

Wilson Piazza Santos

Novas perspectivas para tratamento da doença de Parkinson

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2015

Wilson Piazza Santos

Novas perspectivas para tratamento da doença de Parkinson

Monografia apresentada ao I Curso de Especialização em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do certificado de Especialista em Farmacologia.

Orientadora: Dra. Natália Pessoa Rocha

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2015

043

Santos, Wilson Piazza.

Novas perspectivas para tratamento da doença de Parkinson [manuscrito] / Wilson Piazza Santos. - 2015.

49f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Natália Pessoa Rocha.

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do certificado de Especialista em Farmacologia.

1. Parkinson, Doença de - Teses. 2. Alfa-sinucleína - Teses. 3. Apoptose - Teses. 4. Canais de cálcio - Teses. 5. Estresse oxidativo - Teses. 6. Excitotoxicidade. 7. Agonistas do receptor 5-HT_{1A}. 8. Farmacologia - Teses. I. Rocha, Natália Pessoa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

"NOVAS PERSPECTIVAS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON"

WILSON PIAZA SANTOS

Monografia de Especialização defendida e aprovada, no dia 14 de julho de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



DRA. ÉRICA LEANDRO MARCIANO VIEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. HELTON JOSÉ DOS REIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Profa. Salvina Maria de Campos
FAMINAS

Natália Pessoa Rocha
DRA. NATÁLIA PESSOA ROCHA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Curso de Especialização em Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 14 de julho de 2015

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) tem como principal característica patológica a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* e a presença de depósitos da proteína α -sinucleína nos neurônios remanescentes. A DP é marcada por sintomas motores e não-motores típicos da doença. Ainda não existe um tratamento neuroprotetor que retarde a progressão da doença e tenha maiores benefícios sobre os sintomas da DP. Avanços importantes têm sido feitos em relação às vias que levam à disfunção e morte celular na DP. Algumas das vias que têm sido estudadas até o momento incluem: disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, regulação do cálcio, inflamação e agregação de proteínas. A interação com canais de cálcio pode representar um alvo adequado para a intervenção terapêutica destinada a atrasar a progressão da DP. A disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo também estão envolvidos na patogênese da DP e são possíveis alvos de intervenção. O enovelamento incorreto de proteínas, predominantemente da α -sinucleína, leva à formação de agregados proteicos bastante tóxicos para as células, logo uma boa alternativa para o tratamento seria a utilização de estratégias que melhorem a eliminação de proteínas indesejadas. O uso de agonistas do receptor 5-HT_{1A} resultou em melhora dos sintomas motores da DP, discinesia induzida por levodopa, deficiências cognitivas e vômitos. A excitotoxicidade mediada pelo glutamato pode contribuir para os mecanismos que desencadeiam o processo neurodegenerativo na substância negra *pars compacta*. Sendo assim, o desenvolvimento de novas moléculas ou estratégias farmacológicas para atuar nos receptores de glutamato também configura uma possível estratégia terapêutica. A regulação da apoptose por meio de interações de membros da família de Bcl-2 e das cascatas de caspases também pode ser uma alternativa de intervenção para tratamento da DP.

Palavras-chave: α -sinucleína, apoptose, canais de cálcio, doença de Parkinson, estresse oxidativo, excitotoxicidade.

ABSTRACT

The main pathological features of Parkinson's disease (PD) include large loss of dopaminergic neurons in the substance nigra *pars compacta* and α -synuclein deposits in the remaining neurons. PD is characterized by typical motor and non-motor symptoms. Until now, there is no neuroprotective treatment able to retard the progression of the disease and bring greater benefits on PD symptoms. Important advances have been made regarding the pathways leading to cell dysfunction and death in PD. Some of the pathways that have been studied include mitochondrial dysfunction, oxidative stress, calcium regulation, inflammation and protein aggregation. Interaction with calcium channels may represent a suitable therapeutic intervention target for delaying PD progression. Mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress are also involved in the pathogenesis of PD, being both potential targets for intervention. Incorrect folding of the protein α -synuclein leads to the formation of protein aggregates toxic to the cells. Therefore, strategies that improve the elimination of misfolded proteins would be good alternatives for PD treatment. Agonists of 5-HT_{1A} receptor did improve the motor symptoms of PD, dyskinesia induced by levodopa, cognitive deficiencies and vomiting. The excitotoxicity mediated by glutamate can contribute to the mechanisms that trigger the neurodegenerative process in the substantia nigra *pars compacta*. Then, the development of new molecules or pharmacological strategies to act on glutamate receptors also configures a possible target. The regulation of apoptosis through interactions members of the Bcl-2 family and caspase cascades may also be an alternative for interventional treatment of PD.

Keywords: α -synuclein, apoptosis, calcium channels, Parkinson's disease, oxidative stress, excitotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MÉTODOS.....	10
3 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	11
4 PERSPECTIVAS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	17
4.1 Bloqueadores de canais de cálcio.....	17
4.2 Função mitocondrial e estresse oxidativo.....	19
4.3 Doença de Parkinson e α -sinucleína.....	22
4.4 Os receptores 5-HT _{1A}	27
4.5 Excitotoxicidade.....	29
4.6 Apoptose.....	35
5 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa em que a capacidade de controlar os movimentos voluntários é gradualmente perdida, como consequência de mudanças profundas na organização funcional dos núcleos da base (BLANDINI, 2005). A DP é uma doença crônica, progressiva e insidiosa (OLANOW; SCHAPIRA, 2013) sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum, atrás apenas da doença de Alzheimer (CONNOLLY; LANG, 2014). O curso da doença varia consideravelmente, aqueles que têm o diagnóstico mais precoce podem viver mais do que aqueles diagnosticados mais tarde (LEES; HARDY; REVESZ, 2009; ISHIHARA et al., 2007).

Em 2006, a prevalência da DP era de aproximadamente 115 casos por 100.000 indivíduos, estando associada à idade da população. Sua incidência era de 13,5 a 13,9 casos por 100.000 pessoas por ano (DE LAU; BRETELER, 2006). A frequência da doença era de cerca de 1 a 3 casos por 100.000 pessoas com menos de 45 anos, 3.100 casos por 100.000 pessoas na faixa etária de 75 a 85 anos, e 4.300 casos por 100.000 pessoas com mais de 85 anos (DE LAU; BRETELER, 2006). A DP afeta cerca de 5 milhões de pessoas em todo o mundo, e com o envelhecimento da população a prevalência da DP tende a aumentar nas próximas décadas (OLANOW; SCHAPIRA, 2013).

A etiologia da DP inclui causas genéticas e influências ambientais. Várias causas monogênicas de DP autossômica dominante e recessiva já foram descritas. Estudos de associação ampla de genoma (GWA) identificaram um número de alelos de risco para DP. A DP não possui causa ambiental específica, mas vários fatores mostraram influenciar o risco de desenvolvimento da doença (SCHAPIRA, 2011).

A principal característica patológica da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* e a presença de inclusões intracitoplasmáticas da proteína α -sinucleína (conhecidas como corpos de Lewy) nos neurônios remanescentes (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). Há íntima relação entre essa estrutura e o distúrbio psicomotor devastador, que, embora descrito pela primeira vez por James Parkinson em 1817, levou mais de dois séculos para ser elucidado (PARENT M.; PARENT A., 2010). A causa da morte neuronal na DP é ainda hoje desconhecida, havendo diversas hipóteses; entre elas, a ação de neurotoxinas ambientais, a produção de radicais livres, anormalidades mitocondriais e a predisposição genética (KLEIN, 2006).

A perda celular de neurônios da substância negra provoca graves déficits na estimulação dopaminérgica do corpo estriado que desencadeia uma cascata de alterações funcionais no circuito de núcleos da base, resultando nos sintomas motores típicos da doença, como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural (BLANDINI et al., 2000).

Quando os sinais e sintomas motores são detectados na DP, provavelmente já ocorreu a perda de aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos e o conteúdo de dopamina no corpo estriado é em torno de 80% inferior ao normal (SHIMIZU; OHNO, 2013).

Vários sintomas não-motores também são vistos na DP, como declínio cognitivo, déficits de aprendizagem e memória, além de transtornos do humor, depressão e ansiedade (MEIRELES, MASSANO, 2012). Alguns sintomas não-motores podem preceder as manifestações motoras da DP, como é o caso dos distúrbios gastrointestinais e da perda parcial do olfato, considerados sintomas prodrômicos da DP (JAIN, GOLDSTEIN 2012; BONNET et al., 2012).

O tratamento da DP é apenas sintomático. Atualmente, a terapia farmacológica baseia-se principalmente em uma estratégia de substituição da dopamina por um precursor de dopamina, a L-3,4-dihidroxifenilalanina (Levodopa®). A levodopa é eficaz para praticamente todos os pacientes, particularmente nas fases iniciais da doença e tem proporcionado benefícios para milhões de pacientes com a DP, tendo revolucionado o tratamento desta desordem (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). Mesmo sendo de primeira escolha no tratamento da DP, em médio ou longo prazo, a limitação de seu uso se dá devido à perda da eficácia, flutuações no desempenho motor e distúrbios cognitivos associados (OLANOW; STERN; SETHI, 2009). Outros fármacos podem ser associados à levodopa na tentativa de amenizar tais complicações. Apesar da melhoria do tratamento moderno os pacientes continuam a sofrer com os sintomas da doença (OLANOW; SCHAPIRA, 2013).

Nesse sentido, é de suma importância o desenvolvimento de um tratamento neuroprotetor que retarde a progressão da doença e traga benefícios sobre a gama completa de características dopaminérgicas e não-dopaminérgicas da doença. Os fármacos que estão disponíveis ou em desenvolvimento são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, a indicação de alvo e a fase de desenvolvimento (SCHAPIRA et al., 2014).

Muitos avanços importantes têm sido feitos em relação às vias que levam à disfunção e morte celular na DP. Esses avanços foram descobertos pela análise direta do cérebro *post-mortem* e pelo estudo das causas genéticas da doença. Algumas das vias que têm sido estudadas até o momento incluem: a função mitocondrial, o estresse oxidativo, as vias de

cinases, a regulação do cálcio, a inflamação, a agregação de proteínas e os processos relacionados ao prion. Na DP, estes alvos são agentes que podem melhorar a função mitocondrial ou aumentar a degradação das mitocôndrias defeituosas, bloquear os canais de cálcio e interferir com o enovelamento incorreto, modelagem, e transmissão de α -sinucleína (SCHAPIRA et al, 2014).

Estas considerações levaram a uma extensa investigação, nos últimos anos, para identificar novos agentes farmacológicos com o potencial de modificar o curso da doença. Portanto, é essencial conhecer os vários tipos de terapias existentes para a DP e este trabalho tem por objetivo analisar os novos medicamentos e alvos farmacológicos que estão sendo utilizados e pesquisados para o tratamento da DP, e qual o seu impacto na vida dos seus portadores, por meio de uma revisão bibliográfica.

2 MÉTODOS

Trata-se de um estudo de levantamento bibliográfico, descritivo e retrospectivo com evidência nos últimos 10 anos com objetivo de analisar os novos alvos farmacológicos para tratamento da DP, foram incluídos no trabalho os artigos considerados de grande relevância para o tema e excluídos aqueles que não apresentavam clareza e adequação ao tema.

