levodopa, todavia esta apresenta um efeito menor sobre a instabilidade postural. Tanto a levodopa como os agonistas da DA podem ser utilizados inicialmente em doentes que necessitem de terapêutica sintomática para DP. É razoável iniciar a terapêutica com agonistas da DA em pacientes com menos de 65 anos e com levodopa em pacientes com mais de 65 anos. No entanto a escolha deve ser individualizada, de acordo com as características do doente. Uma completa abstinência de resposta à levodopa em dose elevada sugere que o diagnóstico original de DP pode estar incorreto e que o doente pode sofrer de outro parkinsonismo. Com o tempo, a efetividade da levodopa diminui gradualmente. A DA não atravessa a barreira hematoencefálica, no entanto a levodopa, o precursor metabólico imediato da DA, entra no cérebro por via de um transportador de L-aminoácido (LAT), onde é descarboxilada. A descarboxilação ocorre rapidamente no interior do cérebro, porque os IAADC não penetram a barreira hematoencefálica, portanto impedem apenas a conversão da levodopa em DA na circulação sistémica e no fígado, o que permite uma redução efetiva da dose de levodopa e de complicações como náuseas, vómitos e hipotensão ortostática. No sistema nervoso central, a levodopa é convertida em DA pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC) e inativada pelas enzimas

monoaminoxidase tipo A e B (MAO-A, MAO-B) e catecol-o-metil-transferase (COMT). Para além de discinesias e efeitos psiquiátricos, um problema grave resultante do tratamento de longo prazo com levodopa é o aparecimento de flutuações na mobilidade, sendo as duas formas predominantes a deterioração da ação no final da dose e o fenómeno *on-off*. Estima-se que tais complicações motoras ocorram em pelo menos 50% dos pacientes, após 5 a 10 anos de tratamento. (7,83–87)

1.6.3. Agonistas da Dopamina

Os agonistas da DA são fármacos que atuam diretamente nos recetores dopaminérgicos. Atualmente há várias moléculas desta classe farmacológica com autorização para comercialização em Portugal e que podem ser divididas em dois subtipos farmacológicos: (i) agonistas derivados da ergotamina, que incluem a bromocriptina, o mesilato de di-hidroergocriptina e a cabergolina (**Figura 1.4**); (ii) os agonistas não ergonómicos, que incluem o piribedil, a apomorfina, o pramipexol, o ropinirol e a rotigotina (**Figura 1.4**).



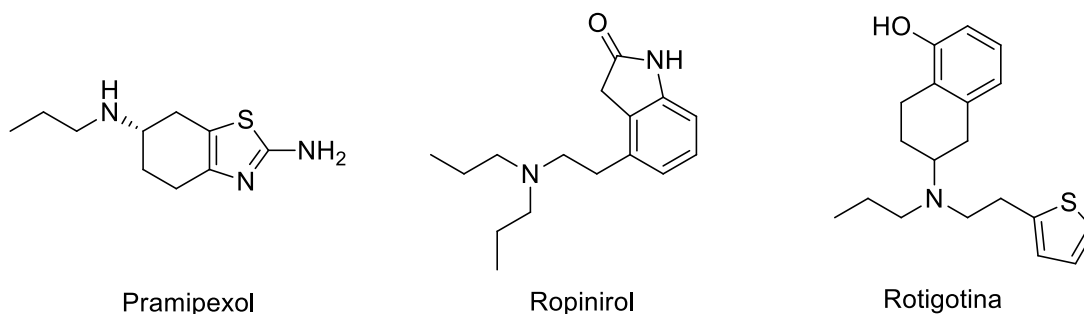


Figura 1.4 - Representação das estruturas químicas de agonistas dos recetores de dopamina. Estes dividem-se em dois subtipos, os agonistas derivados da ergotamina, que incluem a bromocriptina, o mesilato de di-hidroergocriptina e a cabergolina, e os agonistas não ergonómicos, que incluem o piribedil, a apomorfina, o pramipexol, o ropinirol e a rotigotina.

Ao contrário da levodopa, estes fármacos, por serem agonistas diretos, não necessitam de bioativação (conversão) metabólica, não competem com aminoácidos para o seu transporte através dos intestinos ou para o cérebro e não dependem da recaptação e libertação neuronal. A sua eficácia no controlo dos sintomas da doença de Parkinson e na melhoria das flutuações motoras associadas à levodopa está bem demonstrada. Alguns dos agonistas da dopamina acima referidos estão indicados em monoterapia e todos eles estão indicados como terapêutica adjuvante da levodopa. (83–87)

Atualmente, estão bem descritos cinco recetores diferentes da dopamina. A afinidade dos diferentes agonistas para os vários recetores não é idêntica, o que resulta em diferentes perfis de ação terapêutica e de segurança. Alguns pacientes podem revelar intolerância relativamente a um agonista da DA mas serem tolerantes relativamente a outros. Os agonistas dopaminérgicos derivados da ergotamina raramente são utilizados, pois os seus efeitos colaterais são mais preocupantes do que os apresentados pelos novos fármacos. (83,86,87)

Os agonistas da DA são usados no tratamento de pacientes mais jovens, por estes apresentarem risco acrescido de complicações motoras após tratamento com levodopa e também com o objetivo de adiar a terapia com levodopa. Para doentes com idade mais avançada, os agonistas da DA podem ser reservados para uso adjuvante quando a levodopa não perde eficácia em regime de monoterapia ou quando se verificam situações de intolerância. Por vezes os agonistas da DA são úteis na redução dos períodos de *off* com levodopa e na melhoria das flutuações da mobilidade, nos estádios

mais tardios da doença. Geralmente, a resposta a um agonista da DA é decepcionante em pacientes que nunca responderam à levodopa. (84–87)

1.6.3.1. Apomorfina

A apomorfina (**Figura 1.4**) é um alcaloide derivado da morfina que não possui propriedades narcóticas. Sendo um potente agonista da dopamina, a apomorfina é usada principalmente como fármaco de resgate para doentes com flutuações de resposta à levodopa incapacitantes, apesar da terapêutica otimizada. Devido à baixa biodisponibilidade oral, por ser sujeita a um extenso metabolismo hepático de primeira passagem, a apomorfina é administrada por via subcutânea, em conjunto com um antiemético, como pré-tratamento, devido à sua potente ação emética. Embora este efeito colateral restrinja o seu uso, a apomorfina tem um papel importante na estabilização de pacientes que sofrem de efeitos imprevisíveis. Pode apresentar outros efeitos adversos graves, sendo só utilizada quando todos os outros fármacos falham. (7,84–87)

1.6.4. Inibidores Seletivos da Monoaminoxidase Tipo B

Foram diferenciadas no sistema nervoso duas variantes de enzimas monoamina oxidase: a MAO-A, que metaboliza norepinefrina, serotonina e dopamina; a MAO-B que metaboliza seletivamente a dopamina. Existem três inibidores da MAO-B (IMAO-B) com autorização de comercialização em Portugal, a selegilina, a rasagilina e a safinamida (**Figura 1.5**).

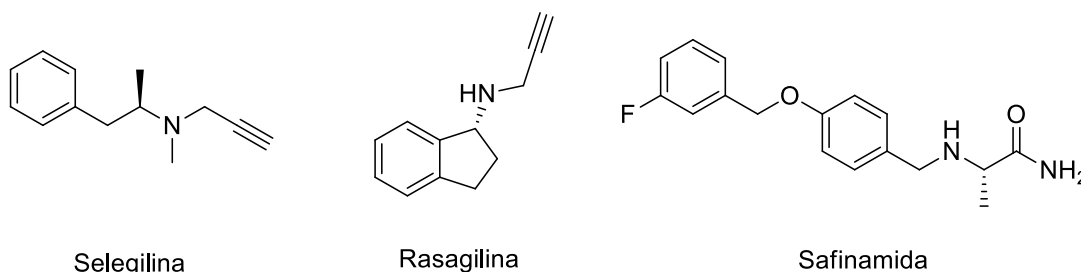


Figura 1.5 – Representação das estruturas químicas da selegilina, rasagilina e safinamida, inibidores seletivos da MAO-B.

Em doses terapêuticas, estes fármacos inibem preferencialmente a MAO-B em relação à MAO-A, interferindo na metabolização da dopamina com obtenção de atividade dopaminérgica prolongada. Os IMAO-B podem ser utilizados em monoterapia

ou em conjunto com outros fármacos, nomeadamente no controlo das flutuações motoras com preservação da dose de levodopa. Esta classe farmacológica exhibe propriedades antiapoptóticas e a sua inibição desvia a degradação de DA para a via COMT, que não gera radicais livres. No entanto, as evidências científicas de que esta classe farmacológica possa exercer efeitos sobre a modificação da progressão da doença são inconclusivas. (83–86)

A selegilina não produz benefícios funcionais significativos na maioria dos indivíduos quando administrada em monoterapia, mas aumenta o efeito da levodopa, protelando o seu metabolismo oxidativo. Desta forma, é útil como fármaco adjuvante em situações de resposta decrescente ou flutuante à levodopa. Os seus efeitos secundários limitam o seu uso em pacientes com doença de início tardio. Estudos em animais sugerem que a selegilina pode inibir a progressão da doença, mas ensaios para testar o efeito da selegilina sobre a progressão do parkinsonismo em humanos produziram resultados ambíguos. (7,83,85,86)

A rasagilina pode ser utilizada em regime de monoterapia ou como opção de primeira linha como terapêutica adjuvante com levodopa, quando é necessário controlar as flutuações motoras. A eficácia da rasagilina no tratamento dos sintomas de DP é modesta, mas é bem tolerada e os seus metabolitos são desprovidos de propriedades semelhantes às anfetaminas, o que ocorre no caso dos metabolitos originadas pela metabolização da selegilina. Este fármaco demonstrou ter propriedades neuroprotetoras em modelos animais, o que suscitou a hipótese de a rasagilina poder modificar o curso da doença, mas os estudos realizados para esclarecer esta questão produziram resultados incertos, sendo que a decisão de usar a rasagilina para fins neuroprotetoras, permanece individual. (84,86,87)

A safinamida é um fármaco que foi aprovado para comercialização no mercado Europeu, em 2015, e nos Estados Unidos da América em 2017. Apresenta um bom perfil de segurança, mas novos efeitos adversos poderão surgir com a sua utilização na população e, ademais, o seu custo é superior ao dos restantes IMAO-B. Esta molécula foi avaliada como benéfica no tratamento adjuvante, em pacientes com DP submetidos a tratamento com levodopa em ensaios clínicos randomizados. Em comparação com o

placebo, nestes ensaios a safinamida revelou eficácia para aumentar o tempo de *on* diário médio sem discinesia significativa, e com melhoria da função motora. (87)

1.6.5. Inibidores da Catecol-O-Metil-Transferase

Atualmente encontram-se autorizados para comercialização em Portugal três inibidores da catecol-o-metil-transferase (ICOMT), a tolcapona, a entacapona e a opicapona (**Figura 1.6**). Estes fármacos reduzem seletivamente a metilação da levodopa a nível periférico pela enzima COMT, o que conduz a um aumento da semivida plasmática da levodopa, garantindo maior estabilidade na sua concentração plasmática e assegurando o prolongamento dos seus efeitos terapêuticos. Nem o tempo para atingir o pico de concentração nem a concentração máxima de levodopa são alterados. Os ICOMT foram desenvolvidos para prolongar os efeitos da levodopa e, na ausência desta, não têm efeito ativo sobre os sintomas da DP. São, contudo, muito importantes, pois conduzem a uma resposta mais suave e possibilitam a opção de redução da dose diária total de levodopa.

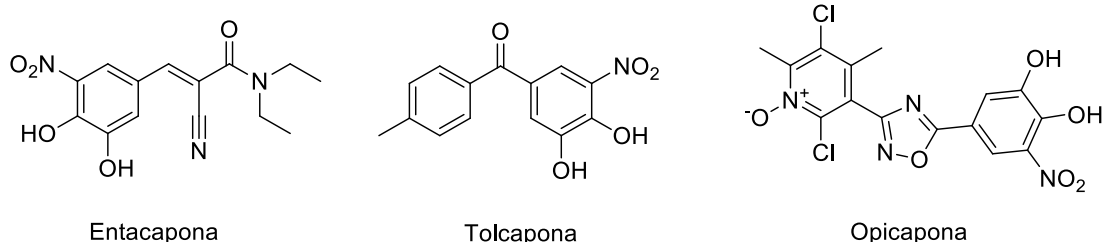


Figura 1.6 - Representação das estruturas químicas da entacapona, tolcapona e opicapona, inibidores da COMT.

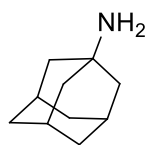
Esta classe está indicada como terapia adjuvante, em doentes que apresentam flutuações motoras na ausência de resposta eficaz a terapêuticas baseadas em combinações de levodopa com IAADC. Ademais, a utilização de IAADC está associada à ativação compensatória de outras vias do metabolismo da levodopa, especialmente a COMT. No mercado português está disponível a associação de levodopa com um IAADC e um ICOMT. Os ICOMT também prolongam a ação da levodopa, ao diminuírem o seu metabolismo periférico. A tolcapona inibe a COMT tanto a nível central como periférico, enquanto a entacapona e a opicapona apresentam apenas efeito de inibição periférica. (83–88)

Os efeitos secundários desta classe estão associados a um aumento da estimulação dopaminérgica. A tolcapona esteve suspensa no mercado europeu devido a risco de hepatotoxicidade, grave e fatal. Foi, entretanto, reintroduzida, mas a sua utilização está sujeita a restrições, sendo apenas utilizada quando outra terapêutica adjuvante é ineficaz ou contraindicada, sendo a monitorização rigorosa da função hepática necessária. Ao contrário da tolcapona, a entacapona e a opicapona não estão associados a efeitos de hepatotoxicidade grave, apesar de todos os fármacos deverem ser utilizados com especial atenção em doentes com insuficiência hepática. A entacapona é considerada uma das opções de primeira linha como terapêutica adjuvante, para gerir flutuações motoras. De acordo com a avaliação farmacoterapêutica da opicapona, em relação à entacapona, existe sugestão de valor terapêutico acrescentado da opicapona em relação ao *outcome* “variação absoluta do tempo em *on*”. (83–89)

1.6.6. Amantadina

A amantadina (**Figura 1.7**) foi inicialmente comercializada como fármaco antiviral, com indicação para tratamento de infeções pelo vírus *influenza*. Só posteriormente se descobriu ser benéfica na DP, embora o seu efeito antiparkinsoniano seja modesto. É um fármaco menos eficaz que a levodopa, mas é mais eficaz do que os anticolinérgicos no tratamento da bradicinesia e da rigidez. Uma das maiores vantagens da amantadina é a segurança, sendo relativamente livre de efeitos adversos. O seu mecanismo de ação permanece por esclarecer, embora várias propostas tenham sido sugeridas com base na evidência neuroquímica de aumento da libertação de DA, inibição da recaptção de DA, e na possibilidade de a amantadina exercer efeitos anticolinérgicos ao nível central. Este fármaco é antagonista do recetor N-metil-D-aspartato, atuando por estabilização do estado fechado do canal, o que pode conferir efeito terapêutico ao interferir com a neurotransmissão excessiva de glutamato nos gânglios da base. A amantadina pode melhorar a bradicinesia, o tremor em repouso e a rigidez, bem como reduzir a discinesia induzida pelo tratamento prolongado com levodopa e as flutuações motoras. Contudo, apenas uma pequena parte dos pacientes obtém benefícios significativos, que podem ser de curta duração (por vezes, os efeitos da amantadina duram apenas algumas semanas). Este fármaco é, todavia, bastante útil

quando usado como monoterapia de curto prazo em pessoas com doença leve, sendo pouco benéfico quando adicionada à levodopa. (7,15,85–87)



Amantadina

Figura 1.7 - Representação da estrutura química da amantadina.