Para realização deste trabalho foi realizado um levantamento nas bases de dados como a Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Literatura Internacional em Ciência da Saúde (MEDLINE) e Publicações Médicas (PUBMED), sendo utilizada a língua inglesa. Os termos usados para a pesquisa foram: “*Parkinson's disease*”, “*new treatments for Parkinson's disease*”, “*new pharmacological targets for Parkinson's disease*”, “*protein aggregation and Parkinson's disease*”, “*mitochondrial function and oxidative stress in Parkinson's disease*”, “*apoptosis in Parkinson's disease*”, “*calcium channel blockers in Parkinson's disease*”, “*5HT1A receptor in Parkinson's disease*”.

Esses critérios de busca foram satisfatórios para atender os objetivos do trabalho.

3 CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

Em 1817, o médico James Parkinson publicou a primeira descrição de um distúrbio neurológico, que é agora reconhecido pelo seu nome, a doença de Parkinson. Sua monografia, intitulada “*Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante*”, descreve cinco casos de indivíduos com paralisia agitante, um termo que foi vagamente empregado por médicos escritores na época. Ele comentou que quando os primeiros sintomas são percebidos, há uma ligeira sensação de fraqueza, com tendência de tremer alguma parte específica; as vezes, a cabeça, mas geralmente uma das mãos ou um dos braços. Estes sintomas aumentam gradualmente na primeira parte afetada; e por um período incerto, a influência mórbida é sentida em alguma outra parte (GUILARTE, 2010).

“Parkinson passou a dizer que, com a doença avançando, caminhar torna-se uma tarefa que não pode ser realizada sem uma atenção considerável. À medida que a doença desenvolve, a propensão para inclinar para a frente torna-se invencível, e o paciente é assim forçado a pisar nos dedos do pé e na parte anterior do pé, enquanto que a parte superior do corpo é jogada agora para a frente tornando mais difícil a caminhada, sendo obrigados a dar passos mais rápidos e mais curtos, e, assim, adotar a contragosto um ritmo de corrida. Em seguida, descreveu as fases posteriores, conforme a doença prossegue em direção a sua última etapa: o tronco está inclinado quase permanentemente, a potência muscular é decididamente diminuída e a agitação trêmula torna-se violenta. Suas palavras são agora dificilmente inteligíveis, e o indivíduo não é mais capaz de alimentar-se” (GUILARTE, 2010).

A DP é uma doença neurológica progressiva, sendo a principal causa de parkinsonismo. O parkinsonismo é uma síndrome definida pela presença de bradicinesia e mais um dos seguintes sintomas: tremor, rigidez e instabilidade postural. O termo parkinsonismo refere-se a uma vasta categoria de doenças que apresentam sintomas semelhantes à DP, é patologicamente heterogêneo, com os substratos patológicos mais comuns relacionadas a anormalidades na proteína pré-sináptica α -sinucleína ou à ligação de microtúbulos da proteína tau. Entre os tipos de parkinsonismo destacam-se a DP primária ou idiopática, o parkinsonismo secundário e, por último, os parkinsonismos atípicos. Na DP, a α -sinucleína acumula-se em corpos de Lewy e neuritos de Lewy (DICKSON, 2012). Nos

critérios do Banco cerebral de Londres, é necessário a presença de corpos de Lewy (que são compostos em grande parte da proteína α -sinucleína) na substância negra *pars compacta* para um diagnóstico patológico de DP. Mais de 90% das pessoas autopsiadas que preencham os critérios clínicos completos para DP terão corpos de Lewy na substância negra *pars compacta* (HUGHES et al., 2001). Já o parkinsonismo secundário pode ser transitório e pode ser causados pelo uso de medicamentos, efeitos de toxinas, distúrbios metabólicos ou drogas. O parkinsonismo atípico (também chamado de parkinsonismo *plus*) refere-se a doenças que incluem parkinsonismo combinado com outros sinais clínicos. Estes incluem demência com corpos de Lewy, atrofia de múltiplos sistemas, paralisia supranuclear progressiva, e degeneração corticobasal (MARK, 2001). O conceito de parkinsonismo *plus* é confuso, pois a maioria dos pacientes com DP também têm características clínicas não parkinsonianas, como disfunção autônoma, distúrbios do sono, e, eventualmente, demência (LANGSTON, 2006).

Como dito anteriormente, os sintomas motores típicos da DP são bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural (BLANDINI et al., 2000). Bradicinesia é a lentidão de movimentos ou dificuldade em iniciar e executar movimento, e é um dos sinais essenciais utilizados no diagnóstico da DP (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). A rigidez é caracterizada pelo aumento da resistência dos membros, com o aumento da resistência os músculos se tornam tensos e contraídos de modo que a pessoa se sente rígida e fraca. Instabilidade postural é a perda de reflexos posturais, e isso ocorre nas fases mais tardias da doença (GUILARTE, 2010). O tremor em repouso na DP tem uma frequência de 3-5 Hz, afetando as mãos, cabeça e outras partes do corpo. Em geral, é o sintoma mais precoce e facilmente reconhecido da DP (SHIMIZU; OHNO, 2013).

Em casos mais avançados, os pacientes exibem congelamento da marcha resultado de uma depleção de noradrenalina central, o que pode ser melhorado por tratamento com o precursor da noradrenalina, que é a droxidopa (L-treo-3,4-dihidrofenilserina) (MEIRELES; MASSANO, 2012). O diagnóstico da DP é clínico. Outras causas de parkinsonismo devem ser excluídas e uma boa resposta à terapia com levodopa e assimetria dos sintomas auxiliam no diagnóstico. A confirmação do diagnóstico da DP é *post-mortem*, com a observação das características patológicas da doença, não havendo atualmente nenhum teste ou biomarcador que consiga revelar de modo confiável o diagnóstico *ante-mortem*. O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para retardar ao máximo o avanço da doença (GUILARTE, 2010).

Apesar de a DP ser considerada um distúrbio de movimento, alguns sintomas não motores também são comuns, incluindo prejuízos cognitivos (déficits de aprendizagem e

função executiva), transtornos do humor (depressão e ansiedade), distúrbios do sono e disfunção autonômica (hipotensão ortostática e constipação) (MEIRELES; MASSANO, 2012). Perda do olfato e perturbações do sistema nervoso autônomo também estão presentes (REICHMANN, 2011).

A alteração patológica primária que origina os sintomas motores da DP é a morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta*. A perda na liberação de dopamina resulta numa diminuição da atividade através da via direta e um aumento da atividade através da via indireta (ALBIN et al., 1989; WICHMANN; DELONG, 1997). Estas mudanças levam ao aumento da inibição de neurônios tálamo-corticais, que se crê ser a causa dos sintomas da doença: rigidez, bradicinesia e discinesia (ROUSE et al., 2000).

Os núcleos basais formam uma rede complexa que integram regiões cerebrais (associativas, óculo-motoras, límbica e motora), núcleos da base e 'circuito motor' do tálamo, que é o circuito que está diretamente relacionado com a fisiopatologia das desordens do movimento (OBESO et al., 2000). Os núcleos basais são formados por cinco núcleos subcorticais principais: putâmen, núcleo caudado, globo pálido, núcleo subtalâmico, córtex e substância negra. Os núcleos basais desempenham um papel na iniciação de movimentos voluntários, facilitação de algum movimento em supressão a outros e coordenação dos comandos motores por *feedback* de evolução movimento (BROWN; MARSDEN, 1998). A principal entrada excitatória para o núcleo basal ocorre a partir do córtex motor. O córtex envia projeções excitatórias para o estriado, principal núcleo de entrada do núcleo basal, especialmente para o putâmen (BERGMAN et al., 1990; DELONG, 1990). A partir do putâmen, metade dos neurônios são projetados para o globo pálido *pars interna* (GPi) e para a substância negra *pars reticulata* (SNr), os núcleos de saída dos núcleos basais (GERFEN et al., 1995). Isso é chamado de via direta e fornece controle inibitório direto sobre os núcleos da base (BERGMAN et al., 1990; DELONG, 1990). Os neurônios nesta via possuem receptores D1 de dopamina. Esta via proporciona um efeito inibitório direto (gabaérgico) em neurônios GPi / SNr, reduzindo o efeito inibitório destes núcleos no tálamo, facilitando assim o movimento (GERFEN et al., 1995). A outra metade dos neurônios de projeção do estriado participam da via indireta. Na via indireta, neurônios gabaérgicos se projetam para inibir as células gabaérgicas do globo pálido *pars externa* (GPe). As células do GPe exercem normalmente controle inibitório tônico sobre células glutamatérgicas do núcleo subtalâmico (STN), mas a ativação da via gabaérgica estriato-palidal leva a uma desinibição do STN. Isto permite a transmissão excitatória entre o STN e os núcleos de saída dos núcleos da basais, o

GPI / SNr, inibindo assim células tálamo-corticais (BERGMAN et al., 1990; DELONG, 1990). Estes neurônios contêm receptores D2 (GERFEN et al., 1995).

As vias direta e indireta dos núcleos da base controlam o movimento através de um mecanismo bem ajustado (ALEXANDER et al., 1986). O saldo de transmissão das vias direta e indireta é estreitamente regulado por um importante fator, a projeção dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. Esta entrada de dopamina no corpo estriado regula as vias direta e indireta diferencialmente, devido à presença de diferentes receptores de dopamina pós-sinápticos nas duas populações de neurônios (GERFEN et al., 1990). Por causa dessa expressão diferencial, a liberação de dopamina no estriado tem um efeito excitatório líquido na via direta, e uma influência inibitória sobre a via indireta (ROUSE et al., 2000).

Vários tipos de tratamento são indicados no caso da DP. Entre eles estão o farmacológico, o fisioterapêutico, o cirúrgico, entre outros. O tratamento farmacológico é indicado (tabela 1). Mesmo não existindo terapias disponíveis para alterar o processo neurodegenerativo, existem terapias que tratam os sintomas que podem melhorar a qualidade de vida do paciente por muitos anos (CONNOLLY; LANG, 2014).

TABELA 1: Principais medicamentos utilizados para tratamento da doença de Parkinson

Fármaco (princípio ativo)	Mecanismo de ação
Levodopa	Precursora da dopamina
Bromocriptina	Agonista dopaminérgico
Lisuride	Agonista dopaminérgico
Pramipexol	Agonista dopaminérgico
Pergolida	Agonista dopaminérgico
Ropinirol	Agonista dopaminérgico
Amantadina	Antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA / Aumento da síntese e liberação de dopamina
Selegilina \ L-deprenil	Inibidor da MAO-B
Tolcapone	Inibidor da COMT
Entacapone	Inibidor da COMT

A levodopa é o fármaco mais eficaz para tratar os sintomas motores da DP. Quando administrada sozinha, a levodopa é convertida periféricamente pela dopa-descarboxilase (DDC) em dopamina. A administração combinada de levodopa com um inibidor da DDC (IDDC), benserazida ou carbidopa, reduz a conversão periférica de levodopa em dopamina, diminuindo assim os efeitos colaterais mais comuns como náuseas, vômitos e efeitos cardiovasculares (GASCOIGNE, 2012). A combinação destes fármacos aumenta a meia-vida da levodopa em aproximadamente 60 a 90 minutos, aumentando sua biodisponibilidade no cérebro, uma vez que, ao contrário da dopamina, a levodopa ultrapassa a barreira hematoencefálica (HAUSER; LAUREN, 2009).

A levodopa, em combinação com um IDDC, geralmente proporciona uma melhora significativa das características motoras da DP, mas o seu uso prolongado está associado ao desenvolvimento de flutuações motoras e discinesias, especialmente em indivíduos mais jovens (HAUSER; LAUREN, 2009). Depois de alguns anos de tratamento, ocorrem complicações motoras, particularmente flutuações motoras, com o pico da dose tais como fenômenos *on-off*, quando a rigidez e hipocinesia agravam-se subitamente podendo durar poucos minutos ou até mesmo horas; e vários tipos diferentes de discinesias induzidas pela levodopa, como coreia, distonia e atetose, o que limita a sua utilidade (JANKOVIC, 2005). Discinesia consiste em dois componentes: a execução de movimentos involuntários em resposta à administração de drogas, e o fenômeno de congelamento que dificulta o estabelecimento e persistência dos movimentos (JENNER, 2008; NADJAR et al., 2009). A fisiopatologia precisa destes efeitos motores não é definida. Achados clínicos e experimentais indicam que a discinesia está associada com anormalidades relacionadas à funcionalidade de sistemas de neurotransmissores que levam a alterações na taxa de liberação dos mesmos e padrão de sincronização de atividade neuronal no interior e no exterior dos núcleos da base (BROTCHIE, 2005; CENCI, 2007; JENNER, 2008).

Além da levodopa, estão disponíveis outros medicamentos que melhoram significativamente a maioria dos sintomas (RASCOL et al., 2002). Entre eles, agonistas da dopamina, que atuam diretamente sobre o receptor de dopamina; inibidores da monoamina-oxidase-B (MAO-B), que aumentam os níveis de dopamina sinápticas por bloqueio do metabolismo oxidativo da dopamina central; e inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT), os quais aumentam a meia-vida de eliminação e a biodisponibilidade da levodopa bloqueando seu metabolismo (OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

A bromocriptina, pergolida, cabergolina, ropinirol e talipexole são agonistas de D2 (D2 / D3) e estimulam diretamente estes receptores. A amantadina age aumentando a

liberação de dopamina e como antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA. Outros fármacos incluem o inibidor da MAO-B, a selegilina e inibidor de COMT, entacapona, que são úteis como medicamentos coadjuvantes à levodopa, potencializando sua ação (SHIMIZU; OHNO, 2013).

Tem se obtido avanços na compreensão das causas da DP, nos tratamentos disponíveis e como estes são melhor aplicados para tratamento a longo prazo dos pacientes. Novos genes causadores da DP foram descobertos e mecanismos que levam à disfunção e morte celular foram identificados. O pródromo da DP é agora um assunto de grande interesse e marcadores clínicos estão sendo definidos para que possam, no futuro, juntamente com marcadores bioquímicos, apoiar um diagnóstico pré-motor precoce de DP. Isto torna-se importante à medida que novas terapias são desenvolvidas para modificar a progressão da doença. Assim, a otimização de terapias existentes continua a ser uma prioridade importante (SCHAPIRA et al., 2009).

4 PERSPECTIVAS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

4.1 Bloqueadores de canais de cálcio

Existem evidências crescentes de que a desregulação da homeostase do cálcio intracelular desempenha um papel importante na patogênese da DP. A via de cálcio cruza com a função mitocondrial e estresse oxidativo, mecanismos envolvidos na patogênese da DP (MATTSON, 2012; DAVEY; BOLANOS, 2013).

O cálcio é essencial para a fisiologia celular normal e a função das células excitáveis. O gradiente de íon cálcio através das células é mantido pela ativa extrusão de Ca^{2+} para o espaço extracelular através de ATPase transportadora de Ca^{2+} da membrana plasmática, pela bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ou pelo sequestro para organelas intracelulares (retículo sarcoplasmático e endoplasmático) pela bomba ATPase. O bombeamento de cálcio requer substancialmente mais energia do que a troca de sódio ou de potássio (SURMEIER; SCHUMACKER, 2013).

A homeostase do cálcio, a atividade do receptor, e a capacidade do cálcio de **causar** o estresse oxidativo são reconhecidos como contribuintes potenciais para a patogênese da DP e alvos potenciais para intervenção terapêutica (SURMEIER, 2007).

Canais de cálcio voltagem dependentes (Ca_v) regulam a atividade elétrica neuronal e modulam a liberação de neurotransmissores por qualquer influxo de Ca^{2+} em células após a despolarização da membrana ou liberação de reservas intracelulares. Canais de cálcio voltagem dependentes tem três subtipos principais: Ca_v1 ou tipo-L; Ca_v2 ; e Ca_v3 (HURLEY; DEXTER, 2012). As isoformas de canal Ca_v1 e Ca_v2 ativam a despolarização da membrana a uma voltagem elevada e produzem correntes de cálcio de longa duração, enquanto os canais Ca_v3 despolarizam a membrana, abrindo os canais a uma voltagem baixa e produzindo correntes transitórias de Ca^{2+} (SCHAPIRA, 2013).

Neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* têm propriedades neurofisiológicas distintas (SURMEIER, 2007). São autonomamente ativos e geram atividade contínua de baixa frequência, na ausência de entrada sináptica de Ca^{2+} nos canais do tipo-L. Esses neurônios têm uma subunidade $\text{Ca}_v1.3$ de formação de poros, com baixa afinidade para diidropiridinas e abrem a membrana hiperpolarizada com potencial maior do que os canais $\text{Ca}_v1.2$. Há evidências de que, ao longo do tempo, neurônios dopaminérgicos da substância negra desenvolvem uma dependência crescente dos canais de cálcio $\text{Ca}_v1.3$ do tipo-L para manter a sua atividade autônoma e isso tem um custo bioenergético significativo (CHAN et

al., 2007). Esta dependência pode ser revertida pelo bloqueio destes canais com agentes bloqueadores dos canais de cálcio. O tratamento com a isradipina dihidropiridina uma droga muito bem tolerada, amplamente utilizada no tratamento da hipertensão e acidente vascular cerebral (GROSSMAN et al., 1991; JOHNSON et al., 2011) é uma estratégia de neuroproteção. Um estudo com pacientes hipertensos sugere que o uso de dihidropiridina pode diminuir a incidência de DP em 30 a 50% (RODNITZKY, 1999). A diminuição da vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* deve não só reduzir a incidência de DP, mas também retardar sua progressão (CHAN et al., 2007).

A necessidade de manter a homeostase do cálcio inclui a coordenação de bombas do retículo endoplasmático e a absorção de cálcio para dentro da mitocôndria. Os canais $Ca_v1.3$ geram estresse oxidativo mediado por mitocôndrias durante a atividade autônoma, que, por sua vez, induz desacoplamento mitocondrial como um mecanismo de proteção (GUZMAN et al., 2010). Inibidores seletivos dos canais $Ca_v1.3$ têm sido desenvolvidos e oferecem uma nova abordagem para a terapia modificadora da DP (KANG et al., 2012).

Fisiologicamente, nem a expressão de subtipos Ca_v1 nem a distribuição de proteínas de ligação de cálcio estão associadas com regiões propensas à neurodegeneração na DP. Na substância negra *pars compacta* de adultos existe um claro domínio de expressão $Ca_v1.2$ e isto ocorre predominantemente em células positivas à tirosina hidroxilase. Na substância negra *pars compacta* de pacientes com DP menos neurônios expressam canais Ca_v1 , mas a expressão total de $Ca_v1.2$ permanece estável e há um aumento de $Ca_v1.3$, indicando uma maior densidade de canais em cada célula sobrevivente. Em geral, existem diferenças regionais na expressão de subtipos Ca_v1 no cérebro normal e estes alteram significativamente na DP. Na DP, o aumento da expressão do subtipo Ca_v1 precede a patologia da doença em áreas específicas, por exemplo, o córtex, e há uma alteração na proporção de $Ca_v1.2$ para $Ca_v1.3$ em favor de uma maior utilização de canais $Ca_v1.3$. Como observado acima, isso impõe uma maior carga bioenergética nesses neurônios e os torna mais suscetíveis à excitotoxicidade e / ou estresse oxidativo (SCHAPIRA, 2013).

No entanto, o padrão de neurônios utilizando subtipos Ca_v1 no cérebro controle não reproduz a instabilidade neuronal da DP. Nem o relativo uso neuronal de $Ca_v1.3$ em comparação com $Ca_v1.2$ correlaciona-se com a instabilidade neuronal; a substância negra *pars compacta* tem uma das mais baixas relações de $Ca_v1.3$ para $Ca_v1.2$, embora esta área seja marcada por neurodegeneração na DP. A expressão alterada de subtipos de canais de cálcio voltagem-dependentes na substância negra *pars compacta* na DP é de particular interesse. A mudança na expressão de canais de Ca^{2+} poderia refletir um mecanismo de compensação ou,

alternativamente, um fenótipo pré-existente tornando o paciente susceptível ao desenvolvimento da DP. Se assim for, a medição de $Ca_v1.2$ e a expressão de $Ca_v1.3$ em linfócitos pode servir como um biomarcador para a susceptibilidade à doença (SCHAPIRA, 2013).

Mais recentemente, tornou-se evidente que a regulação do cálcio também interage com a função do retículo endoplasmático e a resposta do desdobramento da proteína (MATTSON, 2012; DAVEY; BOLANOS, 2013).

Os lisossomos são identificados como componentes importantes na homeostase do cálcio e acredita-se que a disfunção lisossomal desempenhe um papel na DP (TOFARIS, 2012). O metabolismo da dopamina exacerba o aumento mediado por cálcio em estresse oxidativo, o que torna os neurônios da substância negra *pars compacta* mais vulneráveis a esse processo (SCHAPIRA, 2013).

O que é particularmente atraente sobre a hipótese do envolvimento do cálcio na fisiopatologia da DP é que ele pode representar um alvo adequado para a intervenção terapêutica destinada a atrasar o progresso da doença. Dados epidemiológicos suportam o conceito de que a dihidropiridina, um bloqueador do canal de cálcio Ca_v1 , pode reduzir o risco de desenvolver a DP (PASTERNAK et al., 2012). Até o momento, não há bloqueadores potentes ou seletivos de canais $Ca_v1.3$, mas modificações do pirimidino-2,4,6-trionas foram recentemente identificadas como potenciais candidatos em triagens de fármacos (KANG et al., 2012). O que é interessante sobre a estratégia de bloquear dos canais de cálcio é que o benefício pode se estender além dos neurônios dopaminérgicos, e, portanto, abordar os não-dopaminérgicos que causam tantos problemas nos estágios mais avançados da doença (GOLDBERG et al., 2012). O processo que permite a aplicação prática de tais fármacos e sua utilização em ensaios clínicos para a prática médica, é, no entanto, complexo e desafiador (SCHAPIRA, 2013).