1.7. Fatores de Risco

A DP pode ser causada por fatores genéticos ou ambientais e geralmente a causa da doença é desconhecida. Evidências científicas sugerem que casos esporádicos de DP resultam de interações complexas entre fatores ambientais e genéticos. Estima-se que as causas genéticas possam estar envolvidas em até 10% dos doentes. O envelhecimento é um fator de risco, pois a incidência de DP aumenta com a idade e aparentemente o gênero masculino é ligeiramente mais afetado relativamente ao feminino. (90,91)

No que respeita a hábitos, a ingestão moderada de álcool parece conferir um efeito modestamente protetor na DP. Este efeito pode estar relacionado com a influência do álcool nos mecanismos de recompensa dopaminérgicos ou com o aumento da concentração de ácido úrico no organismo, um composto presente nas bebidas alcoólicas. No entanto, os transtornos relacionados com o alcoolismo foram associados a um risco acrescido de DP. O consumo regular de café está associado a uma significativa redução de risco de desenvolver DP. A cafeína é provavelmente a princípio ativo responsável pela redução de risco de desenvolver DP observada, exercendo atividade neuroprotetora ao atuar com o seu efeito agonista sobre os recetores de adenosina A₂. O consumo de chá-preto, a segunda maior fonte de cafeína, foi também associado a um menor risco de desenvolver DP, mas tal efeito não foi evidenciado na sequência do consumo de chá-verde. O consumo moderado de café e de chás que contêm cafeína está associado a um perfil geral favorável à saúde. Relativamente ao tabaco, alguns estudos epidemiológicos demonstraram uma redução do risco de desenvolver DP associada ao seu consumo, efeito igualmente verificado em utilizadores de tabaco de

mascar. A nicotina é a molécula ativa plausível, pela ação estimulante na libertação de dopamina, pelo poder antioxidante e por provocar alterações na atividade da MAO-B. Está demonstrado que a atividade física, moderada ou vigorosa, baixa o risco de desenvolver DP, sendo tida como o melhor fator de prevenção primária. Entre os mecanismos propostos para explicar esse efeito neuroprotetor estão o aumento dos níveis de ácido úrico, o aumento da libertação de fatores neurotróficos, a regulação positiva da PGC1 α e a regulação da renovação da dopamina. (91–95)

Relativamente à dieta, um padrão alimentar prudente, caracterizado pela ingestão acentuada de frutas, vegetais e peixes, foi associado à redução do risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. Apesar disso, a relação entre a maioria dos componentes da dieta e o risco de doença de Parkinson permanece desconhecida. É provável que antioxidantes como as vitaminas E, C, luteína, licopeno e flavonoides, tenham um efeito protetor, ao neutralizar radicais livres, dada a importância do *stress* oxidativo na patogénese da doença. No entanto, as evidências apontam para efeitos modestos da vitamina E na diminuição do risco de desenvolvimento da DP, o mesmo se verificando relativamente à ingestão de flavonoides, vitamina C, luteína e licopeno. Foi proposto que os antioxidantes possam exercer efeito protetor na fase pré-sintomática da doença. Foi proposto que as vitaminas do complexo B e o ácido fólico influenciam a concentração de homocisteína, que tem potenciais efeitos neurotóxicos. Assim, a ingestão destes nutrientes poderia reduzir o risco de desenvolver DP, mas nenhuma associação se observou, exceto no caso da vitamina B6, com evidência fraca de redução do risco. Foi avaliado o efeito do consumo de laticínios, assumindo-se que poderia aumentar o risco de desenvolver DP. Todavia, não se observou qualquer relação entre a ingestão de vitamina D, cálcio e ferro e o risco de DP. As dietas com alto teor lipídico poderiam teoricamente aumentar a quantidade de radicais de oxigénio por peroxidação lipídica e, deste modo, aumentar o risco de DP, contudo não se verificaram tais efeitos. Também não há evidências, assumidas como convincentes, de que a ingestão de gordura total, macronutrientes, ou o valor global de calorias ingeridas estejam relacionadas com o risco de desenvolvimento de DP. Por outro lado, os ácidos gordos insaturados apresentam propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras e o

consumo de ácido araquidónico foi relacionado com a diminuição do risco de desenvolver DP. (92–95)

Relativamente ao efeito de medicamentos, o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINE's) está associado a um menor risco de DP. Este efeito é pronunciado no caso do ibuprofeno, sendo significativamente menor em outras famílias de AINE's, e sem associação para a aspirina. A degeneração neuronal na DP é acompanhada por neuroinflamação, com acentuada resposta glial. Os medicamentos anti-inflamatórios podem contribuir para retardar ou prevenir o aparecimento da DP, suprimindo as respostas pró-inflamatórias da microglia. A observação de maior prevalência e incidência de DP em homens, relativamente às mulheres, em vários estudos epidemiológicos, suscitou a hipótese de o estrogénio conferir efeito protetor contra a morte celular neuronal. Não há evidências convincentes relativamente a esta associação, e os resultados dos estudos de associações entre o risco de doença de Parkinson e outros fatores reprodutivos, incluindo idade na menarca, uso de contraceptivos orais, histórico de gravidez ou o padrão da menopausa, são controversos, embora a ooforectomia aparente aumentar o risco de DP. Os medicamentos indicados para tratar a hipertensão arterial não apresentam associação com o risco de desenvolver DP exceto, todavia os bloqueadores dos canais de cálcio parecem conferir um efeito protetor. O mecanismo desta proteção pode estar relacionado com o bloqueio do *stress* metabólico induzido pelos canais de cálcio nas mitocôndrias dos neurónios dopaminérgicos em degeneração. A isradipina, um bloqueador de canais de cálcio, está a ser investigada num estudo de fase III para utilização no tratamento da DP. A associação entre o risco de desenvolver DP e o uso de estatinas com efeito protetor ou a concentração de colesterol no sangue parece pouco provável, apesar de as estatinas terem potentes efeitos anti-inflamatórios e ação moduladora no sistema imunológico, com possíveis efeitos benéficos na DP. Estudos realizados numa grande coorte epidemiológica norueguesa forneceram evidências de que o uso de salbutamol, utilizado no tratamento da asma, está associado a um risco menor de desenvolver DP. Inversamente, o uso de propranolol, um antagonista β_2 , aumentou o risco de DP, apoiando a biologia subjacente. (92–95)

Quanto aos efeitos de exposição a substâncias exógenas, estudos demonstraram que a exposição a pesticidas tem associação positiva como risco de DP, embora para certos compostos a associação seja incerta. Moléculas como MPTP, o herbicida *paraquant* e o pesticida *rotenone* são inibidores seletivos do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, conduzem ao aumento do *stress* oxidativo e induzem a depleção de dopamina em estudos animais, estando associados a um maior risco de DP. As metanfetaminas ligam-se a transportadores pré-sinápticos de dopamina, o que aumenta as concentrações extracelulares deste neurotransmissor. Foi demonstrado através de estudos usando modelos experimentais *in vivo* que as metanfetaminas causam danos nos neurónios da substância negra, o que conduz ao desenvolvimento de uma patologia similar à DP. Foi investigada a exposição prolongada a metais pesados, como ferro, manganês, cobre, chumbo, amalgama, alumínio e zinco, para confirmação da hipótese de que tal exposição poderia aumentar o risco de desenvolver DP por acumulação de metais pesados na substância negra, estimulando o *stress* oxidativo. Todavia, os resultados dos estudos relativos a esta associação permanecem inconclusivos. (92–95)

No que tange a comorbilidades, as evidências de uma associação entre DP e neoplasias são ténues. Parece haver um risco acrescido de DP entre indivíduos com melanoma. Apesar disso, o Nilotinib, uma molécula inibidora de cinases tirosínicas utilizada no tratamento de leucemia mieloide crónica, encontra-se em estudos de fase II para utilização no tratamento de DP. Também se observou uma associação positiva entre traumatismo craniano e o risco de DP subsequente. A lesão cerebral traumática pode causar uma quebra da barreira hematoencefálica (BHE), inflamação cerebral de longa duração, interrupção da função mitocondrial, aumento da libertação de glutamato e acumulação de α S no cérebro, fatores que podem contribuir para o aumento da incidência de DP. Certos traços de personalidade, como a propensão da pessoa para estados clínicos de depressão, ansiedade e pessimismo, estão associados a um maior risco de desenvolver DP, com evidência sugestiva sólida desta associação. Não foi encontrada relação entre a diabetes e a DP, tanto na associação a um aumento do risco como de eventual ação protetora. No entanto, o exenatide encontra-se em estudos de fase II para tratamento de DP. Também não há associação entre índice de massa

corporal (IMC), obesidade e risco de DP. A anemia só por si não está associada ao aumento do risco de DP. Por outro lado, o surgimento de sinais pródromos da DP, como o histórico de constipação (menos de uma defecação por dia), que representa evidência clara, hiposmia e distúrbios no comportamento do sono estão associados a um aumento do risco de DP. (91–95)

Em relação a biomarcadores, observa-se um risco substancialmente mais baixo de desenvolver DP em pessoas que têm concentrações plasmáticas elevadas de ácido úrico. Este composto é um potente antioxidante, que possivelmente combate o *stress* oxidativo inerente na DP. Doentes com DP apresentam geralmente níveis de ácido úrico no plasma mais baixos que os indivíduos sem a doença. O ácido úrico atua como eliminador de ERO e ERN, reduzindo a morte celular e a disfunção mitocondrial nas culturas de células expostas a MPTP, iões de ferro ou glutamato. A Inosina, uma molécula que ao ser administrada é convertida em ácido úrico, encontra-se em estudos de fase III para o tratamento da DP. Os resultados de estudos para investigar a associação entre a concentração de lípidos e colesterol no plasma e risco de desenvolver DP são inconsistentes. (91,92,94,95)

Relativamente aos fatores genéticos, são várias as mutações genéticas associadas à DP. Os avanços genéticos contribuíram para a conceptualização que a DP corresponde a várias doenças neurodegenerativas, com sobreposição clínica e patológica. Muitas das formas familiares de DP exibem características clínicas que são consideradas atípicas, com relação à DP idiopática, como início jovem, distonia e ocorrência precoce da demência. A história familiar de DP é um fator de risco, aumentando consideravelmente a probabilidade de o indivíduo desenvolver DP, principalmente no caso de ter um parente de primeiro grau afetado. Mutações nos genes associados à DP constituem elevado risco de desenvolver a doença, destacando-se na **Tabela 1** os genes, Pink1, DJ-1, LRRK2, VPS35, ATP13A2, SNCA, CHCHD2, com indicação de algumas características relativas a hereditariedade e fase em que a DP se manifesta. Há, todavia, outros genes já identificados e que estão em estudo em relação à sua possível associação com a DP. (91,93,95,96)

Tabela 1 – Os vários genes relacionados com risco acrescido de desenvolver DP, com associação a diferentes tipos de mecanismo fisiopatológico, hereditariedade e fase etária comum de incidência.

Gene	Nome completo do gene	Hereditariedade	Início da DP
<i>Pink1</i>	PTEN induced putative kinase 1	Autossómica recessiva	Início precoce
<i>DJ-1</i>	Parkinsonism associated deglycase	Autossómica recessiva	Início precoce
<i>LRRK2</i>	Leucine rich repeat kinase 2	Autossómico dominante	Início tardio
<i>VPS35</i>	VPS35 retromer complex component	Autossómico dominante	Início tardio
<i>ATP13A2</i>	ATPase 13A2	Autossómica recessiva	Início precoce
<i>SNCA</i>	Alfa sinucleína	Autossómico dominante	Início precoce
<i>CHCHD2</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	Autossómico dominante	Início precoce e Início tardio

Página intencionalmente deixada em branco

2. A PROTEÍNA ALFA SINUCLEÍNA

2.1. Âmbito do trabalho

Esta dissertação envolveu uma pesquisa bibliográfica e uma revisão sistemática de várias fontes sobre a Doença de Parkinson, os seus mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, as formas patológicas da alfa sinucleína e estratégias terapêuticas com foco na alfa sinucleína. Foi feita uma recolha de informação científica sobre o tema em questão através de bases de dados *online*, como a PubMed, B-On, ResearchGate, ChEMBL, NCBI, Infomed, entre outras, e ainda recorrendo a livros sobre farmacologia e farmacoterapia. A pesquisa e recolha de informação *online* foram efetuadas em inglês, usando os termos “*alpha synuclein*”, “*alpha synuclein oligomers*”, “*alpha synuclein fibrils*”, “*alpha synuclein strategies*”, “*alpha synuclein novels*”, entre outras. A importância do objeto de estudo deve-se ao facto de que as terapias atuais pouco ou nenhum efeito exercerem sobre a evolução a doença. Deste modo, a dissertação pretende resumir as informações mais pertinentes sobre o assunto, tentando incentivar a pesquisa para desenvolvimento de novas estratégias e de fármacos, com o intuito de prevenir ou atrasar a progressão da patologia e também de reverter os seus efeitos.

2.2. A proteína α S

A α S é uma pequena proteína intrinsecamente desordenada, com elevada flexibilidade conformacional. É um produto do gene SNCA, localizado no braço longo do cromossoma 4, posição 21, um gene que consiste em 6 exões (**Figura 2.1**). A α S é abundantemente expressa no neocórtex, hipocampo, SN, TH e cerebelo, estando também presente em outros tecidos fora do cérebro. Representa 0,1% das proteínas no cérebro e compõe 1% do conteúdo proteico nos neurónios. A α S encontra-se localizada principalmente no citoplasma e, em menor quantidade, em compartimentos subcelulares, como as mitocôndrias, existindo também no espaço extracelular. A α S é uma pequena proteína pertencente à superfamília das sinucleínas, que também abrange a β -sinucleína (β S) e a γ -sinucleína (γ S). As formas α e β encontram-se sobretudo nos terminais nervosos, próximo das vesículas sinápticas no sistema nervoso central, enquanto que a γ S está presente nas células neuronais do sistema nervoso periférico. A α S é a sinucleína mais frequentemente observada em todos os organismos vertebrados, o que sugeriu aos cientistas a ideia de que regula algumas funções fisiológicas essenciais. São conhecidas três isoformas principais de α S, produzidas por meio de *splicing* alternativo. A isoforma de 126 aa

sem o exão 3, a isoforma de 112 aa sem o exão 5, e a isoforma completa, de 140 aa, que é a predominante. Esta é dividida em três domínios principais, denominados hélice α de ligação lipídica N-terminal (NT) (resíduos 1 a 60), domínio central de ligação amiloide (NAC) (resíduos 61 a 95) e cauda ácida C-terminal (CT) (resíduos 96 a 140) (**Figura 2.1**). Tratando-se de uma proteína desdobrada na sua forma nativa e com perfil intrinsecamente desordenado, a α S pode facilmente alterar a sua estrutura e interações, sendo estas significativamente influenciadas pelo ambiente circundante, como proteínas vizinhas, membranas lipídicas, estado redox, pH local, e estas características colocam α S entre as proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP). (10,97–104)

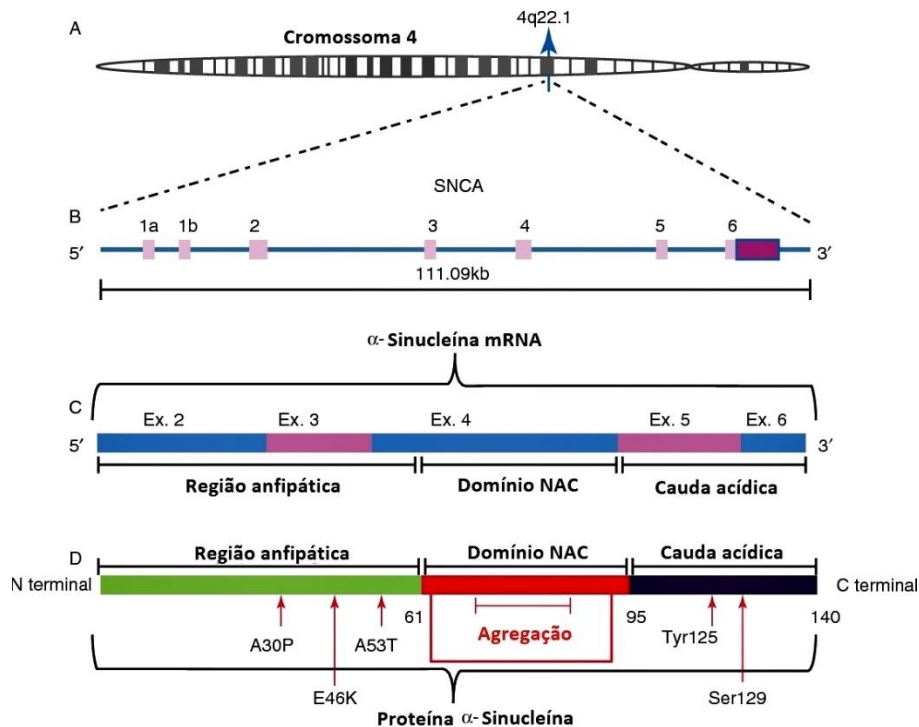


Figura 2.1 – A) Localização cromossômica do gene SNCA. B) Representação do gene SNCA. C) mRNA da proteína α S. D) Esquemas de representação das regiões da proteína α S e suas mutações. Adaptado de (10)