4.2 Função mitocondrial e estresse oxidativo

Defeitos da cadeia respiratória (complexo I), o aumento da acumulação de mutações no DNA mitocondrial, a homeostase anormal do cálcio mitocondrial, a remoção autofágica da mitocôndria defeituosa (mitofagia), e o aumento do estresse oxidativo estão envolvidos na patogênese da DP (SCHAPIRA, 2008). Tentativas anteriores de intervir em algum destes

caminhos para doenças mitocondriais falharam ou obtiveram poucos benefícios (SCHAPIRA et al., 2014).

A atividade respiratória mitocondrial do complexo I (NADH: quinona oxidoreductase) está diminuída na substância negra *pars compacta* dos pacientes com DP. Utilizando mitocôndrias altamente purificadas, foi demonstrado que um déficit específico de complexo I na DP também pode ser detectado no córtex frontal (PARKER et al., 2008). Além disso, uma deficiência mais branda do complexo I foi observada em plaquetas e no músculo esquelético de indivíduos afetados pela DP. Várias subunidades catalíticas de complexo I conduzem o aumento dos níveis de carbonilos proteicos (uma modificação oxidativa de proteínas) no cérebro de indivíduos com DP, o que se correlacionou com a redução das taxas de transferência de elétrons, sugerindo que o dano oxidativo excessivo de subunidades do complexo I pode levar à quebra e disfunção do complexo I (KEENEY et al., 2006).

A DP genética é caracterizada por uma diminuição na atividade sistêmica do complexo I. No entanto, parece que a substância negra *pars compacta* é mais vulnerável a prejuízos de atividade do complexo I do que as outras regiões do cérebro e órgãos periféricos, possivelmente devido ao alto teor de ferro e ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio geradas dentro dos neurônios dopaminérgicos, resultado do metabolismo desse neurotransmissor (CHINTA; ANDERSEN, 2008). Além disso, estudos em camundongos demonstraram que a massa de mitocôndrias é inferior em neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, em comparação com neurônios dopaminérgicos localizados nas adjacências da área tegmental ventral, ou células não-dopaminérgicas do mesencéfalo (LIANG et al., 2007). Caso em humanos a massa de mitocôndrias também seja inferior em neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, isso pode contribuir para o aumento da vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* por inibir o complexo I e colaborar para degeneração seletiva desses neurônios na DP (BÜELER, 2009).

Informações sobre as vias de divisão, fusão mitocondrial (CHEN; CHAN, 2009) e destruição por autofagia/mitofagia vieram de estudos em que os investigadores avaliaram a função das proteínas codificadas pelo Parkin e genes PINK1, que causam a DP autossômica recessiva (ASHRAFI; SCHWARZ, 2013). Estudos recentes têm mostrado que PINK1 e Parkin desempenham um papel crucial na regulação da dinâmica e função mitocondrial (BÜELER, 2009). As mutações em Parkin e genes PINK1 reduzem a rotatividade de mitocôndrias e proteínas na cadeia respiratória (VINCOW et al., 2013). O acúmulo de proteínas danificadas na cadeia respiratória mitocondrial pode contribuir para os defeitos

bioenergéticos em doenças neurodegenerativas. A observação de que a expressão da proteína autofágica se encontra reduzida no cérebro afetado pela DP apoia ainda mais a importância das vias de autofagia/mitofagia para a patogênese da doença. Tratamentos que possibilitem a remoção das mitocôndrias defeituosas poderiam melhorar ou restaurar a função neuronal (TAIN et al., 2009). O comprometimento da motilidade mitocondrial como consequência de defeito na divisão e fusão, ou anormalidades de axônios motores para o transporte das mitocôndrias, poderiam levar à deficiência da função sináptica e até mesmo a uma regeneração axonal que seria muito relevante para o tratamento da DP (WANG et al., 2011).

Modelos animais demonstraram que mutações no gene Parkin aumentam a susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, fenômenos envolvidos na DP genética, apoiando a hipótese de que alguns casos de DP podem ser causados por interações genéticas com fatores ambientais. Uma pequena proporção de α -sinucleína é importada para mitocôndrias, onde se acumula nos cérebros de pacientes com DP e pode prejudicar a atividade respiratória do complexo I. Acumulação clonal e deleções somáticas no DNA mitocondrial foram observadas na substância negra durante o envelhecimento e na DP, o que sugere que as mutações no DNA mitocondrial, podem predispor à morte de neurônios dopaminérgicos ao alterar o processo respiratório. Além de comprometer a produção de energia celular, a disfunção mitocondrial está associada com a geração de estresse oxidativo; e indução de apoptose, especialmente no estresse celular (BÜELER, 2009).

O esquema para manutenção da integridade mitocondrial por genes PINK1 inclui a regulação da atividade ou da localização subcelular de proteínas-alvo (Parkin, TRAP1 e HtrA2/Omi), direta ou indiretamente, controlando sua fosforilação. O papel das proteínas alvo ativadas é manter a homeostase mitocondrial e prevenir a apoptose em condições de estresse oxidativo. A fosforilação de Parkin aumenta a degradação das mitocôndrias disfuncionais e substitui as mitocôndrias disfuncionais através da promoção da biogênese mitocondrial. Devido a ubiquitinação desempenhar um papel importante na regulação da dinâmica mitocondrial (KNOTT et al., 2008), a ubiquitina ligase ligada ao Parkin também pode controlar os níveis e a atividade de proteínas de divisão e fusão mitocondriais, tais como Drp1, OPA1 e Mfn2. Além disso, Parkin poderia ubiquitinar proteínas pró-apoptóticas em mitocôndrias para impedir a apoptose. A fosforilação de TRAP1 é proposta para atuar como uma acompanhante impedindo o enrolamento incorreto da proteína e desmontagem de complexos respiratórios em mitocôndria durante o estresse oxidativo. Finalmente, a protease HtrA2 poderia degradar proteínas mitocondriais deformadas e oxidadas e / ou ativar uma via

de sinalização por clivagem proteolítica de uma proteína de resposta ao estresse iniciador mitocondrial, a fim de proteger mitocôndrias e células da apoptose (ALNEMRI, 2007). O gene PINK1 pode regular a função TRAP1 constitutivamente, enquanto que o aumento da atividade de protease HtrA2 requer sinais adicionais, tais como a estimulação da via de estresse p38 (PLUN-FAVREAU et al., 2007). Como a perda de função PINK1 está associada com o prejuízo do potencial de membrana mitocondrial (WOOD-KACZMAR et al., 2008), Parkin pode ser recrutado para mitocôndrias disfuncionais como uma consequência de deficiência de PINK1 numa tentativa de transformar mitocôndrias defeituosas por mitofagia (BÜELER, 2009).

Aumentos do conteúdo mitocondrial neuronal poderiam compensar defeitos bioenergéticos em neurodegeneração. Proliferador de receptor de peroxissoma γ (PPAR- γ) e coativador-1 α (PGC-1 α) são importantes reguladores da função mitocondrial e agem com SIRT1 para regular positivamente a biogênese mitocondrial (BLANDER; GUARENTE, 2004). Ativadores de PPAR- γ , incluindo o resveratrol e fármacos já utilizados no tratamento de diabetes (por exemplo, a rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona) aumentam substancialmente a biogênese mitocondrial (HOWLTZ et al., 2003).

Resveratrol e benzafibrato, outro agonista PGC-1 α , têm se mostrado protetores contra 6-hidroxi dopamina em modelos animais com diminuição de dopamina (KHAN et al., 2010). No entanto, uma estratégia de reforço da biogênese mitocondrial precisaria ser avaliada com cuidado para evitar o aumento do teor de mitocôndrias disfuncionais com, por exemplo, uma carga elevada de mitocôndrias mutantes no DNA, o que provavelmente iria agravar as consequências da disfunção mitocondrial. Reguladores do complexo I têm sido sugeridos como possíveis alvos para a intervenção (ALVAREZ-FISCHER et al., 2011). A atenção recentemente tem sido focada no peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), que se origina nas células L do intestino. O GLP-1 e o peptídeo exendina-4 (EX-4) promovem o crescimento celular, aumentam a biogênese mitocondrial, reduzem a apoptose, e pode ser anti-inflamatória embora o modo preciso de ação permanece incerto (AVILES-OLMOS et al., 2013).

4.3 Doença de Parkinson e α -sinucleína

A hipótese termodinâmica para o enovelamento proteico fundamenta-se no fato de que, durante o enovelamento, há uma diminuição da energia livre até que seja alcançada uma estrutura correspondente ao mínimo de energia livre global, a despeito da existência de

mínimos locais de energia (estados metaestáveis) – que correspondem a estruturas cineticamente estáveis. Entre os fatores que contribuem para o enovelamento proteico estão o efeito hidrofóbico (EH) (MEYER; ROSENBERG; ISRAELCHVILI, 2006), relacionado com o aumento de entropia, que ocorre quando resíduos hidrofóbicos são removidos do contato com a água, e a formação de ligações de hidrogênios (LH) intramoleculares envolvendo tanto grupos polares da cadeia principal como também das cadeias laterais, quando estes não estão expostos à água. Assim, estes dois fatores, EH e LH, em maior ou menor extensão, contrabalançam a perda de entropia conformacional (EC) associada aos graus de liberdade da molécula que são muito reduzidos durante o enovelamento. A estrutura nativa da proteína é marginalmente mais estável que as estruturas desenoveladas (BOLEN; ROSE, 2008).

Em algumas condições, sendo elas: mutações, aumento da concentração da proteína ou presença de ligantes específicos, uma via alternativa para o enovelamento proteico pode ser favorecida, onde predominam interações intermoleculares ao invés de intramoleculares, levando à associação proteína-proteína e agregação. O enovelamento proteico incorreto ocorre predominantemente quando estados cineticamente estáveis (metaestáveis), que correspondem a intermediários do enovelamento, são favorecidos. Estes estados possuem um conteúdo elevado de resíduos hidrofóbicos expostos à água e, nesta situação, a interação proteína-proteína é acompanhada de um aumento de entropia (efeito hidrofóbico). O produto final de tal processo é, na maioria das vezes, caracterizado por uma alta estabilidade termodinâmica. Então, ao contrário do processo de enovelamento que é reversível, a agregação de proteínas é um processo irreversível (MOUSSEAU; DERREUMAUX, 2008).

O enovelamento incorreto de proteínas leva à formação de agregados proteicos bastante tóxicos para as células, e pode ser um mecanismo comum em várias doenças neurodegenerativas (CHITI; DOBSON, 2006). No caso da DP, a perda dos neurônios dopaminérgicos é acompanhada pelo desenvolvimento de inclusões intracelulares, chamadas de Corpos de Lewy, compostos principalmente por agregados fibrilares da proteína α -sinucleína (BREYDO; WU; UVERSKY, 2012). O acúmulo de agregados proteicos altamente insolúveis em inclusões intracelulares neuronais é uma característica da DP, bem como várias outras desordens neurodegenerativas associadas ao envelhecimento. Os agregados formados *in vitro* e *in vivo* geralmente têm uma morfologia fibrilar e são resistentes à degradação proteolítica (WANKER, 2000).

Nestas inclusões, a α -sinucleína apresenta-se ubiquitinada e fosforilada. O processo de ubiquitinação se dá durante a via de degradação de proteínas (via proteossomal), principalmente aquelas incorretamente enoveladas (LEE et al., 2011).