Cada região da α S tem propriedades físico-químicas específicas, conforme os aa que a constituem. A região central da α S foi descoberta durante a análise de proteína amiloide das placas senis do cérebro de pessoas com doença de Alzheimer, o que levou à identificação de outros dois peptídeos desconhecidos, além do peptídeo beta amiloide ($A\beta$). Essas duas proteínas desconhecidas foram denominadas componentes não amiloides das placas da doença de Alzheimer (NAC) e posteriormente foram descritas como pertencentes à α S, o precursor das proteínas NAC destas placas. A parte central da proteína incorpora um longo trecho hidrofóbico. Mais de 40% deste domínio é composto por resíduos de alanina e valina, que contribuem significativamente para a

sua hidrofobicidade. Com caráter hidrofóbico, amiloidogénico e carga nula, os fragmentos isolados da região NAC podem formar facilmente amiloides, o que torna o domínio NAC um segmento crucial no processo de fibrilação de α S. Este domínio hidrofóbico da α S está envolvido na formação e agregação de fibrilas, pois pode formar estruturas β cruzadas. Os resíduos de lisina com carga positiva alternada interagem com os grupos da cabeça de fosfato com carga negativa da membrana lipídica e, adotando uma conformação helicoidal de torção, a α S pode ligar-se superficialmente à bicamada lipídica, que apresenta os seus resíduos de carga negativa expostos para o solvente (**Figura 2.2**). (105–108)

O domínio NT é uma região carregada positivamente que incorpora algumas das séries de 11 repetições de aa. Cada repetição de 11 aa contém um motivo hexamérico KTKEGV altamente conservado e que está envolvido na formação de hélices α anfipáticas, sendo essencial para a ligação da membrana. Estas repetições têm a capacidade de induzir a estrutura helicoidal α S, e subseqüentemente reduzir a tendência de α S para formar estruturas β . As hélices são estabilizadas por interação com membranas de alta curvatura, enriquecidas em fosfolípidos, como ocorre nas vesículas sinápticas. (109,110)

O domínio CT, em contraste com o domínio NT e o NAC, é uma cauda acídica com 44 resíduos de aa, que contem 15 resíduos carregados negativamente, nomeadamente 10 resíduos de glutamato e 5 de aspartato, e rica em resíduos de prolina. Devido a esta elevada densidade de carga, que induz repulsões eletrostáticas, o domínio CT de α S organiza-se como uma estrutura aleatória, em forma de bobine. Esta região parece interagir com a região NT por meio de interações intramoleculares não covalentes, a fim de proteger o domínio NAC, com formação de uma estrutura monomérica mais

compacta e resistente à agregação. (111,112)

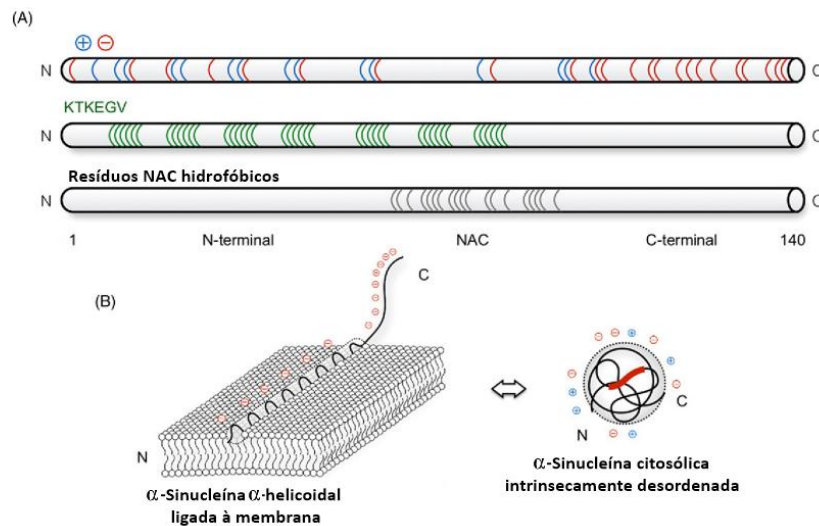


Figura 2.2 - (A) Representação das cargas negativas e positivas da αS ; das 7 regiões KTKEGV; dos resíduos aa hidrofóbicos na zona NAC. (B) Representação da αS ligada à membrana e em estado citosólico. Adaptado de (100).

Os primeiros 97 resíduos de αS são importantes para as interações lipídicas. A αS tem uma afinidade específica para membranas, de acordo com a curvatura, a composição da membrana lipídica e a razão lípido/proteína, ligando-se às membranas através dos seus primeiros 25 resíduos do domínio NT quando esta razão é suficientemente elevada. No caso da redução na proporção lípido/proteína, a αS interage com a membrana através dos 97 resíduos de aa da região NT adjacente e da região central NAC. Alguns dos elementos de membrana favoráveis incluem ácidos fosfolipídicos, como ácido fosfatídico, fosfatidilserinas e glicosfingolípidos, que são enriquecidos em vesículas secretoras e endocíticas, mas também cardiolipina, encontrada na membrana mitocondrial externa e interna. Em relação à curvatura da membrana, a αS liga-se preferencialmente a SUVs e LUVs que contêm grupos de carga negativa, em comparação com as GUVs, e esta preferência pode estar relacionada com a capacidade de a αS detetar a curvatura da membrana. (99,100,113)

A αS desempenha um papel instrumental em vários processos fisiológicos, principalmente na regulação do neurotransmissor dopamina e na inibição da oxidação de lípidos insaturados nas vesículas sinápticas. A αS é abundante em locais sinápticos, interagindo com muitos parceiros, como os transportadores de monoamina, componentes do citoesqueleto, membranas lipídicas, *chaperons* e proteínas associadas

a vesículas sinápticas. Além de ser expressa no cérebro, a α S também o é no coração, nos músculos e noutros tecidos, onde promove a ligação de vesículas à membrana celular e mantém a homeostase do cálcio nas mitocôndrias, melhorando a interação entre o RE e a membrana mitocondrial. (10,98,99,104,114)

2.3. Alterações na proteína α S

Tanto alterações do ambiente envolvente da α S como modificações na mesma, tais como alterações pós-traducionais, incluindo truncamento da região CT e mutações, podem conduzir a um desequilíbrio entre os vários estados conformacionais, induzindo a formação de formas oligoméricas e fibrilares tóxicas que causam perturbações nas funções fisiológicas do organismo. (115–117)

2.3.1. Alterações genéticas

As alterações conformacionais nas proximidades do resíduo mutado, ainda que subtis, podem perturbar a flexibilidade nativa geral da α S. Existem interações eletrostáticas entre resíduos dos domínios NT e CT, sendo provável que tais mutações afetem a estabilidade do estado nativo, desordenado, da α S, promovendo interações internas que conduzem a um estado intermediário parcialmente dobrado, e energeticamente menos estável, aumentando a propensão para automontagem que pode conduzir à formação de oligómeros. As mutações no domínio NT podem afetar as propriedades de ligação à membrana. Foram identificadas seis mutações pontuais no SNCA ligadas à DP, localizadas no NT, nomeadamente A30P, A53T, E46K, H50Q, G51D e A53E. Além destas mutações pontuais foram identificadas duplicações e triplicações do gene SNCA, que também podem conduzir a um fenótipo PD devido à produção excessiva de α S. A duplicação do SNCA resulta na híper acumulação de α S fosforilada no cérebro, uma MPT fortemente ligada à DP. Em relação às mutações pontuais, a tendência de agregação da α S é favorecida pelas mutações A30P, A53T, E46K e H50Q, enquanto que as variantes G51D e A53E têm efeito contrário. O impacto das mutações α S na taxa de fibrilação da proteína foi investigado usando métodos biofísicos, incluindo dicroísmo circular e colorimetria de varrimento diferencial. Os resultados corroboraram estudos anteriores, confirmando que os mutantes A30P, A53T, E46K exibem maior propensão à agregação, quando comparados com o peso de α S. Foi proposto que as fibrilas da forma

mutante A30P agem como sementes, acelerando a nucleação e a agregação, em comparação com a proteína nativa. Um estudo experimental que envolveu o tipo selvagem e mutantes A30P e A53T indicou que a α S forma agregados quando superexpressa em células de neuroblastoma humano. Outro estudo revelou que a α S agregada se liga especificamente às membranas, incluindo a membrana mitocondrial. A sobre-expressão de α S do tipo selvagem e/ou de mutantes A30P e A53T aumenta a agregação nas células e a afinidade da ligação à membrana, que é exacerbada durante o stresse oxidativo. As fibrilas formadas por cada mutante também exibem variações morfológicas, incluindo diferentes diâmetros, periodicidade e comprimento. (10,117–134)

2.3.2. Modificações pós traducionais

A proteína α S pode sofrer várias MPT, nomeadamente reações de fosforilação, nitração e ubiquitinação, envolvendo resíduos específicos de aminoácidos, que se encontram listadas na **Tabela 2.** (135–137)

Tabela 2 - Modificações pós traducionais da α S

<i>Tipo de MPT</i>	<i>Aminoácidos</i>
<i>Fosforilação</i>	S87, S129, Y125, Y133, Y136
<i>Ubiquitinação</i>	K6, K10, K12
<i>Nitração</i>	Y39, Y125, Y133, Y136

A fosforilação é a MPT mais comum na α S, especificamente nos seus resíduos de serina e tirosina. Estudos sobre as diferentes MPT identificadas indicaram que a fosforilação desempenha um papel importante na oligomerização de α S, fornecendo evidências de que a S129 fosforilada é a forma predominante de α S nos CL, com uma abundância de 90%, em comparação com a abundância de 4% observada em condições tidas como normais. Além da extensa fosforilação na S129, observa-se nos CL fosforilação em S87, Y125, Y133 e Y136, embora em menor grau. A fosforilação pode ser catalisada pela quinase recetora acoplada às proteínas caseína quinase (CK), *G protein-coupled receptor kinase* (GRK), LRRK2 e a *Polo-like Kinase* (PLK), as quais estão associadas a doenças degenerativas que envolvem a α S. Estudos mostram que a fosforilação da α S em S87 ocorre *in vivo*, sendo incrementada em sinucleinopatias. Contudo, o papel da

fosforilação da α S S87 na doença, nomeadamente a sua relação com o aumento direto da fibrilação ou deposição da proteína, através da fosforilação nesses blocos de resíduos ou como promotora da fibrilação da alfa sinucleína, não está ainda esclarecido. Foi observado em homogenatos do cérebro de mosca que os níveis de α S oligomérica aumentaram pela fosforilação no S129, mas diminuíram pela fosforilação no Y125. Os estudos indicam que a fosforilação em Y125 não induz a fibrilização da α S e o impacto da fosforilação em Y133 e Y136 na agregação de α S permanece por esclarecer. (135,138–145)

A ubiquitinação é a segunda MPT mais comum, ocorrendo nos resíduos de lisina, nomeadamente em K6, K10 e K12. Foi considerado que a ubiquitinação conduz à localização incorreta da α S e a uma fuga da degradação. A nitração é outra forma de MPT, envolvendo resíduos de tirosina, nomeadamente Y39, Y125, Y133 e Y136. Foi proposto que esta MPT conduz à formação de oligómeros de α S, alterando o seu estado conformacional, o que reduz a sua afinidade de ligação à membrana, podendo originar disfunção mitocondrial e apoptose celular. Foi também demonstrado que a nitração de Y39 pode prejudicar a capacidade de interação da α S com as membranas lipídicas. (146,147)

2.4. Formas patogénicas da proteína α S

A literatura científica descreve uma grande variedade de espécies α SO, com diferenças na estrutura, peso molecular e morfologia. Além da forma monomérica, acredita-se que a α S possa também existir nativamente na forma de dímero, trímero e tetramero. Embora a existência de espécies tetraméricas permaneça como assunto de debate na comunidade científica da especialidade, os estudos realizados indicam que estas formas exibem uma conformação α helicoidal, sendo mais resistentes à agregação. A deteção desta variedade de α SO depende do protocolos de preparação e purificação utilizado, verificando-se a existência de estruturas diversas, nomeadamente dímeros e α SO com mais de cem cadeias polipeptídicas e com morfologias diversificadas, que podem ser esféricas, elípticas, circulares, tubulares e planares. Além destas barreiras nos protocolos, a própria plasticidade conformacional da α S, a sua elevada concentração na sinapse e o grande número de processos em que está envolvida podem contribuir para a formação de diferentes espécies, com peso molecular elevado. Nas etapas iniciais

de agregação a população de intermediários α SO alterna de estrutura α -helicoidal para folha β . Durante os eventos estocásticos de auto-associação os conjuntos α S podem ser convertidos em oligômeros com capacidade para agregação, atuando como locais de nucleação de monómeros desdobrados e formando a diferentes espécies fibrilares. (98,104,148–152)

Estudos baseados em transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) e estudos aprofundados de *cross-linking* permitiram elaborar modelos representativos nos quais é proposto que diferentes espécies de α SO acumulam no processo de formação de fibrilas, como esquemas de vias on-fibrilares, sendo assumido que nem todos os α SO originam fibrilas. Assim, os α SO precursores da formação de fibrilas são designados por α SO da via *on-fibrilar* e os α SO que não participam na formação de fibrilas como α SO da via *off-fibrilar*. O conhecimento existente sobre estados conformacionais dos conjuntos α SO nas várias fases, incluindo os associados ao processo de fibrilogênese, é limitado. Os α SO constituídos por aproximadamente dez moléculas de α S monoméricas demonstraram promover fibrilação. As moléculas de α S em conformações inaptas para estabelecer interações estáveis no tempo e/ou interação complementar ficam fora da via de montagem, ou seja, precisam de se reagrupar, o que envolve habitualmente uma dissociação, para atingirem o estado fibrilar final. Assim, coexistem moléculas de α S em diferentes conformações e os conjuntos de vias *on* e *off-fibrilares* que as moléculas de α S povoam são igualmente importantes, representando uma sequência interconvertível de estados com taxas de interconversão que variem amplamente, dependendo das condições, a mais importante das quais é a concentração de monómero livre. (153,154)

Uma questão de interesse significativo é o mecanismo subjacente à transformação da α S solúvel em fibrilas insolúveis. *In vitro*, a cinética da formação de fibrila amiloide α S parece ser adequadamente descrita como uma reação de nucleação/polimerização que segue uma curva sigmoideal típica, sendo dividida em três estágios, a fase lenta, a fase de alongamento e a fase estacionária. (**Figura 2.3**) (100,155,156)

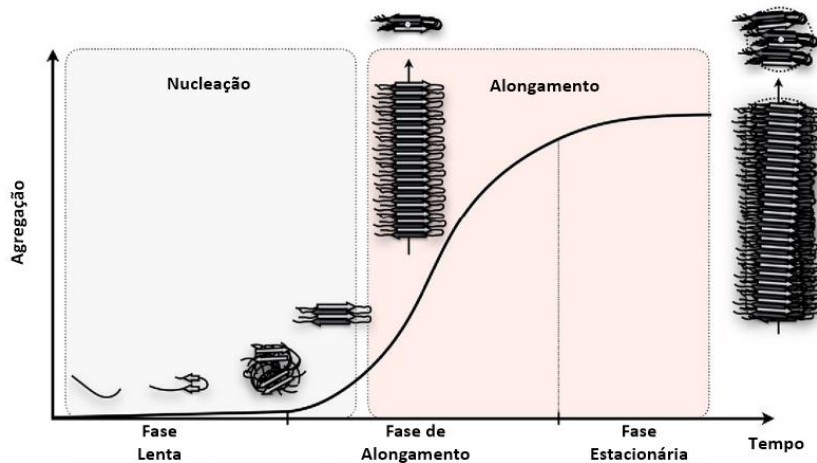


Figura 2.3 – Representação da cinética de agregação de α -sinucleína, caracterizada como uma reação de polimerização dependente de nucleação. Adaptado de (100).

Subsiste em todas as fases um equilíbrio dinâmico, em que diferentes conformações e estados de agregação coexistem simultaneamente. A reação começa por uma fase lenta, coincidente com o período em que os monómeros se organizam para formar núcleos de agregação. É uma fase acompanhada por grandes mudanças estruturais e representa a etapa limitante da velocidade da reação. A aceleração desta fase pode ser alcançada pela adição de “sementes”, que atuam como núcleos de agregação preformados. A fase subsequente é a de alongamento, uma fase em que as fibrilas amiloides crescem exponencialmente. Os núcleos formados, que são os menores agregados estáveis, crescem por incorporação de monómero nas extremidades das fibrilas, incorporação que se torna mais rápida e favorável do que o processo inverso, de dissociação de monómeros. Este estágio é termoquimicamente favorável devido à compactação da proteína, com diminuição da superfície total exposta. Posteriormente, a privação de monómeros leva ao declínio na taxa de polimerização, culminando na fase estacionária. Nesta fase, a maioria dos polipeptídeos encontra-se organizada em fibrilas, estabelecendo-se um equilíbrio entre estado agregado e monómero livre. (98,100,155,156)

A α S auto associam-se em oligómeros, originando as fibrilas amiloides, muito compactas e enriquecidas na estrutura da folha β . Além da α S, os CL contêm ubiquitina, calbindina, proteínas do complemento, actina, tubulina, MAP-1 e MAP-2, Pael-R e sinfilina-1. Os CL são inclusões citoplasmáticas esféricas, que apresentam geralmente entre 3 a 25 nm de diâmetro, com elementos fibrilares projetados para o exterior e um

núcleo granular denso, e que podem ser coradas eosinofílicamente. O conhecimento mais aprofundado da estrutura molecular de fibrilas ou oligómeros requer mais estudos, com recurso a técnicas e ferramentas de análise avançadas. Estudos de RMN sugerem que o núcleo das fibrilas α S varia principalmente entre os resíduos 30 a 38 e 95 a 110, o que compreende a região NAC e parte do domínio NT, que são montados em cinco a seis linhas β , separadas por várias rotações. As regiões NT e CT, que parecem não estruturadas, flexíveis e expostas ao solvente, estão fora desse núcleo. A espectroscopia de RMN e o TEM também foram aplicados com sucesso no estudo da estrutura das fibrilas α S, tendo permitido identificar um domínio semelhante à chave grega, recorrente nas fibrilas α S. (98,103,104,133,152,157)

A toxicidade relativa de oligómeros ou fibrilas de α S permanece um assunto de intensa discussão. Considera-se que ambas as formas são tóxicas, porém, apesar de a presença de CL ser característica da DP, as evidências convergem no sentido de mostrar que os oligómeros são particularmente mais citotóxicos. Estudos *post-mortem* revelaram que a abundância de CL, compostos por fibrilas α S fortemente agregadas, não é preditiva de variáveis clínicas importantes, como a duração ou a gravidade da doença, indicando que, embora existam evidências convincentes de um papel central da α S nas sinucleinopatias, os CL podem não ser diretamente responsáveis pelas características clínicas. Estas observações estimularam o interesse nas formas oligoméricas, que precedem a formação de fibrilas e que podem ser mais relevantes que estas na patogénese. Foi observado um efeito neurotóxico significativo quando *C. elegans* e *D. melanogaster* foram expostos a α SO produzidos *in vitro*. As espécies de α SO foram detetadas em neurónios degenerativos de pacientes com DP, vinculando o α SO mais diretamente à degeneração neuronal do que os CL. A rápida difusão e acumulação a longa distância de α S monomérica e α SO não conduzem necessariamente a efeitos patológicos, mas podem aumentar significativamente a carga neuronal durante a patogénese de doenças neurodegenerativas. A perda dopaminérgica mais grave na substância negra é observada em animais com as variantes α S que formam oligómeros (E57K e E35K), enquanto as variantes α S que formam fibrilas muito rapidamente revelam menor toxicidade. A acumulação de α SO pode interferir com as vesículas sinápticas e induzir alterações sinápticas na DP. A possibilidade de fragmentação das

fibrilas é considerada uma característica importante para determinar a propagação. (3,158–165)

2.5. Mecanismos de toxicidade da α S

Vários estudos indicam que, sob várias condições fisiológicas, populações heterogêneas de formas oligoméricas de α S coexistem em equilíbrio. Foram também divulgadas evidências de que a neurotoxicidade associada às várias formas patológicas da α S está relacionada com a alteração de vários processos fisiológicos e estruturas, como seguidamente exemplificamos (**Figura 2.4**).

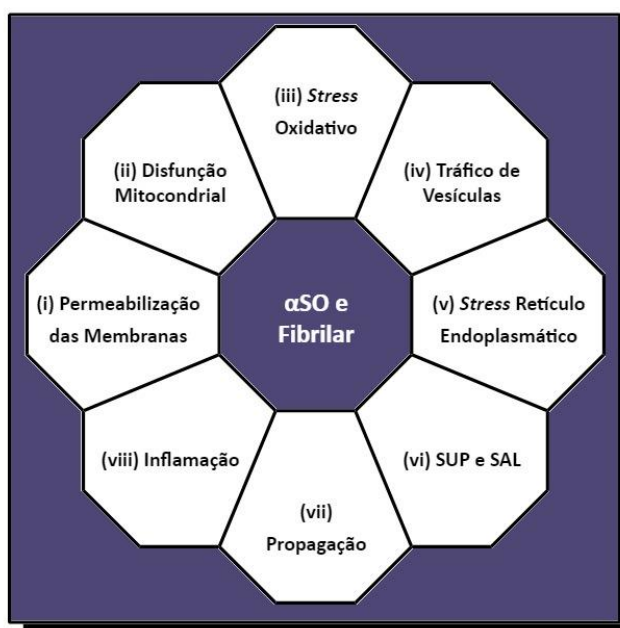


Figura 2.4 – Mecanismos de toxicidade da α SO e fibrilar.

(i) Alguns tipos de α SO induziram a morte celular através da permeabilização da membrana, em que as α SO interrompem a bicamada lipídica com formação de poros, promovendo um aumento no influxo de iões do espaço extracelular, como o Ca^{2+} . (ii) A associação de formas tóxicas de α S às mitocôndrias pode interferir seletivamente com o complexo mitocondrial I, resultando em atividade reduzida do mesmo, com conseqüente aumento da produção de ERO e incremento da mitofagia. O aumento da expressão de α S em células cultivadas e em *C. elegans* estimulou a mitofagia, por ligação da α S às mitocôndrias. (iii) As mitocôndrias são muito sensíveis ao *stress* oxidativo induzido pela α S, do tipo selvagem e mutada. (iv) Os α SO podem interferir no tráfego de vesículas, como inibidores da libertação de neurotransmissores, como a dopamina,

promovendo a redução da excitabilidade neuronal e a diminuição do disparo sináptico. Evidências sugerem que, embora não causando morte celular, a disfunção sináptica induzida pela agregação pré-sináptica de α S causa neurodegeneração. (v) Algumas formas tóxicas de α SO acumulam-se no ER provocando *stress* e perturbando as suas funções, incluindo as associações ER-mitocôndria e os mecanismos de transporte vesicular. (vi) Foram ainda reportadas evidências de que as formas tóxicas também interferem com os dois principais sistemas de degradação de proteínas, o SAL e o SUP. A α S parece estar ligada a outras formas genéticas da DP, como aquelas ligadas a mutações no GBA ou LRRK2, possivelmente através de efeitos comuns no SAL. A sobre-expressão de α S em células neuronais pode conduzir à disfunção proteasomal. A dissociação farmacológica de α SO restaurou a função proteasomal e reduziu o número de proteínas poli-ubiquitinadas em células intactas. (vii) A propagação de formas tóxicas de α SO, de fibrilas e de fragmentos das fibrilas, desencadeia uma amplificação da agregação em outras células, com promoção dos mecanismos tóxicos anteriormente descritos. (viii) A libertação de α S agregada na substância negra ativa a microglia, com produção de mediadores pró-inflamatórios, que promovem a neurodegeneração da substância negra de forma persistente e progressiva na DP. (3,4,166–171,9,11–14,45,124,125)

Página intencionalmente deixada em branco

3. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS COM FOCO NA PROTEÍNA α S

Não existe atualmente nenhuma terapia com boa evidência de neuroproteção para o tratamento da DP, todavia existem várias abordagens em estudo com o objetivo de minimizar os efeitos tóxicos da agregados de α S. Estas estratégias podem ser divididas em cinco categorias, com base no mecanismo de ação (**Figura 3.1**): (i) Reduzir a produção de α S; (ii) diminuir a agregação intracelular de α S; (iii) potenciar a degradação intracelular de α S; (iv) reduzir a disponibilidade de agregados de α S extracelular; e (v) inibir a captação neuronal de α S extracelular. (172–176)

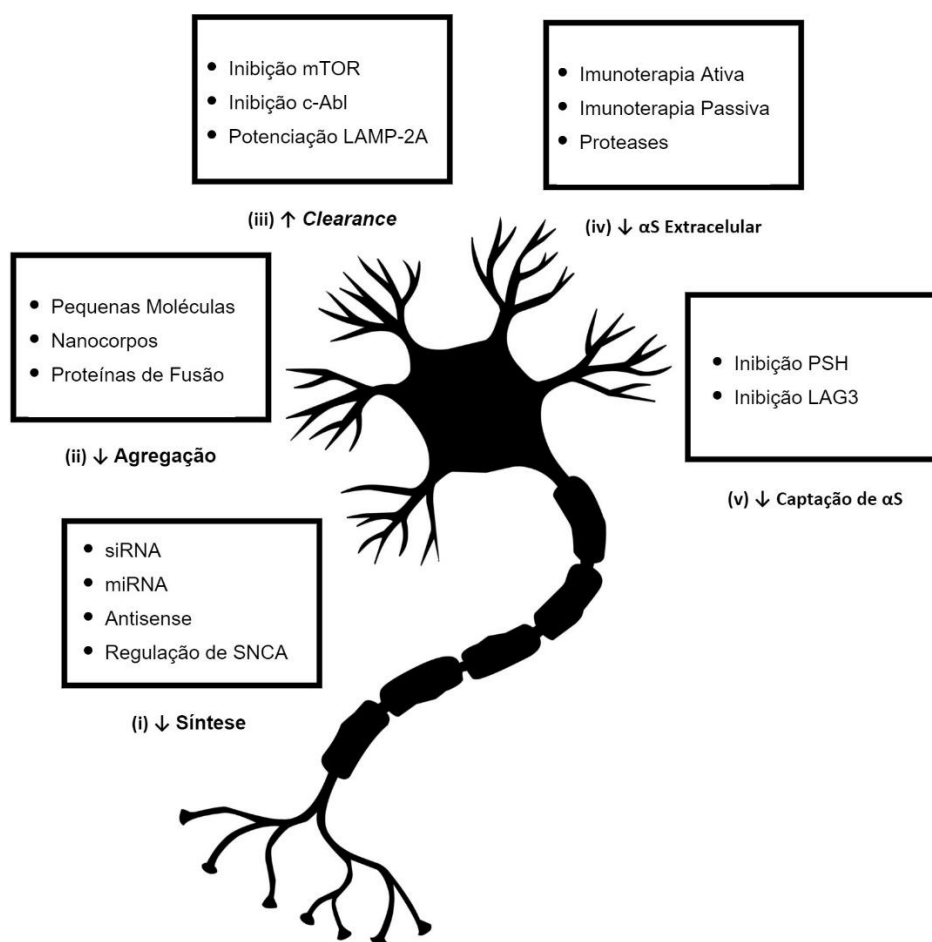


Figura 3.1 - Estratégias terapêuticas para o tratamento da DP com foco na proteína α S.

3.1. Redução da produção de α S

A observação de que a duplicação e a triplicação do gene SNCA causa DP constituiu uma premissa sólida para estimular o desenvolvimento de soluções terapêuticas que reduzam a expressão de α S. Foram observadas semelhanças entre a α S e a PrP. As proteínas priônicas de envelhecimento incorreto podem induzir a transformação conformacional da proteína celular normal, levando ao seu

enovelamento incorreto. Desta forma, a redução dos níveis de α S do tipo selvagem no hospedeiro representa a redução do substrato desta reação. Os α SO não induzem a formação de agregados ou neurodegeneração quando injetadas em murganhos mutantes nulos de α S. A redução dos níveis citoplasmáticos de α S reduz o risco de a proteína adotar uma conformação anormal e gerar α SO. Para viabilizar ensaios clínicos que permitam a prova do conceito subjacente a esta estratégia é necessário determinar o grau seguro de *knockdown* pré-clínico por forma a impedir a acumulação de α S sem prejudicar as funções fisiológicas. Verificou-se que reduções de α S endógena superiores a 85% na substância negra de ratos e primatas não humanos normais com recurso a vetores virais conduziram à degeneração do sistema nigroestriatal. Adicionalmente, estas terapias devem ser direcionadas especificamente para o cérebro, de modo a não reduzirem os níveis de α S nos tecidos periféricos. (118,134,177–181)

As abordagens que visam atuar sobre a produção de α S recorrem a modificações no processo de tradução de mensageiros RNA (mRNA) com oligonucleotídeos *antisense* e RNA de interferência (RNAi), como *micro RNA* (miRNA), *small interfering RNA* (siRNA), e *short hairpin RNA* (shRNA), bem como alterações da transcrição do gene SNCA. (172,179,182–184)

Foram efetuados estudos que envolveram a inibição da expressão de α S endógena na substância negra de ratos adultos pela entrega mediada por vírus adeno-associado de shRNA tendo em vista o transcrito de SNCA endógeno. A diminuição da α S em 35% não afetou a função motora nem causou degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra em ratos controle. Em contrapartida, em ratos expostos à rotenona, os *déficits* motores progressivos foram substancialmente atenuados contralateralmente ao *knockdown* de α S. A infusão direta de siRNA no hipocampo de murinos reduz significativamente a expressão do SNCA após uma infusão de duas semanas. Em outro estudo, realizou-se infusões crônicas de siRNA diretamente na substância negra esquerda, contra os mRNA de α S em macacos-esquilo. Os resultados compararam os níveis de mRNA da α S e proteína no hemisfério infundido versus o lado direito não tratado e revelaram uma supressão significativa de 40 a 50% da expressão da α S. (172,179,182)

A administração de oligonucleotídeos antisense projetados contra o RNA SNCA em animais roedores, reduziu a produção de α S, diminuiu a deposição e levou a uma propagação mais lenta. Informações divulgadas sobre o sucesso de um estudo de fase III de terapia oligonucleotídica antisense na atrofia muscular espinal e também dos resultados de segurança e tolerabilidade obtidos num estudo fase I de terapia oligonucleotídica antisense na doença de Huntington alimentaram otimismo para terapias antisense em condições neurológicas. (183,185,186)

Além da modificação do processo de tradução de mRNA, outra abordagem proposta foi a modificação da transcrição do SNCA. Numa análise de alto rendimento de uma biblioteca de medicamentos e produtos naturais da FDA direcionada à expressão gênica endógena de α S, descobriu-se que o recetor β 2 adrenérgico (ADRB2) é um regulador do gene SNCA. Mecanicamente, foi proposto que os agonistas adrenérgicos β 2 (AA- β 2) modulam a transcrição de SNCA através da acetilação da histona 3 e da lisina 27 nas regiões promotoras e potenciadoras do gene SNCA. Foram divulgadas evidências de que o uso de salbutamol, utilizado no tratamento de asma, está associado a um risco menor de desenvolver DP, de acordo com estudos realizados numa grande coorte epidemiológica norueguesa. Inversamente, o uso de propranolol, um antagonista β 2, revelou aumentar o risco de DP. O clenbuterol, que rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica, conduziu à redução da expressão de α S na substância negra de murganhos do tipo selvagem e revelou efeito protetor nos neurónios hipotalâmicos da toxicidade do MPTP. Estas evidências estimulam estudos adicionais sobre os AA- β 2 como potenciais fármacos neuroprotetores no tratamento da DP. (184)

3.2. Inibição da agregação

Sendo possível inibir a agregação de α S, a sua função normal poderá ser mantida e a toxicidade resultante da dobragem incorreta pode ser evitada. Foram feitos estudos para identificar compostos que inibem a agregação de α S, visando controlar a agregação de α S no SNC e também no SNP, por meio de pequenas moléculas, *chaperons* ou anticorpos como base para o desenvolvimento das estratégias terapêuticas para ligar e inibir diretamente agregados. (187–190)

A Neuropore Therapies, em colaboração com a UCB Pharma, estão a desenvolver a molécula NPT200-11 (**Figura 3.2**) que já completou a fase 1 de ensaios clínicos no início de 2016. No entanto, os dados deste estudo não estão disponíveis e outros planos para o desenvolvimento deste composto não foram anunciados. Foi relatado que o NPT200-11 evita a formação de agregados oligoméricos tóxicos e melhora as medidas comportamentais, neuropatológicas e bioquímicas no modelo de murganho transgênico com sobre-expressão de α S. Até ao momento, não foram reportados problemas de segurança clinicamente significativos e são aguardados estudos de prova de conceito que testem a eficácia e a segurança a longo prazo, considerando-se que a molécula apresenta o benefício potencial de atingir com maior probabilidade o cérebro que os anticorpos monoclonais. (189,191–193)