Agregação de α -sinucleína não é apenas um marcador de DP genética (ARAWAKA et al., 1998), mas um marcador confiável de diagnóstico de DP clássica (TRIMMER et al., 2004). Os corpos de Lewy contendo α -sinucleína mostraram estar envolvidos na perda de neurônios dopaminérgicos em todas as formas de DP (YU et al., 2010; TASCHEBERGER et al., 2012;). Embora, o mecanismo de agregação da α -sinucleína não seja claramente entendido, a disfunção de Parkin, uma ubiquitina-ligase E3, que medeia a transferência de ubiquitina para as proteínas expressas com caudas a serem eliminadas pelo sistema ubiquitina-proteossoma, pode ser associada à inibição da degradação de um proteossoma α -sinucleína, proteína que conduz à formação de agregados α -sinucleína (NUSSBAUM, 1998).

A α -sinucleína pode ser encontrada como um tetrâmero com estrutura em hélices ou na forma de um monômero desenovelado, o qual parece estar envolvido no processo de mau enovelamento e agregação. Na DP, o envolvimento da α -sinucleína é evidenciado, principalmente, pela presença de duas mutações, Ala30Pro e Ala53Thr, e estarem ligadas a casos da doença em pessoas mais jovens (FAUVET et al., 2012).

Ainda que α -sinucleína com estrutura fibrilar seja o maior componente dos corpos de Lewy, dados sugerem que estas estruturas podem ser inertes ou até mesmo protetoras na DP. Evidências recentes sugerem que a α -sinucleína atue nos terminais pré-sinápticos como uma chaperona na formação do complexo envolvendo a proteína receptora do fator de acoplamento sensível à etilmaleimida (SNARE - *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), desempenhando um papel fundamental na mediação do tráfego de vesículas nas células, principalmente na catálise do processo de fusão vesicular. Neste processo, a α -sinucleína se ligaria diretamente à proteína SNARE (sinaptobrevina-2) / VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein 2*), promovendo a formação do complexo. No entanto, a perda da α -sinucleína funcional, que ocorreria devido ao processo de agregação, poderia representar um evento crítico na neuropatogênese da DP sob o ponto de vista do mau enovelamento da proteína. Neste contexto, a prevenção do mau enovelamento / agregação da α -sinucleína seria o principal objetivo da intervenção farmacológica (BURREÉ et al., 2010).

Tem sido demonstrado que α -sinucleína na forma fibrilar ou protofibrilar é capaz de recrutar a α -sinucleína solúvel e causar danos à função sináptica dos neurônios, levando à neurodegeneração. Assim, moléculas capazes de se ligarem à α -sinucleína, estabilizando a espécie funcional (monômero desenovelado ou tetrâmero), prevenindo o processo de mau enovelamento e formação de fibras, poderiam representar potenciais fármacos antiparkinsonianos (VOLPICELLI-DALEY et al., 2011).

Em estudos com o objetivo de identificar moléculas capazes de inibir a formação de fibras amiloides de α -sinucleína foram encontrados catecois e hidroquinonas, incluindo dopamina, levopa, noradrenalina e adrenalina. Nestes estudos, a atividade inibitória da fibrilização de α -sinucleína por dopamina e levopa foi revertida pela adição de antioxidantes (metabissulfito de sódio), sugerindo que a forma oxidada destas moléculas era a responsável pelo efeito inibitório. Além de catecois, muitos flavonoides também inibem a formação de fibras de α -sinucleína. Dopamina e polifenóis são oxidados facilmente às suas formas quinonas, quando expostos ao oxigênio atmosférico (CARUANA et al., 2011). A exposição de células nervosas em cultura a oligômeros de α -sinucleína, fibrilas, e agregados de α -sinucleína podem induzir morte celular. As abordagens terapêuticas podem incluir inibidores de quinase, agentes que inibem a ubiquitinação, e polifenóis, tais como curcumin que se liga à α -sinucleína, fazendo com que a proteína resista à agregação e não haja formação de oligômero (CARUANA et al., 2011).

Follmer e colaboradores mostraram que a dopamina interage com α -sinucleína e modula diferentemente a estabilidade de agregados gerados a partir das formas selvagens ou mutantes da proteína (FOLLMER et al., 2007). Na ausência de dopamina, protofibras de α -sinucleína exibem estabilidades semelhantes quando submetidas à dissociação por pressão hidrostática. Entretanto, protofibras geradas a partir das variantes da α -sinucleína (Ala30Pro ou Ala53Thr), quando em presença de dopamina, apresentaram uma maior estabilidade quando comparadas às protofibras geradas a partir da forma selvagem da proteína. Assim, dopamina apresentaria um efeito estabilizador sobre as espécies intermediárias da agregação da α -sinucleína, supostamente mais tóxicas, somente quando estas são formadas pelas mutantes da proteína. Estes dados sugerem uma ligação entre as mutações na α -sinucleína, relacionadas com DP em indivíduos mais jovens, dopamina e a formação de protofibras. Muitos agentes antiparkinsonianos inibem ou retardam a formação de fibras tanto da α -sinucleína como do peptídeo β -amiloide. Além disso, estes compostos são capazes de desestabilizar fibras pré-existentes (ONO et al., 2006).

A selegilina previne ou retarda o processo de oxidação da dopamina, uma questão bastante importante é de que forma este fármaco influenciaria no sistema α -sinucleína-dopamina, quando estes dois fármacos, selegilina e levodopa, são combinados na terapia da DP. Diante dos dados mostrando o efeito da dopamina sobre a agregação da α -sinucleína já citados, uma abordagem de tratamento racional para DP deverá considerar a ação combinada destes fármacos na doença (FOLLMER et al., 2007).

Outros inibidores da MAO parecem apresentar efeito modulador sobre a fibrilação da α -sinucleína. Menadiona (vitamina K3) e 1,4-naftoquinona, inibidores reversíveis de MAO-A e MAO-B, modulam a cinética de agregação da α -sinucleína, inibindo a formação de fibras, o que resulta em agregados amorfos e pequenas fibras. Resultados semelhantes foram observados para as vitaminas K filoquinona (vitamina K1) e menaquinona (vitamina K2), embora estas moléculas não apresentem atividade sobre MAO. Menadiona e 1,4-naftoquinona também apresentam efeito desagregante, gerando principalmente fibras fragmentadas. No conjunto, estes dados sugerem que 1,4-naftoquinona parece se constituir uma molécula potencial para o desenvolvimento de fármacos que visem interferir tanto na formação/desagregação de fibras de α -sinucleína como na inibição reversível de MAO (SILVA et al., 2013).

Dentre os candidatos a agentes neuroprotetores, estão agentes que regulam positivamente proteínas de *heat-shock* envolvidas. Estas proteínas promovem redobragem de proteínas deformadas e agem como chaperonas para transferir as proteínas indesejadas para o proteossoma ubiquitina e sistema de autofagia-lisossoma para remoção. A regulação positiva experimental de proteínas de *heat-shock* com drogas, tais como geldanamicina, provou inibir a agregação de α -sinucleína e reduzir a neurodegeneração causada por sobre-expressão de α -sinucleína (AULUCK et al., 2002). No entanto, infelizmente esta classe de drogas está associada à toxicidade hepática (SCHAPIRA et al., 2014).

Outra abordagem é a utilização de estratégias que melhorem a eliminação de proteínas indesejadas. Proteínas indesejadas e mal dobradas são geralmente eliminadas pelos sistemas de proteossoma ubiquitina e autofagia-lisossomal, e a interferência com estes sistemas em laboratório leva à neurodegeneração associada com inclusões α -sinucleína-positivas. Fármacos como rapamicina que estimulam autofagia e depuração de proteínas, são protetores nestes modelos sistemáticos (BOVE; MARTINEZ-VICENTE; VILA, 2011). Outras abordagens podem incluir a transferência de genes de componentes de proteossoma ubiquitina ou lisossomais defeituosos ou ausentes. Alguns medicamentos, tais como glicocorticoides, ajudam na depuração de proteínas anormais e impedem o acúmulo de proteínas e, conseqüentemente a morte celular (SCHAPIRA et al., 2014).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo envelhecimento de α -sinucleína ainda não foram definidos, mas a identificação destes sinais poderia ser um importante alvo para potenciais agentes neuroprotetores (SCHAPIRA et al., 2014).

A imunoterapia com anticorpos monoclonais demonstrou reduzir os níveis de oligômeros (MASLIAH et al., 2011), e a vacinação com α -sinucleína humana reduziu a

formação de agregados em animais transgênicos (MASLIAH et al., 2005). Evidências mais recentes mostram que os anticorpos dirigidos especificamente contra α -sinucleína promovem a remoção de α -sinucleína extracelular pela microglia, e não removem células neuronais ou astrócitos (BAE et al., 2012).

Nocautes para α -sinucleína teriam uma quantidade restrita de proteína disponível para participar de qualquer reação de príon. Os agentes que são nocaute ou reduzem a expressão do tipo selvagem de α -sinucleína podem impedir a continuação da agregação desta proteína, degeneração neuronal, e transferência de células. O uso de RNA *interference* (RNAi) ou oligonucleótidos anti-sentido para reduzir α -sinucleína está sendo estudado (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011; EL-ANDALOUSSI et al., 2012). O papel fisiológico preciso da α -sinucleína não é conhecido, mas os animais nocaute parecem estar livres de graves déficits fisiológicos, e talvez apenas uma redução parcial ou de curto prazo seja necessária para interferir com a reação de príon e repor o equilíbrio da proteína (SCHAPIRA et al., 2014).

Embora o mecanismo preciso pelo qual a transferência ocorre não seja conhecido, os agentes que inibem a função de liberação lisossomal, aumento endossomal e absorção de α -sinucleína eliminando às células (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011), e agentes que bloqueiam a endocitose podem reduzir os danos mediados pela α -sinucleína em modelos experimentais (VOLPICELLI-DALEY et al., 2011). Pode, portanto, prever-se que novas drogas que inibam a endocitose poderiam reduzir a transmissão de α -sinucleína em pacientes com doença de Parkinson (SCHAPIRA et al., 2014).

4.4 Os receptores 5-HT_{1A}

O sistema serotoninérgico desempenha um papel crucial no controle de muitos processos fisiológicos, dentre eles o psicoemocional, sensorio-motor, cognitivo e funções autônomas (OHNO et al., 2012).

Os neurônios que secretam serotonina (5-HT), denominados serotoninérgicos, estão localizados nos núcleos da rafe, no tronco cerebral e enviam axônios para algumas regiões do cérebro, incluindo o córtex cerebral, áreas límbicas, núcleos basais, diencéfalo e na medula espinhal. A neurotransmissão serotoninérgica é mediada por múltiplos receptores de 5-HT que se dividem em, pelo menos, 14 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT_{5b}, 5-HT₆ e receptores de 5-HT₇), que podem ser classificados em 7 famílias (5-HT₁ a 5-HT₇) (OHNO et al., 2012).

A estimulação dos receptores 5-HT_{1A}, que são acoplados à proteína G_{i/o}, inibem a adenilato ciclase, a abertura de canais de potássio, a formação de AMP-c e reduz a atividade da proteína quinase A (PK-A) (PUCADYIL; KALIPATNAPU; CHATTOPADHYAY, 2005).

Na DP, tem sido relatada a perda de neurônios 5-HT em núcleos da rafe. Assim, o conteúdo de 5-HT e a densidade de transportadores de 5-HT (um marcador para terminais nervosos 5-HT) nas regiões do cérebro anterior (por exemplo, corpo estriado e neocórtex) são reduzidas em pacientes com DP. Alternativamente, os receptores pós-sinápticos de 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} são regulados positivamente em resposta ao déficit funcional de neurônios 5-HT (SHIMIZU, OHNO, 2013). Além disso, estudos clínicos recentes demonstraram que os doentes parkinsonianos com depressão mostram disfunção de neurônios 5-HT, em comparação com os pacientes sem depressão. Assim, existe uma relação estreita entre a disfunção do sistema serotoninérgico e DP (HUOT et al., 2012).

Os receptores 5-HT_{1A} funcionam tanto como autorreceptores pré-sinápticos no núcleo da rafe e como receptores pós-sinápticos em outras regiões do cérebro. Autorreceptores 5-HT_{1A} estão localizados nos dendritos dos neurônios serotoninérgicos na rafe, onde regulam negativamente a atividade de neurônios serotoninérgicos. Através desta função, os autorreceptores 5-HT_{1A} podem controlar a atividade global do sistema serotoninérgico. Por outro lado, os receptores pós-sinápticos de 5-HT_{1A} estão localizados em membranas de neurônios ou terminais nervosos inervados pelos neurônios serotoninérgicos (SHIMIZU, OHNO, 2013).

Agonistas do receptor 5-HT_{1A} tem um efeito antidepressivo em indivíduos com transtorno depressivo maior (MATSUBARA et al., 2006). Novas funções terapêuticas para os receptores 5-HT_{1A} no tratamento da DP foram demonstradas, estas incluem a modulação dos sintomas motores parkinsonianos, discinesia induzida por levodopa, deficiências cognitivas e vômitos. Assim, os agonistas de 5-HT_{1A} melhoram as várias perturbações motoras associadas a déficits dopaminérgicos, perturbações do humor (depressão e ansiedade) e vômitos induzidos por agonista da dopamina. Além disso, espera-se que os agonistas parciais de 5-HT_{1A} melhorem a disfunção cognitiva em pacientes com DP. Tais resultados estimulam a investigação de novas ligações do receptor 5-HT_{1A}, que melhorarão a eficácia e / ou as reações adversas no tratamento da DP (SHIMIZU, OHNO, 2013).

Estudos em humanos sugerem que a tandospirona, um agonista seletivo e altamente potente do receptor de 5-HT_{1A} usado clinicamente como um antidepressivo no Japão e na China, pode atuar como um medicamento antiparkinsoniano (MATSUBARA et al., 2006). Em um estudo realizado em animais, observou-se melhora na disfunção motora em ratos que

receberam uma injeção unilateral de 6-OHDA na via nigroestriatal através da estimulação de receptores 5-HT_{1A} em sistemas não-dopaminérgicos. Estes resultados sugeriram que a tandospirona pode atuar em receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} e modular as vias de aminoácidos excitatórios nos núcleos basais. Assim, a tandospirona pode ter um potencial terapêutico para o tratamento da DP pela modulação das vias não-dopaminérgicas (MATSUBARA et al., 2006).

A eficácia dos agonistas de 5-HT_{1A} em melhorar sintomas motores parkinsonianos parece ser tão boa quanto a dos agentes antiparkinsonianos atualmente utilizados. Além disso, uma vez que as ações antiparkinsonianas de agonistas 5-HT_{1A} ocorrem através de mecanismos não-dopaminérgicos, os agonistas 5-HT_{1A} parecem exercer ações antiparkinsonianas de forma aditiva com agentes dopaminérgicos atualmente utilizados (SHIMIZU; OHNO, 2013).

Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos e a eficácia clínica. Por conseguinte, é provável que os receptores 5-HT_{1A} são um alvo atraente para o tratamento de sintomas não-motores da DP. Finalmente, os agonistas 5-HT_{1A} parecem aliviar reações adversas relacionadas com o fármaco, como êmese induzida por agonista de dopamina, e outros já citados (SHIMIZU; OHNO, 2013).

Estes resultados estimulam a síntese de novos agonistas de 5-HT_{1A} com favorável seletividade de 5-HT_{1A} e propriedades farmacodinâmicas. Além disso, a concepção de compostos que possuem atividades combinadas de ambas, receptores de 5-HT_{1A} e receptores D2 de dopamina parecem ser uma abordagem promissora para o tratamento da DP. Estes novos ligantes para os receptores de 5-HT_{1A} podem superar as limitações de eficácia clínica e / ou melhorar as reações adversas na terapêutica da DP (SHIMIZU; OHNO, 2013).

4.5 Excitotoxicidade

O glutamato é um neurotransmissor excitatório rápido predominante no sistema nervoso central (SNC) e, na presença de condições específicas, é uma neurotoxina potencial. As alterações intracelulares mediadas por glutamato podem contribuir, de uma forma mais sutil, para os mecanismos que desencadeiam o processo neurodegenerativo na substância negra *pars compacta*. Estas interações podem criar condições para o desenvolvimento de danos na via nigroestriatal que são características da DP (BLANDINI, 2010).

A transmissão mediada por glutamato desempenha um papel central em numerosas funções cerebrais fundamentais, como fenômenos de plasticidade sináptica envolvidos na memória e aprendizagem, formação de redes neurais durante o desenvolvimento e reparação do SNC. Dentro do circuito de núcleos da base, o glutamato medeia a neurotransmissão excitatória em pontos cruciais, incluindo as projeções excitatórias eferentes que áreas corticais sensório-motoras enviam para o corpo estriado e núcleo subtalâmico (NST), e as projeções que o NST, por sua vez, envia a seus núcleos alvo. O glutamato, por conseguinte, participa dos mecanismos neurais subjacentes a sintomas motores na DP (BLANDINI, 2010).

Foi John Olney o primeiro a correlacionar as propriedades excitatórias de vários análogos de glutamato com sua capacidade de produzir dano neurotóxico, criando assim o termo "excitotoxicidade" (OLNEY; HO; RHEE, 1971). Posteriormente, foi demonstrado que a excitotoxicidade é um acontecimento mediado pelo receptor e que os antagonistas de glutamato podem impedir a excitação e a toxicidade. Desde os estudos de Olney, a excitotoxicidade tem sido considerada um componente crucial das vias patológicas de várias doenças do SNC, incluindo doenças neurodegenerativas, como a DP. Todos os subtipos de receptores de glutamato foram implicados na mediação da neurotoxicidade. No entanto, a excitotoxicidade está relacionada, sobretudo, com alterações de glutamato desencadeadas pelas alterações nos níveis intracelulares de cálcio. Consequentemente, os receptores para NMDA (*N-methyl-D-aspartato*), altamente permeáveis ao cálcio, têm sido identificados como a chave do processo (BLANDINI, 2010).

A excitotoxicidade é um processo patológico através do qual neurônios danificados morrem após a estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos pelo glutamato, o mais prevalente neurotransmissor excitatório do SNC, ou substratos semelhantes. Acontece devido a processos intracelulares, tais como sobrecarga de cálcio e as mudanças bioenergéticas que ativam a apoptose (MEHTA et al., 2013). A excitotoxicidade interage de forma sinérgica com estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (ZÁDORI et al., 2012).

Na DP, a alteração da neurotransmissão observada dentro do núcleo basal afeta o sistema glutamatérgico, sugerindo deste modo um envolvimento crítico de excitotoxicidade mediada por glutamato na patogênese, bem como na progressão do processo neurodegenerativo subjacente da doença. O principal elemento de excitotoxicidade do glutamato é o Ca^{2+} (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

O glutamato por si só não é tóxico, mas pode exercer efeitos tóxicos por persistente e excessiva estimulação aos receptores glutamatérgicos que podem ser classificados em duas famílias principais: receptores que incorporam um canal de íons catiônicos, conhecidos como

receptores ionotrópicos (IGluRs) e receptores ligados à proteína G, conhecidos como receptores metabotrópicos (mGluRs) (BLANDINI, 2010).

Mesmo todos os receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato fazendo parte do processo excitotóxico, o NMDA parece desempenhar o papel central (ZÁDORI et al., 2012).

Três famílias de receptores ionotrópicos foram inicialmente identificados: N-methyl-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores de cainato (BLANDINI, 2010). Receptores ionotrópicos de glutamato são canais iônicos ligantes, permeáveis aos íons positivos, expressos em diversas áreas do SNC, onde medeiam a despolarização da membrana neuronal e fazem a transmissão excitatória rápida e potencial (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

O receptor de NMDA tem os poros dos canais permeáveis ao cálcio e a membrana é regulada por um bloco de magnésio voltagem dependente, o que limita o influxo de cálcio induzido por ativação do receptor (BLANDINI, 2010).

Os receptores de AMPA no SNC são principalmente permeáveis aos íons sódio e de potássio. O fato de o cálcio desempenhar papel central nos mecanismos de excitotoxicidade explica por que os receptores AMPA desempenham um papel menor no presente contexto (BLANDINI, 2010).

Os receptores de cainato têm uma estrutura tetramérica e por clonagem molecular foram identificadas cinco subunidades. A compreensão das funções dos receptores de cainato ainda é limitada em comparação com os receptores NMDA e AMPA. Tal como no receptor AMPA, o canal de íons associado com o receptor de cainato é permeável aos íons sódio e potássio, tendo uma baixa permeabilidade ao cálcio. A distribuição dos receptores de cainato no cérebro parece ser mais restrita, em comparação com as outras duas classes de receptores ionotrópicos (BLANDINI, 2010), que são ubiquamente distribuídos no SNC. Eles são encontrados principalmente no hipocampo, córtex cerebral, globus pallidus e cerebelo. Os receptores de cainato pós-sinápticos medeiam a transmissão sináptica, enquanto os pré-sinápticos modulam a liberação de neurotransmissores em várias sinapses, afetando a curto e longo prazo a plasticidade neuronal (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014). Evidências recentes mostram que receptores de cainato contribuem para a neurodegeneração, promovendo não só a excitotoxicidade, mas também a ativação microglial e a neuroinflamação (ZHANG; ZHU, 2011).

A estimulação de receptores metabotrópicos ativa as vias intracelulares através de nucleotídeos cíclicos ou metabolismo do fosfoinositol. A ativação de mGluRs também pode

modificar a função do canal iônico, através da liberação de subunidades da proteína G dentro da membrana (BLANDINI, 2010).

A estimulação de mGluRs do grupo I ativa a enzima fosfolipase C, que conduz à formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacil-glicerol; IP3 aumenta a concentração citosólica do cálcio, estimulando a liberação de organelas intracelulares, como retículo endoplasmático, enquanto diacil-glicerol serve como co-fator para a ativação da proteína quinase C. Os receptores mGluR1 e mGluR5 podem modular negativamente uma variedade de canais de potássio, ativando assim a entrada de Ca^{2+} , aumentando a excitabilidade neuronal (BLANDINI, 2010). Os mGluR do grupo II e III estão negativamente acoplados a adenilil ciclase; por conseguinte, a sua ativação impede a formação de adenosina monofosfato cíclico a partir de ATP. O Grupo II e III de mGluRs estão predominantemente envolvidos na inibição pré-sináptica (BLANDINI, 2010).