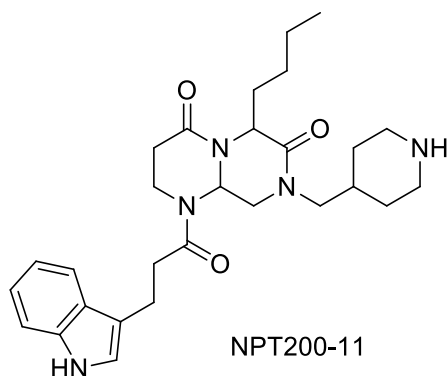


Figura 3.2 – Representação da estrutura química do NPT200-11, uma pequena molécula com possíveis propriedades inibidoras da agregação de α S. <https://www.medkoo.com/products/33420>

Com o objetivo de reduzir a agregação intracelular de proteínas na DP foram desenvolvidos nanocorpos que ocorrem por exemplo na família de mamíferos *Camelidae*. Estas nanoestruturas podem ser expressos intracelularmente e direcionados a um antígeno específico em várias localizações subcelulares, como o núcleo, RE e mitocôndria, proporcionando um tipo de terapia genética. As regiões variáveis FV responsáveis pela especificidade do anticorpo podem ser expressas separadamente da imunoglobulina completa, mantendo muitas vantagens dos anticorpos convencionais, incluindo alta especificidade e afinidade pelos epítopos alvo. Os nanocorpos são pequenos fragmentos de anticorpos, com 140 a 250 aa de comprimento, com um peso molecular aproximado de 15 kDa. Ao contrário dos scFV, os nanocorpos apresentam solubilidade elevada, podendo atravessar a barreira hematoencefálica e penetrar nas células, o que encoraja o seu desenvolvimento para ligação à α S monomérica

intracelular e inibição da oligomerização. Os nanocorpos podem ser eficientemente clonados em bactérias ou leveduras a um custo relativamente baixo e serem projetados para expressão intracelular. Estudos *in vitro* demonstraram que nanocorpos podem ligar-se especificamente às diferentes formas de α S, nas regiões específicas NAC e CT de α S. O nanocorpo VH14 tem especificidade alvo para a região NAC da α S, que é conhecido por ser propenso a agregação, e os NbSyn2 e NbSyn87 tem especificidade alvo tanto para o CT de α S quanto para as formas fibrilares. O NbSyn87 e NbSyn2 ligam-se com afinidade nanomolar a epítomos distintos dentro do domínio CT da α S solúvel e estes epítomos demonstraram ainda estar acessíveis quando a α S se converte em sua estrutura fibrilar. Ambos os nanocorpos inibem a formação de fibrilas α S, e reduzem a toxicidade celular induzida por oligómeros *in vitro* ao promoverem uma conversão conformacional rápida de oligómeros mais estáveis para oligómeros menos estáveis de α S. A entrega gênica mediada por vetor viral de VH14*PEST e NbSyn87*PEST pode proteger contra a degeneração nigroestriatal em ratos injetados intranigralmente com um vetor viral que superexpressa α S. De facto, os dois intracorpos VH14*PEST e NbSyn87*PEST eliminaram completamente o α S agregado, restauraram a dopamina estriatal e melhoraram a função motora. Estes dados sugerem que os intracorpos podem ser eficazes para diminuir os níveis de α S solúvel e, assim, impedir a agregação de α S. Um desafio para a aplicação clínica de intracorpos para intervenção terapêutica será como atingir altos níveis no SNC por períodos prolongados. (188,194–198)

A Proclara Bioscience criou o NPT088, uma proteína de fusão que combina a imunoglobulina humana igG1 e um *general amyloid interaction motif* (GAIM). A evidência pré-clínica mostra efeitos em ambos os agregados de proteína implicados na doença de Alzheimer, amiloide- β ($A\beta$) e Tau. Com base nos estudos para doença de Alzheimer a indicação para DP encontra-se também em avaliação. Quando testado em murganhos com superexpressão de α S, é relatado que reduz a agregação de α S e protege os neurónios nigroestriatais. Posteriormente realizou-se um estudo de segurança e tolerabilidade de doses múltiplas de NPT088. Encontra-se concluído o estudo de Fase 1b, no qual o NPT088 foi geralmente seguro e bem tolerado. (173,187,199,200)

3.3. Potenciação da autofagia

A autofagia desempenha um papel importante na degradação de agregados intracelulares de α S. O aprimoramento direcionado dos processos autofágicos levará ao aumento da depuração do α S patológico. Não apenas a acumulação intracelular de α S agregada pode potencialmente danificar ou desabilitar o neurónio hospedeiro, mas também a secreção de α S agregada sugeriu-se que, no espaço extracelular, promovesse a propagação de célula a célula da patologia da α S para as células vizinhas. (174,201)

A atividade do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) é muito importante para a autofagia. Quando mTOR é ativado por fosforilação, a autofagia é inibida. Assim, inibidores do mTOR, como a rapamicina, melhoram a autofagia, contrariam a agregação de α S e reduzem os seus efeitos neurotóxicos associados em vários modelos celulares e animais. No entanto, a rapamicina tem elevada toxicidade relacionada com a falta de especificidade e ação imunossupressora, o que limita o seu potencial como candidato a medicamento modificador na DP. São necessários mais estudos sobre inibidores do mTOR que exibam menor toxicidade. (201–205)

Outra estratégia para alcançar a inibição do mTOR funciona por redução do transporte de piruvato para as mitocôndrias usando um inibidor do transportador de piruvato mitocondrial (TPM) como o MSDC-0160. Esta molécula foi originalmente desenvolvida para o diabetes tipo II, mas também exerce alterações no metabolismo mitocondrial por inibição do TPM, o que em seguida resulta em uma inibição eficaz de mTOR com regulação positiva da autofagia nos neurónios. A inibição do TPM com o MSDC-0160, melhorou a autofagia em um modelo de toxicidade induzida por α S em um modelo de *Caenorhabditis elegans*, com diminuição da toxicidade, o que ocorreu por inibição de mTOR. O MSDC-0160 aprimorou também a autofagia, protegendo os neurónios dopaminérgicos da SN em um modelo de murganhos genético de DP. A inibição do TPM demonstra desta forma, poder ser usada como uma estratégia para reduzir a agregação de α S e o MSDC-0160 com perfil de segurança favorável e boa capacidade de aceder ao SNC em humanos, é um candidato ao desenvolvimento clínico na DP. (206)

Uma abordagem que pode resultar em aumento da autofagia da α S de má conformação é a utilização de inibidores da Abelson tirosina quinase (c-Abl). O gene ABL1 é um proto-oncogene que origina uma proteína tirosina quinase não recetora, em que muitos inibidores específicos de c-Abl foram desenvolvidos como agentes anti tumorais e que se encontram aprovados no tratamento de várias formas de leucemia. Além disso, a inibição da c-Abl foi validada como uma abordagem racional para o desenvolvimento terapêutico na DP, com base em dados de validação de alvos humanos e experimentais. Vários estudos mostraram que a atividade c-Abl é aumentada no tecido cerebral de pacientes com DP e que esse aumento da atividade c-Abl leva a um aumento a jusante na fosforilação e agregação de α S. Alguns estudos sugerem que os efeitos são sobre a função mitocondrial, modificações pós-traducionais da α S ou aprimoramento das vias autofágicas. Embora os mecanismos precisos de ação ainda sejam debatidos, as evidências pré-clínicas de eficácia foram suficientemente convincentes para que se realizasse um pequeno estudo de segurança do inibidor de c-Abl nilotinibe. O nilotinibe foi testado em um estudo de segurança não cego, sem um grupo controle com placebo, em pacientes com DLB, DP e demência, com relatos de alguma melhoria na função motora em alguns casos, nos 6 meses após o início do tratamento, e que é seguro e tolerável em doses muito inferiores às usadas contra o cancro. No entanto, os inibidores da c-Abl estão limitados pela sua baixa absorção através da barreira hematoencefálica e à pequena janela terapêutica para uso crônico na DP, havendo necessidade de estudar outros inibidores com maior penetração na barreira hematoencefálica e que exibam especificidade pela c-Abl. (174,207–211)

A degradação do α S monomérico solúvel envolve principalmente a entrega de α S mediada por Hsc70 aos lisossomas via ligação à proteína de membrana 2A associada a lisossomas do tipo 2A (LAMP-2A), enquanto a degradação do α S agregado envolve a formação de autofagossoma com fusão lisossômica subsequente. Verificou-se que quando a expressão de α S neuronal é aumentada como resultado de lesão ou superexpressão transgênica em murghanos, há elevação concomitante da LAMP-2A. O aumento da autofagia mediada por chaperões pela superexpressão mediada por vetor viral de LAMP-2A resultou em níveis mais baixos de α S com efeitos benéficos na neurotoxicidade α S e sobrevivência dopaminérgica. A superexpressão de LAMP-2A leva

à regulação positiva da autofagia mediada por chaperona em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, neurónios corticais primários de ratos in vitro e neurónios dopaminérgicos da SN in vivo. (212,213)

3.4. Redução da disponibilidade de agregados extracelulares de α S

A descoberta da existência de α S extracelular levou ao desenvolvimento de terapias que diminuem os níveis de α S extracelular e as suas formas tóxicas. As imunoterapias ativas e passivas encontram-se entre as abordagens terapêuticas mais promissoras e os anticorpos que muito dificilmente entram nas células, atuam sobre estas espécies tóxicas extracelulares de α S e promovem sua eliminação por meio de captação autofágica e microglial. Alguns destes anticorpos encontram-se atualmente em ensaios clínicos. (175,214,215)

O PRX002 é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado, derivado do anticorpo monoclonal murino 9E4, direcionado contra epítomos próximos ao CT da α S. Em animais transgênicos que superexpressam α S, o anticorpo murino do PRX002 reduz a patologia da α S, neurodegeneração e protege contra o declínio das funções motoras e cognitivas. Em 2015, iniciaram-se os primeiros ensaios clínicos com um candidato terapêutico imunológico passivo, o PRX002 desenvolvido por Prothena, para o tratamento da DP com atuação sobre a α S extracelular. Na fase I mostrou-se que a imunização com este anticorpo é segura e bem tolerada quando infundida em doses únicas em voluntários humanos. Foi testado em ensaios clínicos de Fase 1a e 1b. No estudo de fase 1a, os níveis séricos livres de α S foram reduzidos em 96,5%. No estudo de Fase 1b, realizado em pacientes com DP, a redução os níveis séricos livres de α S foi replicada. Neste estudo de seis meses, os pacientes receberam três doses mensais (infusão intravenosa uma vez a cada 28 dias) de PRX002 ou placebo e foram seguidos por um período de observação adicional de três meses. Não foram observados eventos adversos graves ou toxicidades limitantes da dose, e o PRX002 demonstrou farmacocinética aceitável e penetração no SNC. Estes resultados permitiram à Prothena avançar para um estudo de fase 2 em pacientes com DP inicial em colaboração com a Roche com o anticorpo PRX002/RO7046015. (175,216–220)

A Biogen encontra-se a desenvolver um anticorpo monoclonal BIIB054 direcionado contra α S de imunoterapia passiva. Em contraste com PRX002/RO7046015, BIIB054 é um anticorpo monoclonal IgG1 totalmente humano direcionado a um epítipo próximo ao NT da α S. O BIIB054 foi originalmente isolado de linhas de células B derivadas de indivíduos neurologicamente saudáveis. O BIIB054 é altamente seletivo para formas agregadas, com muito pouca afinidade de ligação para a α S monomérica. Um estudo de fase 1 de dose ascendente única de BIIB054 em voluntários saudáveis e pacientes com DP encontra-se concluído. O BIIB054 foi bem tolerado em doses únicas de até 90 mg/kg e apresentou meia-vida sérica de 28 dias. Doses únicas de BIIB054 até 45 mg/kg foram bem toleradas em pacientes com DP, e o perfil farmacocinético foi semelhante ao observado em voluntários saudáveis. O anticorpo foi bem tolerado em voluntários saudáveis, até à dose mais alta testada, tem um perfil farmacocinético favorável e foi detetável no LCR dentro do intervalo esperado para anticorpos monoclonais. Esses dados forneceram suporte para a continuação do programa de imunoterapia da Biogen direcionado para α S e um estudo multinacional de fase 2 de BIIB054 em pacientes com DP diagnosticados foi iniciado. (214,221–223)

Com recurso à vacina AFFITOPE em um estudo pré-clínico utilizando murganhos com DP transgênica mThy-1- α S demonstrou-se que a vacinação foi eficaz em provocar uma alta resposta de anticorpos no LCR e no plasma com o anticorpo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. A empresa Affiris AG está a desenvolver a vacina com um peptídeo transportador (AFFITOPE® PD03A) de imunoterapia ativa que contém um peptídeo que imita a α S para provocar uma resposta de anticorpo α S. Esta vacina já terminou a fase clínica I de desenvolvimento que avalia a tolerabilidade e a segurança da administração subcutânea repetida de duas doses, 15 e 75 mg de AFFITOPE PD03A a pacientes com DP precoce. Ambas as doses foram bem toleradas, a maioria dos eventos adversos foram reações leves e locais, no entanto, o AFFITOPE® PD03A exibiu uma resposta imune dependente da dose e do tempo contra o próprio peptídeo e reatividade cruzada contra α S, bem como reativação de anticorpos após a imunização de reforço. (215,224,225)

Além dos programas mais avançados de imunoterapia, outras abordagens para reduzir a α S extracelular foram testadas em animais experimentais, inclusive um modelo

não imunológico relacionado com a superexpressão da serina protéase kalekrein 6 (KLK6 ou neurosina). Foi sugerido que esta proteína degrade α S extracelular em modelos que superexpressam α S ao desencadearem uma cascata proteolítica com envolvimento de metaloproteases. (226,227)

3.5. Captação celular de α S

A presença de espécies de α S de conformação alterada no espaço extracelular pode levar à propagação da DP entre células quando os neurónios próximos captam estes pequenos agregados de α S. O mecanismo pelo qual agregados proteicos de α S se ligam e entram nas células para desencadear a formação de fibrilas intracelulares é desconhecido. Num estudo foi examinada a internalização de monómeros, oligómeros e fibrilas extracelulares, em células neuronais e a sua subsequente degradação. A internalização da α S monomérica e fibrilar pode ser inibida pela baixa temperatura ou pela expressão de uma dinamina-1 mutante dominante negativa-K44A, sugerindo a internalização mediada por endocitose. Em contraste, a internalização da α S monomérica não foi afetada pela temperatura fria e pela expressão da dinamina-1 K44A, consistente com a translocação direta através da membrana plasmática. Aparentemente, as fibrilas amiloides de α S, ligam-se aos proteoglicanos de sulfato de heparano (PSH) na superfície celular e são absorvidas por endocitose. Assim sendo, moléculas que interrompem os PSH, como a heparina ou hidrato de cloral, demonstraram reduzir a captação de α S em culturas de células. O desenvolvimento de inibidores específicos dos PSH, que não interferem nos processos celulares vitais pode ser um caminho a seguir para retardar a propagação da patologia da α S. Na tentativa de se identificar um potencial recetor necessário à captação de α S oligomérica, fibrilas pré formadas ou fibrilar extracelular, foi identificado na superfície dos neurónios, o recetor do gene 3 de ativação de linfócitos (LAG3). O recetor LAG3 liga com alta afinidade protofibrilas, mas não os monómeros de α S, promovendo a sua captação, transmissão e toxicidade endossómica. A co-imunoprecipitação também sugere que o PFF α S patológico se ligue especificamente ao LAG3. LAG3 é específico para o PFF de α S. A internalização do PFF de α S envolve LAG3 porque a exclusão de LAG3 reduz a endocitose do PFF de α S. Em uma série de testes em cultura de células e modelos animais, verificou-se que inibir o recetor LAG3 ao aplicar anticorpos contra este recetor, inibiu

substancialmente o transporte de protofibrilas extracelulares de α S e a subsequente disseminação de agregados patológicos, e a toxicidade que a acompanha. A transmissão de neurônio a neurônio da α S patológica e a patologia e neurotoxicidade que a acompanham são substancialmente atenuadas pela exclusão de LAG3 ou por anticorpos para LAG3. A falta de LAG3 também atrasou substancialmente a perda de neurônios dopaminérgicos, bem como déficits bioquímicos e comportamentais *in vivo*. Descobrimos que a transmissão patológica e a toxicidade da α S é iniciada pela ligação ao LAG3 e que a transmissão da α S patológica envolve a endocitose do PFF α S exógena pelo envolvimento do LAG3 nos neurônios. A depleção de LAG3 ou anticorpos para LAG3 reduz substancialmente a patologia posta em movimento pela transmissão de α S patológica. A identificação de LAG3 como uma proteína de ligação a P-sinucleína PFF fornece um novo alvo para o desenvolvimento de terapêuticas projetadas para retardar a progressão da DP e α -sinucleinopatias relacionadas. Desta forma, o recetor LAG3 é um potencial alvo para a criação de novas terapias com recurso à imunoterapia ou pequenas moléculas, de forma a impedir a propagação de α S. Ainda não se sabe se o LAG3 é um bom alvo terapêutico, não está clara a importância da captação quantitativa mediada pelo recetor LAG3 de espécies patogênicas de α S na doença. Mesmo que este não seja o recetor principal, foram descobertas proteínas adicionais que estão envolvidas na captação de formas tóxicas de α S na superfície dos neurónios e que podem constituir alvos terapêuticos interessantes para a DP. (26,228–230)