Neurônios dopaminérgicos da substância negra são seletivamente vulneráveis à excitotoxicidade, mesmo na ausência de um aumento considerável dos níveis de glutamato ou de outros agentes sensíveis que atuam como toxinas mitocondriais e agentes pró-oxidantes. A manutenção da polaridade da membrana requer suplementação energética contínua; portanto, a função mitocondrial reduzida pode provocar a despolarização; sob estas condições, a função de canal exercida pelo magnésio é comprometida e mesmo os níveis não tóxicos de glutamato tornam-se letais, gerando um grande influxo de cálcio. Qualquer processo que prejudique a capacidade do neurônio de manter o potencial de membrana normal aumenta a sua vulnerabilidade e a toxicidade do glutamato. Evidências experimentais substanciais apoiaram esta hipótese mostrando, por exemplo, que a inibição da respiração mitocondrial, tanto *in vitro* como *in vivo*, provoca lesões excitotóxicas que podem ser prevenidas por antagonistas de NMDA (BLANDINI, 2010).

A neurotoxicidade mediada está estritamente ligada ao ponto de entrada do íon Ca^{2+} . Na verdade, se o íon Ca^{2+} entra na célula através de canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo L, nenhuma lesão celular ocorre. Por outro lado, se o aumento semelhante na concentração intracelular de Ca^{2+} é causado por estimulação induzida por receptores NMDA de glutamato, é observado uma notável neurotoxicidade (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

De acordo com a literatura, a neurotoxicidade mediada pelo glutamato não é responsável pela lesão inicial e perda neuronal no SNC, mas é, um efeito secundário à susceptibilidade a neurônios dopaminérgicos, a defeitos moleculares / bioenergéticos, bem como a neurotransmissão alterada associada com a morte celular neste núcleo. A

vulnerabilidade intrínseca de neurônios dopaminérgicos, associada a uma redução mitocondrial, a defesas antioxidantes ineficientes e perturbação nas vias proteolíticas, representa o fundo perfeito para a excitotoxicidade mediada pela ativação de Ca^{2+} e fenômenos de progressão da morte nigrostriatal (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

Além da ativação da enzima patológica, o nível intracelular de Ca^{2+} pode ser tão alto que excede a capacidade de tamponamento de Ca^{2+} no sequestro mitocondrial, que por sua vez leva a uma disfunção mitocondrial e a propagação de morte celular. As alterações na captação de glutamato podem também resultar numa elevação na concentração de glutamato extracelular que acompanha o processo de excitotoxicidade. A acumulação extracelular excessiva de glutamato pode ser um dos principais fatores que contribuem para o dano neural (ZÁDORI et al., 2012).

Mecanismos alternativos de excitotoxicidade podem desencadear danos neuronais na presença de susceptibilidade aumentada de neurônios nigrostriatais ao potencial tóxico do glutamato (BLANDINI, 2010).

A excitotoxicidade pode também desempenhar um papel na patogênese da DP genética, que é responsável por 10 a 15% de todos os casos de DP. A forma mais frequente de início precoce, a DP autossômica recessiva é caracterizada por mutações no gene Parkin. Parkin é uma ubiquitina ligase que medeia a transferência de ubiquitina para as proteínas expressas com caudas a serem eliminadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (POOLE et al., 2008). Outro papel de Parkin, recentemente reconhecido, é a regulação da função e estabilidade das sinapses glutamatérgicas excitatórias. Na presença da mutação de Parkin, as sinapses glutamatérgicas tendem a proliferar, aumentando a eficácia sináptica de glutamato. Isto inevitavelmente aumenta a vulnerabilidade neuronal mediada pela excitotoxicidade do glutamato (HELTON et al., 2008). No nível nigral, este fenômeno poderia gerar um estado de hipersensibilidade do glutamato que, combinados com outros defeitos bioquímicos, tais como o estresse oxidativo, podem desencadear o processo neurodegenerativo (BLANDINI, 2010).

Finalmente, a vulnerabilidade de neurônios da substância negra *pars compacta* ao glutamato pode ser aumentada pela presença da própria dopamina, que pode amplificar a transdução de sinal mediada por glutamato (IZUMI et al., 2009). A neuroinflamação e a ativação da micróglia, que desempenha um papel importante na progressão da neurodegeneração do SNC, também contribui para a liberação de glutamato e potencializa respostas mediadas pelo receptor de glutamato (em particular NMDA), conduzindo assim à exacerbação dos fenômenos excitotóxicos (NODA; BEPPU, 2013). Por outro lado, o aumento dos níveis de glutamato pode ativar a micróglia e sustentar processos inflamatórios. Na

verdade, demonstrou-se no cérebro de rato que receptores de glutamato, em particular, AMPARs, cainato e mGluR (grupo I e III), são expressos em células microgliais e a sua ativação é responsável por modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (LEE, 2013). Esta evidência sugere claramente que neuroinflamação e excitotoxicidade mediada por glutamato reciprocamente sustentam uns aos outros e criam um ciclo vicioso, que eventualmente piora a degeneração nigroestriatal em DP (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

Antagonistas competitivos de NMDA têm demonstrado propriedades neuroprotetoras, embora não possam ser adaptados na prática clínica por causa da gravidade dos efeitos secundários associados à sua administração, ligados ao nível cognitivo (LIPTON, 2007). Portanto, os antagonistas fracos de NMDA têm sido investigados. O ácido cinurênico (KYNA), um intermediário da via quinurenina, exibe fraca ação antagonista sobre NMDA e, em menor grau, em receptores de AMPA / cainato. Além disso, KYNA reduz a liberação de glutamato em sinapses por inibir os receptores colinérgicos nicotínicos, cuja ativação promove a liberação de glutamato nos terminais glutamatérgicos pré-sinápticos (ZÁDORI et al., 2012).

Recentes estudos relataram que outras abordagens terapêuticas relacionadas com o sistema glutamatérgico na DP mostram que a regulação negativa ou alterações na composição da NMDA e / ou AMPARs nos núcleos basais podem ser obtidas após a administração da rasagilina e de estrógenos, sugerindo que o seu potencial neuroprotetor pode contar com a supressão da excitotoxicidade mediada por glutamato (LIU; ZHAO, 2013). Estes estudos pré-clínicos abriram o caminho para ensaios realizados em pacientes com DP, voltados para a avaliação dos efeitos dos antagonistas do receptor de glutamato em sintomas motores de DP e discinesia induzida pelo uso de levodopa. De acordo com os resultados obtidos até agora, não foram muitas moléculas que conseguiram melhorar os sintomas motores da DP, enquanto alguns deles foram capazes de produzir efeitos benéficos no tratamento da discinesia induzida pela levodopa (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

O processo de descoberta de fármacos fundamenta-se no desenvolvimento de novas moléculas e / ou estratégias farmacológicas que atuem nos receptores de glutamato, com a idéia de retardar o processo neurodegenerativo, reestabelecer a liberação sináptica e o equilíbrio do neurotransmissor no circuito dos núcleos basais (AMBROSI; CERRI; BLANDINI, 2014).

4.6 Apoptose

A morte celular é um processo normal que ocorre em várias patologias, incluindo desordens neurodegenerativas. Um exaustivo trabalho tem sido feito para delinear os mecanismos celulares responsáveis pela morte celular de neurônios dopaminérgicos observados na DP (COSTA; CHECLER, 2011).

Existem dois tipos principais de morte celular, a necrose e a apoptose. A necrose caracteriza um processo passivo, desorganizado e acidental de morte celular que está associado, principalmente, à hipóxia, toxinas e ao superaquecimento. Inversamente, a apoptose ou morte celular programada (MCP) é um processo que ocorre de forma ordenada, demanda energia e síntese protéica. Ela é comandada por genes de eliminação das células danificadas que parecem ser essenciais para o desenvolvimento e homeostasia dos organismos multicelulares (NAGLEY et al., 2010). Os neurônios da substância negra *pars compacta* na DP morrem principalmente por consequência da apoptose (YUAN; YANKNER, 2000).

A apoptose neuronal modela o cérebro em desenvolvimento e tem um papel potencialmente importante em doenças neurodegenerativas. Os principais componentes moleculares do programa de apoptose em neurônios incluem Apaf-1 (Fator de ativação de protease da apoptose-1), proteínas da família Bcl-2 e caspases (proteases que desempenham papel central na apoptose) (YUAN; YANKNER, 2000).

A MCP é caracterizada por uma sequência regulada surpreendente de eventos bioquímicos e morfológicos representados, principalmente, pela condensação de cromatina, pela ativação das caspases e pela presença de marcadores de fagocitose na superfície da célula. O aumento exponencial do número de estudos que visam delinear cascatas de morte celular, em condições normais e patológicas, leva à conclusão de que a classificação de processos de morte celular por apoptose ou por qualquer necrose deve provavelmente ser revisto (COSTA; CHECLER, 2011).

De acordo com a revisão da nomenclatura feita por Clarke em 1990, os processos de MCP são subclassificados em categorias morfológicamente distintas (CLARKE, 1990). A morte celular do Tipo I corresponde ao programa apoptótico clássico, executado por caspases e caracterizado por um processo altamente regulado, mediado tanto por receptores de morte celular, como por cascatas de sinalização de mitocôndrias / citocromo C. A morte celular do tipo I também é caracterizada por genes reguladores da apoptose (Bax, Bim, Bcl2, Bcl-xL e receptor Fas) e uma vasta gama de fatores de transcrição. Morte celular do tipo II ou

autofágica é caracterizada pela presença de uma dupla membrana com vesículas citoplasmáticas capazes de degradar o citoplasma de organelas citoplasmáticas como a mitocôndria e, assim, provocar a sua degradação lisossomal. Morte celular do tipo III é definida como uma degradação vesicular não-lisossomal. Uma rede de evidências implica que tipos I e II da MCP são observados na degeneração neuronal na DP (COSTA; CHECLER, 2011).

Vale a pena notar que o MCP do tipo I pode implicar em três vias distintas: a intrínseca (mitocondrial), a extrínseca (morte do receptor) e as vias reticulares. A via intrínseca está associada a uma cascata molecular de eventos que ocorrem nas mitocôndrias e implica na mobilização dos membros da família Bcl-2, conduzindo assim à liberação de citocromo C no citosol e a subsequente ativação de caspases. A via extrínseca é mediada pela ligação de membros específicos da família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF). A via reticular depende de uma cascata de eventos também mediados por caspases, mas no retículo endoplasmático (RE). Esta via é ativada quando o UPR (resposta a proteínas mal enoveladas) não é capaz de lidar com um estresse excessivo no RE e acumula proteínas deformadas, o que é potencialmente tóxico (BURKE, 2008).

Os neurônios partem do mesmo programa de apoptose que os outros tipos de células. No entanto, diferentes tipos de neurônios, e neurônios em diferentes fases de desenvolvimento, expressam combinações diferentes de Bcl-2 e membros da família de caspases, que é uma forma de proporcionar a especificidade da regulação. As duas principais caspases envolvidas na morte de células neuronais são caspase-3 e caspase-9, sendo que a primeira, quando ativada pela última, degrada proteínas importantes para a viabilidade celular (YUAN; YANKNER, 2000).