Página intencionalmente deixada em branco

4. CONCLUSÕES

A doença de Parkinson apresenta uma elevada prevalência entre as doenças neurodegenerativas e a sua incidência está a aumentar de forma acentuada devido ao envelhecimento da população mundial. Trata-se de uma patologia multifatorial, com uma componente genética, que se estima representar até 10% dos casos, e uma componente não genética, em que geralmente a causa da doença é desconhecida. Os avanços genéticos contribuíram para a conceptualização de que a DP compreende vários distúrbios neurodegenerativos, com sobreposição clínica e patológica. Muitas das formas familiares de DP exibem características clínicas que são consideradas atípicas em relação à DP idiopática, como início jovem, distonia e ocorrência precoce de demência. A DP pode ser desencadeada por alterações em processos fisiológicos que conduzem a modificações na proteína central αS , com formação de espécies tóxicas, bem como por alterações na αS e sua concentração, que levam igualmente à formação de espécies tóxicas, com efeitos negativos sobre os processos fisiológicos celulares. Desta forma, verifica-se a existência de uma relação entre a αS e os processos fisiológicos desencadeadoras de círculos viciosos, com consequente degeneração dos neurónios dopaminérgicos. Foi também demonstrado que algumas espécies tóxicas se propagam entre células, dando continuidade a estes círculos. As alterações que ocorrem a nível celular são muito complexas. Constantemente surgem novas propostas de mecanismos celulares desencadeadores desta doença, sendo necessárias constantes revisões dos mesmos. Em relação às terapias atuais, não existem medicamentos que retardem o curso da doença, com exceção da nova molécula safinamida que apresenta alguma evidência de neuroproteção. O tratamento convencional de administração oral de levodopa apenas melhora os sintomas locomotores, sem diminuir a progressão da doença. Acresce que o efeito terapêutico diminui com o uso prolongado e com doses mais altas do fármaco, enquanto a toxicidade e os efeitos colaterais crescem em intensidade.

A αS é uma pequena proteína intrinsecamente desordenada e com elevada flexibilidade conformacional que é bastante influenciada pelo ambiente circundante. Estão descritas várias alterações na αS monomérica, como mutações pontuais, truncamentos e MPT, que levam a desequilíbrios entre os vários estados

conformacionais, com conseqüente formação de diferentes oligómeros e fibrilas tóxicas. A literatura científica descreve uma grande variedade de espécies α S, com diferenças na estrutura, peso molecular e morfologia. A elevada flexibilidade conformacional está relacionada com a grande variabilidade de funções que a proteína executa, o que pode contribuir para a formação de diferentes espécies, de peso molecular elevado. A variedade obtida depende também dos diferentes protocolos de preparação e purificação, sendo necessária mais investigação para se obter um entendimento completo e confiável das estruturas moleculares de oligómeros e fibrilas. Estas barreiras, impostas pelas limitações da capacidade técnica e do conhecimento disponível, dificultam o desenho racional de novos fármacos. Ainda não é consensual qual das formas, a α SO ou a fibrilar, é a mais tóxica. A evidência aponta para que ambas sejam neurotóxicas, embora os oligómeros estejam possivelmente implicados no colapso da homeostase neuronal e os estados fibrilares sejam mais eficientes na propagação através de um mecanismo semelhante a um prião, embora nenhum caso de transmissão da DP entre humanos tenha sido descrito até ao momento, razão pela qual a DP não pode ser descrita como uma doença priónica. Falta, pois, conhecimento mais aprofundado acerca das espécies tóxicas, para permitir a sua utilização como alvos terapêuticos e de diagnóstico. A relação mecanicista entre oligómeros e fibrilas também carece de mais acurada caracterização, tanto em relação à conversão de oligómeros em fibrilas como aos mecanismos de potencial dissolução de fibrilas em oligómeros. Sabemos pouco sobre as características conformacionais dos conjuntos α SO nas etapas iniciais da fibrilogênese. Compreender como o α S progride através de seu complexo cenário de dobragem é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias que possam impedir eventos de dobramento incorretos, inibir a formação de agregados tóxicos e promover a sua remoção.

Apesar de a interrupção/inibição da agregação de α S surgir como via potencial para o tratamento da DP, a abordagem que recorre a moléculas inibidoras da agregação tem de superar a barreira da existência concomitante de várias formas patogênicas da α S. Os resultados dos ensaios clínicos de fase I da molécula NPT200-11 não estão disponíveis e não foram anunciados novos planos para o seu desenvolvimento. Por outro lado, existe outra estratégia de combate à agregação de α S, em que o objetivo é

a desmontagem dos agregados tóxicos. A desagregação de proteínas amiloides ocorre através do sistema normal de homeostase e é regulada pela ação concertada de múltiplas proteínas *chaperons* complexadas, de resposta ao *stress* celular. Outra abordagem recorre à imunologia, com utilização de nanoanticorpos, sendo estes diferentes dos anticorpos tradicionais, que só podem atingir alvos extracelulares. Podem ser expressos intracelularmente como intracorpos e exercem efeitos terapêuticos mais específicos. Um desafio para a aplicação clínica de intracorpos para intervenção terapêutica será como atingir níveis terapêuticos no SNC, por períodos prolongados. Ao contrário das restantes imunoterapias, os intracorpos exigem a entrega direta no SNC, usando vetores virais. Dada a existência de multiplicações no gene SNCA, que originam a DP, recorrer a estratégias que diminuam a produção de αS pode impedir a agregação e resgatar a função e a viabilidade das populações neuronais. O sucesso de um estudo de fase III usando terapia oligonucleotídica antisense na atrofia muscular espinal e informação positiva sobre os resultados de segurança e especificidade com terapia antisense no estudo fase I da doença de Huntington alimentam o otimismo relativamente à utilização de terapias antisense em condições neurológicas. Todavia, um desafio para o desenvolvimento destas terapias está relacionado com o grau de *knockdown* necessário para impedir significativamente a acumulação de αS sem prejudicar as funções fisiológicas, já que a diminuição de αS pode ser prejudicial aos neurónios dopaminérgicos e a supressão leve dos transcritos de SNCA pode ser um procedimento mais viável.

Relativamente à autofagia, os inibidores da c-Abl estão limitados pela sua baixa absorção através da barreira hematoencefálica e pela pequena janela terapêutica para uso crónico na DP, havendo necessidade de se estudar outros inibidores com maior penetração na barreira hematoencefálica e especificidade relativamente a c-Abl. Uma questão que é importante avaliar em relação a estas abordagens é se as abordagens projetadas para aprimorar os mecanismos de depuração podem ser eficazes em pacientes com DP, pois os mecanismos de depuração podem estar tão avançados quando surgem os recursos motores clássicos da DP que o potencial de proporcionar benefício clínico significativo seria limitado. Os compostos recentemente desenvolvidos que visam seletivamente componentes a jusante da via de autofagia-lisossómica,

incluindo o fator de transcrição EB, lisossomas, GCase, bem como reguladores de autofagia mediados por *chaperons*, podem exercer efeitos mais específicos na autofagia, representando uma melhor perspectiva terapêutica. Outra forma de eliminar a αS é recorrer a estratégias imunológicas ativas e passivas, algumas delas bastante promissoras. Embora a imunoterapia apresente vantagens teóricas sobre as terapias tradicionais ainda não existem medicamentos baseados em anticorpos que sejam completamente eficazes e seguros. Uma preocupação levantada sobre o desenvolvimento de imunoterapia para a DP, seja ativa ou passiva, é se os anticorpos terão penetração cerebral suficiente para alcançar o envolvimento adequado sobre o alvo. Atualmente estão a ser explorados métodos para facilitar a entrada no cérebro. A maioria dos anticorpos utilizados para o tratamento da DP são anticorpos de cadeia única que têm a vantagem de poder penetrar na barreira do cérebro através do transporte mediado por receptores; no entanto, a baixa sem-vida no sangue compromete a eficácia clínica. É importante enfatizar que a redução das placas de A β na doença de Alzheimer pelo anticorpo *aducanumabe* constitui evidência de que podem ser alcançadas concentrações efetivas de anticorpos no SNC. Todavia, existem também riscos de inflamação, de respostas fora do alvo, de reações autoimunes e de aceleração do processo da doença, caso sejam inadvertidamente envolvidas espécies de αS que podem ser protetoras, em vez de tóxicas. A identificação de alvos mais específicos para diferentes subtipos de DP pode contornar esse problema. Além das estratégias imunológicas e apesar de os mecanismos exatos e os intervenientes na remoção da αS extracelular não serem claros, está disponível um conjunto de evidências que sugerem mecanismos de endocitose e fagocitose, bem como proteólise por proteases extracelulares. Uma nova estratégia de combate à disseminação da doença é a identificação das proteases envolvidas como alvos potenciais em terapias potenciadoras deste mecanismo. Algumas enzimas proteolíticas extracelulares foram sugeridas como tendo um papel na degradação da αS extracelular, nomeadamente a protease KLK6, metaloproteases 1, 2, 9 e 14 e a plasmina. A inibição da captação de αS agregada do espaço extracelular é uma abordagem atraente para a terapia em sinucleinopatias, contudo não se conhecem atualmente projetos em fase de ensaios clínicos nesta área. Alguns dos mecanismos que contribuem para a captação celular de αS estão sendo elucidados e podem ser alvo de fármacos. O recetor LAG3 é um potencial alvo para a

criação de novas terapias com recurso à imunoterapia ou a pequenas moléculas, de forma a impedir a propagação de α S. Mesmo que este não seja o recetor principal, poderão ser identificadas proteínas adicionais com envolvimento na captação de formas tóxicas de α S na superfície dos neurónios e que podem constituir alvos terapêuticos interessantes. As estratégias terapêuticas que impeçam a progressão da DP, com atuação na α S, são promissoras e os avanços contínuos no conhecimento alimentam o otimismo de que um dia poderemos interromper a cascata progressiva “do tipo priónico” de agregação da α S, o que permitiria evoluir da situação de alívio de condição sintomática na DP para a situação de condição patológica curável.

Página intencionalmente deixada em branco

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kingwell K. Zeroing in on neurodegenerative α -synuclein. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(6):371–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.95>
2. Goetz C. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011 Sep;1(1):a008862–a008862. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
3. Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Vendruscolo M et al. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science* (80-) [Internet]. 2009;326(5959):1533–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178250>
4. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB j* [Internet]. 2005 Apr;19(6):533–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
5. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T* [Internet]. 2015 Aug;40(8):504–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26236139>
6. Chou KL. Clinical manifestations of Parkinson disease. *Up To Date* [Internet]. 2018; Available from: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-parkinson>
7. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale: *Farmacologia*. 8th ed. Elsevier Health Sciences. 2016. 491–493 p.
8. Dolhun R. Navigating Cognitive Changes in Parkinson ' s Disease Brain Health [Internet]. 2019. Available from: https://www.michaeljfox.org/sites/default/files/media/document/MJFF_cognition-guide_digital.pdf
9. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A et al. Different Species of α -Synuclein Oligomers Induce Calcium Influx and Seeding. *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(34):9220–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007>
10. Parihar A, Parihar P, Solanki I PM. Alpha Synuclein and Parkinson's Disease. *Pathol Prev Ther Neurodegener Dis* [Internet]. 2018;1–14. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-0944-1_1
11. Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C LM. Accumulation of Toxic α -Synuclein Oligomer within Endoplasmic Reticulum Occurs in α -Synucleinopathy In Vivo. *J Neurosci* [Internet]. 2012;32(10):3301–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012>
12. Choi B-K, Choi M-G, Kim J-Y, Yang Y, Lai Y, Kweon D-H et al. Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(10):4087–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1218424110>
13. Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB et al. Proteasomal

- Inhibition by α -Synuclein Filaments and Oligomers. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(13):12924–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M306390200>
14. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol* [Internet]. 2011;10(11):1015–25. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70213-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70213-7)
 15. Gago M. Manual para Pessoas com Parkinson [Internet]. Vol. 1, APDPk – Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson. 2014. 48 p. Available from: http://msd.pt/wp-content/uploads/2015/10/Parkinson-Manual_XXXX_v7_pt.pdf
 16. Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, Storm MV JA. The current and projected economic burden of Parkinson’s disease in the United States. *Mov Disord* [Internet]. 2013;28(3):311–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25292>
 17. Maresova P, Klimova B, Novotny M KK. Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases: Expected Economic Impact on Europe—A Call for a Uniform European Strategy. *J Alzheimer’s Dis* [Internet]. 2016;54(3):1123–33. Available from: <https://doi.org/10.3233/JAD-160484>
 18. Tysnes O-BB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson’s disease. *J Neural Transm* [Internet]. 2017;124(8):901–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
 19. 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* [Internet]. 2011;21(10):718–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.008>
 20. Irena Rektorova. The European Parkinson’s Disease Standards of Care Consensus Statement. *Eur Park Dis Assoc*. 2011;1:1–26.
 21. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic—A Call to Action. *JAMA Neurol* [Internet]. 2018 Jan 1;75(1):9–10. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3299>
 22. 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* [Internet]. 2018/10/01. 2018 Nov;17(11):939–53. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
 23. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 May 26;95(11):6469–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
 24. Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013;9(8):445–54. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.132>
 25. Lewis PA. James Parkinson: The Man Behind the Shaking Palsy. *J Park Dis* [Internet]. 2012;2(3):181–7. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-2012-012108>
 26. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y et al. Pathological a-

- synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* (80-) [Internet]. 2016;353(6307):1513–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aah3374>
27. Charvin D, Medori R, Hauser RA, Rascol O. Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2018;17(11):804–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.136>
 28. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Jan;2(1):a008888–a008888. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315721>
 29. Hornykiewicz O. L-DOPA. *JPD* [Internet]. 2017;7(s1):S3–10. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-179004>
 30. Langston JW. The MPTP Story. *JPD* [Internet]. 2017;7(s1):S11–9. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>
 31. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy [Internet]. Vol. 1, Harvard Medical Library. 1817. 66 p. Available from: https://books.google.co.in/books?printsec=frontcover&redir_esc=y&id=3ZsTAQAAMAAJ&hl=pt-PT&output=text
 32. Hornykiewicz O. A brief history of levodopa. *J Neurol* [Internet]. 2010;257(2):249–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5741-y>
 33. Nishioka K, A. O HN. SNCA Gene Multiplication: A Model Mechanism of Parkinson Disease. *Gene Duplic* [Internet]. 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/24726>
 34. Lees AJ. Dopamine agonists in Parkinson ' s disease : a look at apomorphine. *Fundam Clin Pharmacol* [Internet]. 1993;7(3–4):121–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.1993.tb00226.x>
 35. Schwab RS, England Jr. AC, Poskanzer DC, Young RR. Amantadine in the Treatment of Parkinson's Disease. *JAMA* [Internet]. 1969;208(7):1168–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1969.03160070046011>
 36. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* [Internet]. 2008 Nov 26;60(4):543–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
 37. MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M CM. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* [Internet]. 1998;78(1):189–225. Available from: <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
 38. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of Parkinsonism. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2008;119(7):1459–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.03.017>
 39. Godeiro O, Fel C, Fernandes G. The extrapyramidal system: anatomy and syndromes. *Rev Neurocienc* [Internet]. 2006;14(1):48–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.4181/RNC.2006.14.48>
 40. Jankovic J. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Up To Date*. 2019;72(4906).
 41. Park J-S, Davis RL SC. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2018;18(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-018-0829-3>
 42. Chu Y KJ. Age-associated increases of α -synuclein in monkeys and humans are

- associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol Dis* [Internet]. 2007;25(1):134–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.021>
43. Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(12):1406–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4001>
 44. Steele JW, Ju S, Lachenmayer ML, Liken J, Stock A, Kim SH et al. Latrepirdine stimulates autophagy and reduces accumulation of α -synuclein in cells and in mouse brain. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2012;18(8):882–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.115>
 45. Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2010;31(6):953–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008>
 46. Martinez-vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov E V, et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* [Internet]. 2008;118(2):777–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32806>
 47. Winslow AR, Chen C, Corrochano S, Acevedo-arozena A, Gordon DE, Peden AA, et al. Alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* [Internet]. 2010;190(6):1023–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201003122>
 48. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and Alpha-Synuclein : Relevance to Parkinson ' s Disease and Related Synucleopathies. *Mov Disord* [Internet]. 2016 Jan 27;31(2):178–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.26477>
 49. Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP KD. Deficiency of ATP13A2 Leads to Lysosomal Dysfunction, -Synuclein Accumulation, and Neurotoxicity. *J Neurosci* [Internet]. 2012;32(12):4240–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5575-11.2012>
 50. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, et al. Parkin , PINK1 , and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* [Internet]. 2009;119(3):650–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI37617DS1>
 51. Volpicelli-daley XLA, Abdelmotilib XH, Liu Z, Stoyka L, Daher L, Milnerwood XAJ, et al. G2019S-LRRK2 Expression Augments Alpha-Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2016;36(28):7415–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3642-15.2016>
 52. Fernandes HJR, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, et al. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular Alpha-Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2016;6(3):342–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.013>
 53. Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, et al. VPS35 Mutations in Parkinson Disease. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2011;89(1):162–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.001>
 54. Stefanis L. How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* [Internet]. 2019;150(5):577–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14704>
 55. Lee H-J, Bae E, Lee S. Extracellular α -synuclein—a novel and crucial factor in Lewy

- body diseases. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2014;10(2):92–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2013.275>
56. Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic Model of Parkinson ' s Disease. *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. 2004;36(4):375–9. Available from: <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041771.66775.d5>
 57. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2016;139(Suppl. 1):216–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.13731>
 58. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK, Devi L, et al. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* [Internet]. 2008;283(14):9089–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
 59. Pickrell AM, Youle RJ. Review The Roles of PINK1 , Parkin , and Mitochondrial Fidelity in Parkinson ' s Disease. *Neuron* [Internet]. 2015;85(2):257–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
 60. Ashrafi G, Schlehe JS, Lavoie MJ, Schwarz TL. Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol* [Internet]. 2014;206(5):655–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201401070>
 61. Eschbach J, Einem B Von, Müller K, Bayer H, Morrison BE, Rudolph KL, et al. Mutual exacerbation of PGC-1 α deregulation and α -synuclein oligomerization. *Ann Neurol*. 2015;77(1):1–58.
 62. Guardia-laguarta C, Area-gomez E, Ru C, Liu Y, Magrane J, Becker D, et al. α -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(1):249–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014>
 63. Aras S, Bai M, Lee I, Springett R, Hüttemann M, Grossman LI. Mitochondrion MNRR1 (formerly CHCHD2) is a bi-organellar regulator of mitochondrial metabolism. *Mitochondrion* [Internet]. 2015;20:43–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.10.003>
 64. Tang F, Liu W, Hu J, Mei L, Xiong W. VPS35 Deficiency or Mutation Causes Dopaminergic Neuronal Loss by Impairing Mitochondrial Fusion and Article VPS35 Deficiency or Mutation Causes Dopaminergic Neuronal Loss by Impairing Mitochondrial Fusion and Function. *Cell Rep* [Internet]. 2015;12(10):1631–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.001>
 65. Singh A, Zhi L, Zhang H. LRRK2 and mitochondria: Recent advances and current views. *Brain Res* [Internet]. 2019;1702:96–104. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.06.010>
 66. Fornstedt B, Pileblad E, Carlsson A. In Vivo Autoxidation of Dopamine in Guinea Pig Striatum Increases with Age. *J Neurochem*. 1990;55(2):655–9.
 67. Slivkas A, Cohen G. Hydroxyl Radical Attack on Dopamine. *J Biol Chem*. 1985;260(29):15466–72.
 68. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2013;3(4):461–91. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
 69. Bonifati V, Joesse M, Dongen JW Van, Vanacore N, Duijn CM Van, Oostra BA, et

- al. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* (80-) [Internet]. 2003;299(5604):256–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1077209>
70. Nottia M Di, Masciullo M, Verrigni D, Petrillo S, Modoni A, Rizzo V, et al. DJ-1 modulates mitochondrial response to oxidative stress: clues from a novel diagnosis of PARK7. *Clin Genet*. 2017;92(1):18–25.
 71. Guzman JN, Sanchez-padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* [Internet]. 2010;468(7324):696–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09536>
 72. Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson’s disease: foe and ally? *Neuroscience* [Internet]. 2015;302:59–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.018>
 73. Barcia, Carlos et al. Parkinson’s disease and inflammatory changes. *Neurotox Res*. 2003;5(6):411–7.
 74. Qian, L., Flood, P. M., & Hong JS. Neuroinflammation is a key player in Parkinson’s disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm* [Internet]. 2010;117(8):971–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-010-0428-1>
 75. Wilhelmus, M. M., Nijland, P. G., Drukarch, B., de Vries, H. E., & van Horsen J. Involvement and interplay of Parkin, PINK1, and DJ1 in neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;53(4):983–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.040>
 76. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Chignell CF, et al. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson’s disease. *Neurotox Res* [Internet]. 2011;19(1):63–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-009-9140-z>
 77. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2007;28(3):138–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
 78. Watson MB, Richter F, Kyung S, Gabby L, Wu J, Masliah E, et al. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol* [Internet]. 2012;237(2):318–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.025>
 79. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* (80-). 2016;353(6301):777–83.
 80. Ma B, Xu L, Pan X, Sun L, Ding J, Xie C, et al. LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (C-X3-C) receptor 1-mediated signalling pathways. *Hum Mol Genet*. 2016;25(16):3515–23.
 81. Kim C, Ho D, Suk J, You S, Michael S, Kang J, et al. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4(1):1562. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2534>
 82. Zhang WW, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson’s disease. *FASEB J* [Internet]. 2005;19(6):533–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-2751com>

83. 10, editor. *Prontuário Terapêutico - 10* [Internet]. Ministério da Saúde. 2011. p. 102–34. Available from: <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>
84. DiPiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey LM (Eds.). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. 10th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017.
85. Sweetman SC. *Martindale*. 36th ed. Pharmaceutical press; 2009.
86. Katzung BG. *Basic and clinical Pharmacology*. 12th ed. McGraw-Hill Education; 2012. 313–329 p.
87. Spindler MA, Tarsy D. Initial pharmacologic treatment of Parkinson disease. *Up To Date*. 2019;45(4896).
88. Agency EM. *Resumo das características do medicamento - Ongentys*. EMA. 2016;1–53.
89. Infarmed. *Relatório de avaliação do pedido de comparticipação de medicamento para uso humano*. Infarmed. 2018;1–6.
90. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T PT. The Incidence of Parkinson ' s Disease : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuro Epidemiol* [Internet]. 2016;46(4):292–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000445751>
91. Tysnes OB, Storstein A, Storstein OTA. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2017;124(8):901–5.
92. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E. Environmental risk factors and Parkinson's disease: an umbrella review of meta-analyses. *Park Relat Disord* [Internet]. 2016;23:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.12.008>
93. De Lau, L. M., & Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):525–35.
94. Delamarre, A., & Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med* [Internet]. 2017;46(2):175–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.001>
95. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* [Internet]. 2016;15(12):1257–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
96. Deng H, Wang P, Jankovic J. SC Parkinson ' s Disease Center and Movement Disorders Clinic , Department of. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>
97. Fusco G, Simone A De, Gopinath T, Vostrikov V, Vendruscolo M, Dobson CM, et al. Direct observation of the three regions in a-synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5(May):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4827>
98. Villar Piqué. Structure, funcion and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem* [Internet]. 2015;139:240–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.1324>
99. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci* [Internet]. 2016;21(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
100. Peelaerts W, Outeiro TF. Chapter 2 - Synuclein misfolding as a therapeutic target [Internet]. *Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders*. Elsevier Inc.; 2017. 21–48 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12->

- 805120-7/00002-6
101. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat* [Internet]. 2011;42(4):242–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.12.001>
 102. Yuan J, Zhao Y. Biochemical and Biophysical Research Communications Evolutionary aspects of the synuclein super-family and sub-families based on large-scale phylogenetic and group-discrimination analysis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;441(2):308–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.132>
 103. Gandhi J, Antonelli AC, Afridi A, Vatsia S, Joshi G, Romanov V et al. Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: a review of pathogeneses, novel detection strategies, and potential therapeutics. *Neuroscience* [Internet]. 2019;30(4):339–58. Available from: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0035>
 104. Longhena F, Faustini G, Spillantini MG BA. Living in Promiscuity: The Multiple Partners of Alpha-Synuclein at the Synapse in Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(1):141. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010141>
 105. Wang C, Zhao C, Li D, Tian Z, Lai Y, Diao J. Versatile Structures of α -Synuclein. *Front Neuroanat* [Internet]. 2016;9(June):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2016.00048>
 106. an H, Weinreb PH LPJ. The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem Biol* [Internet]. 1995;2(3):163–9. Available from: [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90071-3](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90071-3)
 107. Uversky VN F AL. Amino acid determinants of α -synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle. *FEBS Lett* [Internet]. 2002;522(1–3):9–13. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02883-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02883-1)
 108. Jao CC, Der-Sarkissian A, Chen J, Langen R. From The Cover: Structure of membrane-bound α -synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004;101(22):8331–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400553101>
 109. Vamvaca K, Volles MJ, Jr PTL. The First N-terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast. *J Mol Biol* [Internet]. 2009;389(2):413–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.021>
 110. Zhu M, Fink AL. Lipid Binding Inhibits α -Synuclein Fibril Formation*. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(19):16873–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210136200>
 111. Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V, Jovin TM. Impact of the Acidic C-Terminal Region Comprising Amino Acids 109–140 on α -Synuclein Aggregation in Vitro. *Biochemistry* [Internet]. 2004 Dec 1;43(51):16233–42. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi048453u>
 112. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. Biochimica et Biophysica Acta α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2012;1822(2):261–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.002>

113. Iyer A, Claessens MMAE. Disruptive membrane interactions of alpha-synuclein aggregates. *BBA - Proteins Proteomics* [Internet]. 2018;#pagerange#. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.10.006>
114. Wang Z, Gao G, Duan C, Yang H. Biomedicine & Pharmacotherapy Progress of immunotherapy of anti- α -synuclein in Parkinson ' s disease. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;115(November 2018):108843. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108843>
115. Games D, Valera E, Spencer B, Rockenstein E, Mante M, Adame A, et al. Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson ' s Disease-Like Models. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(28):9441–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5314-13.2014>
116. Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of posttranslational modifications of α -synuclein and LRRK2 in Parkinson's disease: Potential contributions of environmental factors Edward. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2018;#pagerange#. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.017>
117. Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, et al. Neurobiology of Aging A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson ' s disease-type pathology. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014;1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024>
118. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Sci Mag* [Internet]. 2003;302(5646):841. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1090278>
119. Ikeuchi T, Kakita A, Shiga A, Kasuga K, Kaneko H, Tan C-F et al. Patients Homozygous and Heterozygous for SNCA Duplication in a Family With Parkinsonism and Dementia. *Arch Neurol* [Internet]. 2008;65(4):514–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.65.4.514>
120. Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW et al. The E46K Mutation in α -Synuclein Increases Amyloid Fibril Formation. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(9):7800–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411638200>
121. Conway KA, Lee S, Rochet J, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *PNAS* [Internet]. 2000;97(2):571–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.2.571>
122. Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, et al. Both Familial Parkinson's Disease Mutations Accelerate α -Synuclein Aggregation. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(14):9843–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.14.9843>
123. Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S, et al. Conversion of Wild-type α -Synuclein into Mutant-type Fibrils and Its Propagation in the Presence of A30P Mutant*. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(12):7940–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807482200>
124. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M GP. Mitochondrial association of

- alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2008;65(7–8):1272–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-7589-1>
125. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M GP. Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2009;41(10):2015–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.008>
 126. Raaij ME Van, Gestel J Van, Segers-nolten IMJ, Leeuw SW De, Subramaniam V. Concentration Dependence of a -Synuclein Fibril Length Assessed by Quantitative Atomic Force Microscopy and Statistical-Mechanical Theory. *Biophys J* [Internet]. 2008;95(10):4871–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.127464>
 127. Kruger R. Ala30Pro mutation in the gene encoding a-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Publ Gr*. 1998;18:106–8.
 128. Polymeropoulos MH, Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Sci AAAS* [Internet]. 2012;276(5321):2045–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
 129. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I et al. The New Mutation, E46K, of a-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia. *Am Neurol Assoc* [Internet]. 2004;55(2):164–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.10795>
 130. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* [Internet]. 2013;28(6):811–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25421>
 131. Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N et al. G51D a-Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian–Pyramidal Syndrome. *Am Neurol Assoc* [Internet]. 2013;74(3):459–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.23894>
 132. Bertoni CW, Fernandez CO, Griesinger C, Jovin TM ZM. Familial Mutants of α -Synuclein with Increased Neurotoxicity Have a Destabilized Conformation. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(35):30649–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C500288200>
 133. Guerrero-Ferreira R, Taylor NM, Mona D, Ringler P, Lauer ME, Riek R et al. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife* [Internet]. 2018;7. Available from: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.36402>
 134. Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Agid Y et al. Causal relation between α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* [Internet]. 2004;364(9440):1169–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17104-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17104-3)
 135. Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim H-Y, Lamberto GR et al. Phosphorylation at S87 Is Enhanced in Synucleinopathies, Inhibits -Synuclein Oligomerization, and Influences Synuclein-Membrane Interactions. *J Neurosci* [Internet]. 2010;30(9):3184–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010>
 136. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ et al.

- Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(40):29739–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600933200>
137. Ellis CE, Schwartzberg PL, Grider TL, Fink DW NR. α -Synuclein Is Phosphorylated by Members of the Src Family of Protein-tyrosine Kinases. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;276(6):3879–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010316200>
 138. Sato H, Arawaka S, Hara S, Fukushima S, Koga K, Koyama S et al. Authentically Phosphorylated α -Synuclein at Ser129 Accelerates Neurodegeneration in a Rat Model of Familial Parkinson's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2011;31(46):16884–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-11.2011>
 139. Barrett PJ TGJ. Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res* [Internet]. 2015;1628:247–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.002>
 140. Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T et al. Constitutive Phosphorylation of the Parkinson's Disease Associated α -Synuclein. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(1):390–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.1.390>
 141. Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A BJ. Synucleins Are a Novel Class of Substrates for G Protein-coupled Receptor Kinases. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(34):26515–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003542200>
 142. Inglis KJ, Chereau D, Brigham EF, Chiou S-S, Schöbel S, Frigon NL et al. Polo-like Kinase 2 (PLK2) Phosphorylates α -Synuclein at Serine 129 in Central Nervous System. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(5):2598–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C800206200>
 143. Qing H, Wong W, McGeer EG MP. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;387(1):149–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.142>
 144. Chen L, Periquet M, Wang X, Negro A, Mclean PJ, Hyman BT, et al. Tyrosine and serine phosphorylation of α -synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *J Clin Invest* [Internet]. 2009;119(11):3257–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI39088DS1>
 145. Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A LH. Elucidating the Role of Site-Specific Nitration of α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease via Protein Semisynthesis and Mutagenesis. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2015;137(15):5041–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ja5131726>
 146. Kim WS, Kågedal K HG. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alz Res Ther* [Internet]. 2014;6(5–8). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-014-0073-2>
 147. Sevcsik E, Trexler AJ, Dunn JM RE. Allosteric in a Disordered Protein: Oxidative Modifications to α -Synuclein Act Distally To Regulate Membrane Binding. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2011;133(18):7152–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ja2009554>
 148. Alam P, Bousset L, Melki R O DE. α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of

- species, a spectrum of toxicities. *J Neurochem* [Internet]. 2019;150(5):522–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14808>
149. Candelise N, Schmitz M, Llorens F, Villar-Piqué A, Cramm M, Thom T et al. Seeding variability of different alpha synuclein strains in synucleinopathies. *Am Neurol Assoc* [Internet]. 2019;86(5):691–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.25446>
 150. Meade RM, Fairlie DP MJ. Alpha-synuclein structure and Parkinson’s disease – lessons and emerging principles. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2019;14(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-019-0329-1>
 151. Bartels T, Choi JG SD. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* [Internet]. 2011;477(7362):107–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10324>
 152. Ghosh D, Singh PK, Sahay S, Jha NN, Jacob RS, Sen S et al. Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep09228>
 153. Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A et al. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein. *Cell* [Internet]. 2012;149(5):1048–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037>
 154. Pieri L, Madiona K MR. Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24526>
 155. Ventura S PF. Inducing α -synuclein compaction: a new strategy for inhibiting α -synuclein aggregation? *Neural Regen Res* [Internet]. 2019;14(11):1897. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.259608>
 156. Schwarzman AL, Senkevich KA, Emelyanov AK, Pchelina SN. Prion Properties of Alpha-Synuclein. *Mol Biol*. 2019;53(3):335–41.
 157. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct & Mol Biol* [Internet]. 2016;(February):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3194>
 158. Rockenstein E, Nuber S, Overk CR, Ubhi K, Mante M, Patrick C, et al. Accumulation of oligomer-prone α -synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration in vivo. *Brain*. 2014;(137):1496–513.
 159. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S. In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *PNAS* [Internet]. 2011;108(10):4194–9. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100976108
 160. Helwig M, Klinkenberg M, Rusconi R, Musgrove RE, Majbour NK, El-Agnaf OMA et al. Brain propagation of transduced α -synuclein involves non-fibrillar protein species and is enhanced in α -synuclein null mice. *Brain* [Internet]. 2015;139(3):856–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv376>
 161. Bengoa-Vergniory N, Roberts RF, Wade-Martins R A-AJ. Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017;134(6):819–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1755-1>
 162. C C. Lewy body cortical involvement may not always predict dementia in Parkinson’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2003;74(7):852–6.

- Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.74.7.852>
163. Parkkinen L, Pirttilä T AI. Applicability of current staging/categorization of α -synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2008;115(4):399–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-008-0346-6>
 164. Karpinar DP, Balija MBG, Kügler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N et al. Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired β -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J* [Internet]. 2009;28(20):3256–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.257>
 165. Paleologou KE, Kragh CL, Mann DMA, Salem SA, Al-Shami R, Allsop D et al. Detection of elevated levels of soluble α -synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain* [Internet]. 2008;132(4):1093–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn349>
 166. Caughey B LPJ. PROTOFIBRILS, PORES, FIBRILS, AND NEURODEGENERATION: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26(1):267–98.
 167. Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B et al. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J* [Internet]. 2010;29(20):3571–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.223>
 168. WJ S-S. The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2010;120(2):131–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-010-0711-0>
 169. Castillo-Carranza DL, Zhang Y, Guerrero-Muñoz MJ, Kaye R, Rincon-Limas DE F-FP. Differential Activation of the ER Stress Factor XBP1 by Oligomeric Assemblies. *Neurochem Res* [Internet]. 2012;37(8):1707–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0780-7>
 170. Cooper AA, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, et al. α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science* (80-) [Internet]. 2012;313(5785):324–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129462>
 171. Paillusson S, Gomez-Suaga P, Stoica R, Little D, Gissen P, Devine MJ et al. α -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017;134(1):129–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1704-z>
 172. Lewis J, Melrose H, Bumcrot D, Hope A, Zehr C, Lincoln S et al. In vivo silencing of alpha-synuclein using naked siRNA. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2008;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-3-19>
 173. Proclara. Our Programs - Proclara - NPT088 [Internet]. Proclarabio. 2020 [cited 2020 May 7]. Available from: <http://www.proclarabio.com/our-programs/>
 174. University N. Nilotinib in Parkinson's Disease (NILO-PD) [Internet]. clinicaltrials.gov. 2020 [cited 2020 May 7]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03205488>
 175. Prothena. A Study to Evaluate the Efficacy of Prasinezumab (RO7046015/PRX002) in Participants With Early Parkinson's Disease (PASADENA) [Internet].

- clinicaltrials.gov. 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03100149>
176. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y et al. Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Sep 30;353(6307):aah3374–aah3374. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aah3374>
 177. Volpicelli-Daley L BP. Prion-like propagation of pathology in Parkinson disease [Internet]. 1st ed. Vol. 153, Human Prion Diseases. Elsevier B.V.; 2018. 321–35 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00017-9>
 178. Olanow CW BP. Parkinson’s Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson’s Disease a Prion-Like Disorder? *Mov Disord* [Internet]. 2013;28(1):31–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25373>
 179. McCormack AL, Mak SK, Henderson JM, Bumcrot D, Farrer MJ DM DA. α -Synuclein Suppression by Targeted Small Interfering RNA in the Primate Substantia Nigra. Petrucelli L, Ed *PLoS ONE* [Internet]. 2010;5(8):e12122. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012122>
 180. Gorbatyuk OS, Li S, Nash K, Gorbatyuk M, Lewin AS, Sullivan LF et al. In Vivo RNAi-Mediated α -Synuclein Silencing Induces Nigrostriatal Degeneration. *Mol Ther* [Internet]. 2009;18(8):1450–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.115>
 181. Collier TJ, Jr DER, Steece-collier K, Lipton JW. Is Alpha-Synuclein Loss-of-Function a Contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates. *Front Neurosci* [Internet]. 2016;10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00012>
 182. Zharikov AD, Cannon JR, Tapias V, Bai Q, Horowitz MP, Shah V et al. shRNA targeting α -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson’s disease model. *J Clin Invest* [Internet]. 2015;125(7):2721–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64502>
 183. Cole T, Paumier K, Zhao H, Weihofen A, Kordasiewicz H, Swayze E. Snca targeted antisense oligonucleotides mediate progression of pathological deposition in alpha synuclein rodent transmission models of Parkinson’s disease (P6.239). *Neurology* [Internet]. 2016 Apr 5;86(16 Supplement):P6.239. Available from: http://n.neurology.org/content/86/16_Supplement/P6.239.abstract
 184. Mittal S, Bjørnevik K, Im DS, Flierl A, Dong X, Locascio JJ et al. β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson’s disease. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2017;357(6354):891–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf3934>
 185. Ionispharma. Positive Trials of Spinal Muscular Atrophy Bode Well for Antisense Approach [Internet]. Ionis Pharmaceuticals. 2016. Available from: <https://ir.ionispharma.com/news-releases/news-release-details/ionis-pharmaceuticals-licenses-ionis-htt-rx-partner-following>
 186. Ionispharma. Ionis Pharmaceuticals Licenses IONIS-HTT Rx to Partner Following Successful Phase 1/2a Study in Patients with Huntington’s Disease [Internet]. Ionis Pharmaceuticals. 2017. Available from: <https://ir.ionispharma.com/news-releases/news-release-details/ionis-pharmaceuticals-licenses-ionis-htt-rx-partner-following>
 187. Biosciences P. Multiple Dose Safety Study of NPT088 in Patients With Mild to

- Moderate Probable Alzheimer's Disease [Internet]. clinicaltrials.gov. 2019. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03008161>
188. Iljina M, Hong L, Horrocks MH, Ludtmann MH, Choi ML, Hughes CD et al. Nanobodies raised against monomeric α -synuclein inhibit fibril formation and destabilize toxic oligomeric species. BMC Biol [Internet]. 2017;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-017-0390-6>
 189. Neuropore. Phase 1 Study of NPT200-11 in Healthy Subjects [Internet]. clinicaltrials.gov. 2019 [cited 2020 May 7]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03008161>
 190. Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT MP. Hsp70 Reduces α -Synuclein Aggregation and Toxicity. J Biol Chem [Internet]. 2004;279(24):25497–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M400255200>
 191. Medicine. UNL of. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02606682>. clinicaltrials.gov. 2016.
 192. Wrasidlo W, Tsigelny IF, Price DL, Dutta G, Rockenstein E, Schwarz TC et al. A de novocompound targeting α -synuclein improves deficits in models of Parkinson's disease. Brain [Internet]. 2016;136(12):3217–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww238>
 193. Price DL, Koike MA, Khan A, Wrasidlo W, Rockenstein E, Masliah E et al. The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. Sci Rep [Internet]. 2018;8(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34490-9>
 194. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans S et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature [Internet]. 1993;(363):446–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/363446a0>
 195. Bhatt MA, Messer A KJ. Can Intrabodies Serve as Neuroprotective Therapies for Parkinson's Disease? Beginning Thoughts. J Park Dis [Internet]. 2013;3(4):581–91. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-130252>
 196. Butler DC, Joshi SN, Genst ED, Baghel AS, Dobson CM MA. Bifunctional Anti-Non-Amyloid Component α -Synuclein Nanobodies Are Protective In Situ. Witt SN, Ed PLoS ONE [Internet]. 2016;11(11):e0165964. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165964>
 197. Chatterjee D, Bhatt M, Butler D, De Genst E, Dobson CM, Messer A et al. Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α -synuclein-based Parkinson's disease model. npj Park Dis [Internet]. 2018;4(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41531-018-0062-4>
 198. Guilliams T, El-Turk F, Buell AK, O'Day EM, Aprile FA, Esbjörner EK et al. Nanobodies Raised against Monomeric α -Synuclein Distinguish between Fibrils at Different Maturation Stages. J Mol Biol [Internet]. 2013;425(14):2397–411. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.040>
 199. Krishnan R, Tsubery H, Proschitsky MY, Asp E, Lulu M, Gilead S et al. A Bacteriophage Capsid Protein Provides a General Amyloid Interaction Motif (GAIM) That Binds and Remodels Misfolded Protein Assemblies. J Mol Biol [Internet]. 2014;426(13):2500–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.015>
 200. D. Michelson , M. Grundman , K. Magnuson , R. Fisher , J.M. Levenson , P. Aisen et al. Randomized, Placebo Controlled Trial of NPT088, A Phage-Derived, Amyloid-

- Targeted Treatment for Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimer's Dis* [Internet]. 2019;6(4):228–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.14283/jpad.2019.37>
201. Moors TE, Hoozemans JJM, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin M-C et al. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2017;12(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0154-3>
 202. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC WS. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med* [Internet]. 2013;19(1):51–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.001>
 203. Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J BA. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;210(19):E1817–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305623110>
 204. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN RD. α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(27):25009–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
 205. Bové J, Martínez-Vicente M VM. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2011;12(8):437–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3068>
 206. Ghosh A, Tyson T, George S, Hildebrandt EN, Steiner JA, Madaj Z et al. Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016;8(368):174–368. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aag2210>
 207. Brahmachari S, Karuppagounder SS, Ge P, Lee S, Dawson VL, Dawson TM et al. c-Abl and Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *J Parkinsons Dis* [Internet]. 2017;7(4):589–601. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-171191>
 208. Lindholm D, Pham DD, Cascone A, Eriksson O, Wennerberg K SM. c-Abl Inhibitors Enable Insights into the Pathophysiology and Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2016;8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2016.00254>
 209. Lonskaya I, Hebron ML, Desforgues NM, Schachter JB MC-H. Nilotinib-induced autophagic changes increase endogenous parkin level and ubiquitination, leading to amyloid clearance. *J Mol Med* [Internet]. 2013;92(4):373–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-013-1112-3>
 210. Karuppagounder SS, Brahmachari S, Lee Y, Dawson VL, Dawson TM KH. The c-Abl inhibitor, Nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep* [Internet]. 2014;4(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep04874>
 211. Pagan F, Hebron M, Valadez EH, Torres-Yaghi Y, Huang X, Mills RR et al. Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *JPD* [Internet]. 2016;6(3):503–17. Available from: <https://doi.org/10.3233/JPD-160867>
 212. Mak SK, McCormack AL, Manning-Boğ AB, Cuervo AM DM DA. Lysosomal Degradation of α -Synuclein in Vivo. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(18):13621–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.074617>
 213. Lu J-H, Tan J-Q, Durairajan SSK, Liu L-F, Zhang Z-H, Ma L et al. Isorhynchophylline,

- a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2012;8(1):98–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.8.1.18313>
214. Biogen. Evaluating the Efficacy, Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of BIIB054 in Participants With Parkinson’s Disease (SPARK) [Internet]. clinicaltrials.gov. 2016. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02267434>
 215. Affiris. Study Assessing Tolerability and Safety of AFFITOPE® PD03A in Patients With Early Parkinson’s Disease (AFF011) [Internet]. [neurology](http://neurology.com). 2016. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02267434>
 216. Games D, Seubert P, Rockenstein E, Patrick C, Trejo M, Ubhi K et al. Axonopathy in an α -Synuclein Transgenic Model of Lewy Body Disease Is Associated with Extensive Accumulation of C-Terminal-Truncated α -Synuclein. *Am J Pathol* [Internet]. 2013;182(3):940–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.11.018>
 217. Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M et al. Effects of α -Synuclein Immunization in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Neuron* [Internet]. 2005;46(6):857–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.010>
 218. Schenk DB, Koller M, Ness DK, Griffith SG, Grundman M, Zago W et al. First-in-human assessment of PRX002, an anti- α -synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Mov Disord* [Internet]. 2016;32(2):211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.26878>
 219. Prothena. Clinical Results Presented From Prothena’s Phase 1b Study Of PRX002/RG7935 Demonstrating Robust Antibody CNS Penetration And Significant Reduction Of Free Serum Alpha-Synuclein In Patients With Parkinson’s Disease [Internet]. Prothena. 2017. Available from: <https://ir.prothena.com/news-releases/news-release-details/clinical-results-presented-prothenas-phase-1b-study-prx002rg7935?ReleaseID=1019672>
 220. Prothena. Prothena Announces Initiation Of Phase 2 PASADENA Study Of PRX002/RG7935 In Patients With Early Parkinson’s Disease [Internet]. Prothena. 2017. Available from: <https://ir.prothena.com/news-releases/news-release-details/prothena-announces-initiation-phase-2-pasadena-study?ReleaseID=1032188>
 221. Brys M, Fanning L, Hung S, Ellenbogen A, Penner N, Yang M et al. Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BIIB054. *Mov Disord* [Internet]. 2019;34(8):1154–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mds.27738>
 222. Weihofen A, Liu Y, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA et al. Development of an aggregate-selective, human-derived α -synuclein antibody BIIB054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson’s disease models. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2019;124:276–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.016>
 223. Mirosław Brys, Aaron Ellenbogen, Laura Fanning, Natasha Penner, Minhua Yang, Mackenzie Welch, Erica Koenig, Eric David, Tara Fox, Shavy Makh, Jason Aldred, Ira Goodman, Danielle Graham, Andreas Weihofen JC. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study of Anti-Alpha-Synuclein Antibody BIIB054 in Patients with Parkinson’s Disease (S26.001) [Internet].

- Neurology. 2018. Available from: https://n.neurology.org/content/90/15_Supplement/S26.001
224. Mandler M, Valera E, Rockenstein E, Weninger H, Patrick C, Adame A, et al. Next - generation active immunization approach for synucleinopathies : implications for Parkinson ' s disease clinical trials. *Acta Neuropathol.* 2014;
 225. Company A. AFFiRiS Announces Top Line Results of First-in-Human Clinical Study Using AFFITOPE® PD03A, Confirming Immunogenicity and Safety Profile in Parkinson's Disease Patients [Internet]. *Prnewswire.* 2017. Available from: <https://www.prnewswire.com/news-releases/affiris-announces-top-line-results-of-first-in-human-clinical-study-using-affitope-pd03a-confirming-immunogenicity-and-safety-profile-in-parkinsons-disease-patients-627025511.html>
 226. Spencer B, Michael S, Shen J, Kosberg K, Rockenstein E, Patrick C et al. Lentivirus Mediated Delivery of Neurosin Promotes Clearance of Wild-type α -Synuclein and Reduces the Pathology in an α -Synuclein Model of LBD. *Mol Ther* [Internet]. 2013;21(1):31–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.66>
 227. Pampalakis G, Sykioti V-S, Ximerakis M, Stefanakou-Kalakou I, Melki R, Vekrellis K et al. KLK6 proteolysis is implicated in the turnover and uptake of extracellular alpha-synuclein species. *Oncotarget* [Internet]. 2016;8(9):14502–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.13264>
 228. Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee J-H, Paik SR LS-J. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular a-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2008;40(9):1835–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>
 229. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(33):E3138–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301440110>
 230. Uemura N, Uemura MT, Luk KC, Lee VM-Y TJ. Cell-to-Cell Transmission of Tau and α -Synuclein. *Trends Mol Med* [Internet]. 2020;26(10):936–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.012>