A família de proteínas Bcl-2 tem um papel crucial na transdução de sinal intracelular por apoptose. Esta família de genes inclui tanto as proteínas anti-apoptóticas e pro-apoptóticas que contêm um ou mais domínios de homologia de Bcl-2. Os principais membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, são Bcl-2 e Bcl-x_L, que reduzem a morte celular por prevenirem a libertação das proteínas intermembranares da mitocôndria. Uma vez ultrapassada a fase de morte celular que envolve a mitocôndria, as proteínas anti-apoptóticas deixam de ter qualquer efeito na inibição da apoptose. As proteínas pro-apoptóticas e as anti-apoptóticas da família Bcl-2, podem atuar de forma conjunta através dos domínios de homologia BH, formando homo e heterodímeros e regulando, assim, reciprocamente, as suas funções. Por outro lado, a função das “caspases executoras” também pode ser modulada por outro tipo de proteínas, os inibidores de proteínas apoptóticas (IAPs), que podem se ligar à caspase-9 e inibir a sua

atividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico (YUAN; YANKNER, 2000).

A expressão de Bcl-2 é elevada no sistema nervoso central durante o desenvolvimento e é regulada negativamente após o nascimento, ao passo que a expressão de Bcl-2 no sistema nervoso periférico é mantida ao longo vida (YUAN; YANKNER, 2000).

O proto-oncogene Bcl-2 e os seus homólogos Bcl-x e Bax são de particular interesse em doenças neurodegenerativas. Os níveis destas duas categorias de membros da família Bcl-2 determinam provavelmente a vulnerabilidade de uma célula individual para estímulos pró-apoptóticos, através de interações proteína-proteína (WÜLLNER et al., 1999).

Bcl-2 inibe a morte celular por apoptose e em alguns casos também a morte celular por necrose. Bax, por outro lado, tem um efeito indutor de morte em um grande número de casos, pois pode formar um poro permeável a fatores intermembranares e pode ser superado através de dimerização com Bcl-2. Uma perturbação do equilíbrio de Bcl-2 e Bax em determinadas populações de neurônios subjacentes à morte seletiva neuronal pode ser observada em desordens neurodegenerativas. Portanto, enquanto a identificação direta de fragmentos de DNA de núcleos apoptóticos pode ser dificultada por uma meia-vida curta de corpos apoptóticos ou dificuldades técnicas, uma mudança na expressão do Bax pode ajudar a identificar os neurônios dopaminérgicos destinados à degeneração (WÜLLNER et al., 1999).

Tem ocorrido um aumento de diversos marcadores pró-apoptóticos ligados à mitocôndria (MCP do tipo I) como Bax, Bcl2, Bcl-xL e caspases ativas 3 e 9. A implicação da via apoptótica extrínseca é também realçada pela modulação dos níveis da caspase-8, dos receptores de Fas e de TNFs-R1 em pacientes com DP. O envolvimento da via reticular em casos de DP foi sugerido pelo aumento dos níveis de dois marcadores da UPR na substância negra *pars compacta* que são fosfo-PERK e seus substratos, eIF2 α e ATF4 (SIMUNOVIC et al., 2009).

A proto-oncogene p53, que é uma proteína citoplasmática de massa molecular de 53 kDa, também tem sido identificada como uma proteína efetora chave no processo de morte celular apoptótica. Esta avaliação incidirá sobre as pistas que ligam p53 à etiologia da DP e as evidências de que esta proteína pode estar no centro de múltiplas cascatas de sinalização, não só em casos familiares de DP, mas também em casos esporádicos desta doença (COSTA; CHECLER, 2011).

Uma rede de evidência indica uma ligação clara entre p53 e ambos os tipos I e II da MCP na DP. Assim, foi demonstrado que a ativação de p53 leva à inibição da atividade da mTOR, um alvo de rapamicina em mamíferos; e a autofagia induzida pela rapamicina leva a

neuroproteção de neurônios dopaminérgicos contra lactacistina através da regulação negativa de p53 (DU et al., 2009).

Dentre os componentes chave do programa de apoptose em neurônios, estão Apaf-1, proteínas da família Bcl-2, caspase e p53. A regulação da apoptose por meio de interações de membros da família de Bcl-2 e das cascatas de caspases tem um papel importante na modelagem do cérebro em desenvolvimento. As caspases além de serem importantes na regulação da morte celular neuronal durante o desenvolvimento, também podem mediar a morte das células nas doenças neurodegenerativas (YUAN; YANKNER, 2000). A p53 também tem um papel importante na DP, estando no centro de diversas cascatas de sinalização de várias síndromes neurodegenerativas. Estas descobertas são alvo chave para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas farmacológicas comuns no tratamento de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (COSTA; CHECLER, 2011).

5 CONCLUSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa, crônica, progressiva e insidiosa, que causa incapacidade considerável. Contudo, ainda não existe um tratamento neuroprotetor que retarde a progressão da doença e tenha maiores benefícios sobre os sintomas dopaminérgicos e não-dopaminérgicos da DP. É essencial conhecer bem as características clínicas da doença para alcançar um diagnóstico rápido e correto. Cada vez mais se reconhece a importância dos sintomas não motores, que podem facilitar o diagnóstico. O tratamento farmacológico é eficaz no controle dos sintomas motores, mas traz complicações se utilizado por um longo período, diminuindo o bem-estar do paciente.

A descoberta de fármacos neuroprotetores, visando novas perspectivas para o tratamento da DP, é um dos grandes desafios para os pesquisadores. Dentre as novas perspectivas de tratamento, o bloqueio de canais de cálcio mostra-se como alternativa, uma vez que a atividade do cálcio está envolvida na patogênese da DP. Até o momento sabe-se que a dihidropiridina, um bloqueador do canal de cálcio Cav1, pode reduzir o risco de desenvolver a DP e que apesar de não haver inibidores potentes ou seletivos de canais Cav1.3, modificações do pirimidino-2,4,6-trionas foram recentemente identificadas como potenciais candidatos em triagens de fármacos.

Outra possibilidade seria um fármaco que removesse as mitocôndrias defeituosas melhorando ou restaurando a função neuronal. GLP-1 e EX-4 tem atraído a atenção dos pesquisadores por promoverem crescimento celular, aumentarem a biogênese mitocondrial e diminuírem a apoptose.

Catecóis, flavonoides e hidroquinonas inibem a formação de fibras amiloides de α -sinucleína, e também podem constituir alternativas para tratamento da DP. Outro alvo importante seria uma intervenção nas reações de prion conformação. A imunoterapia com anticorpos monoclonais e a vacinação com α -sinucleína também é uma possibilidade já que apresentaram efeitos positivos em animais.

Os receptores 5-HT_{1A} participam do controle de funções motoras, melhoram várias desordens não motoras e deficiência motora induzida por uso prolongado da levodopa. Sendo assim, os receptores 5-HT_{1A} podem ser um alvo terapêutico promissor para a DP. A tandospirona, um agonista seletivo do receptor de 5-HT_{1A}, tem sido apontada como um possível agente antiparkinsoniano.

Os antagonistas de receptores glutamatérgicos podem impedir a excitação e a toxicidade das células neuronais, protegendo assim a viabilidade e função neuronal. O ácido cinurênico (KYNA) exibe fraca ação antagonista sobre receptores NMDA e, em menor grau, em receptores de AMPA / cainato; e reduz a liberação de glutamato em sinapses por inibir os receptores colinérgicos nicotínicos, consistindo em outra alternativa para tratamento da DP.

Dentre os componentes envolvidos na apoptose em neurônios, estão Apaf-1, proteínas da família Bcl-2, caspase e p53. As caspases podem mediar a morte das células nas doenças neurodegenerativas. A p53 tem um papel importante na DP, estando no centro de diversas cascatas de sinalização. Bcl-2 e Bcl-x_L, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, bloqueiam a morte celular por prevenirem a libertação das proteínas intermembranares da mitocôndria. Esses genes são alvo chave para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas farmacológicas comuns na DP.

Tal abordagem é de grande aplicabilidade na compreensão dos mecanismos envolvidos nestas diferentes atividades sendo essencial para o planejamento racional de novos fármacos e, portanto, os grandes desafios estão, principalmente, na elucidação das relações entre os complicados eventos que ocorrem durante o processo da neurodegeneração. Enfim, há a necessidade de ampliar as possibilidades terapêuticas, para que não somente um sintoma específico seja minimizado ou eliminado na DP, mas que tragam estratégias modificadoras do curso da doença.

REFERÊNCIAS

- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* v. 12, p. 366–375, 1989.
- ALEXANDER, G.; DELONG, M.; STRICKS, P. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Ver. Neurosci.* v. 9, p. 357–381, 1986.
- ALNEMRI, E. S. HtrA2 and Parkinson's disease: think PINK? *Nat. Cell. Biol.* v. 9, p. 1227–1229, 2007.
- ALVAREZ-ERVITI L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* v. 29, p. 341–345, 2011.
- ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat Neurosci.* v. 14, p. 1260–1266, 2011.
- AMBROSI, G.; CERRI, S.; BLANDINI, F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* v. 121, p. 849–859, 2014.
- ARAWAKA, S. et al. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for α -synuclein. *Neurology.* v. 51, p. 887–889, 1998.
- ASHRAFI, G.; SCHWARZ, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* v. 20, p. 31–42, 2013.
- AULUCK, P. K. et al. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science.* v. 295, p. 865–868, 2002.
- AVILES-OLMOS, I. et al. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain.* v. 136, p. 374–384, 2013.
- BAE, E. J. et al. Antibody-aided clearance of extracellular α -synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. *J Neurosci.* v. 32, p. 13454–13469, 2012.
- BERGMAN, H.; WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science.* v. 249, p. 1436–1438, 1990.
- BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* v. 73, p. 417–35, 2004.
- BLANDINI, F. An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Functional Neurology.* v. 25, p. 65–71, 2010.
- BLANDINI, F. et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* v. 62, p. 63–88, 2000.

BLANDINI, F. Neuroprotection by Rasagiline: A New Therapeutic Approach to Parkinson's Disease? *CNS Drug Reviews* v. 11, p. 183–194, 2005.

BOLEN, D. W.; ROSE, G. D. Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* v. 77, p. 339–362, 2008.

BONNET, A. M, et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis.* v. 2012, p. 198316, 2012.

BOVE, J.; MARTINEZ-VICENTE, M.; VILA, M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci.* v. 12, p. 437–452, 2011.

BREYDO, L.; WU, J. W.; UVERSKY, V. N. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1822, p. 261–285, 2012.

BROTCHIE, J. A. Nondopaminergic mechanisms in levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* v 20, p. 919–931, 2005.

BROWN, P.; MARSDEN, C. D. What do the basal ganglia do? *Lancet.* v. 351, p. 1801–1804, 1998.

BÜELER, H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* v. 218, p. 235–246, 2009.

BURKE, R. E. Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism. *J Neurochem.* v. 104, p. 875–890, 2008.

BURRÉ, J. et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* v. 329, p. 1663–1667, 2010.

CARUANA, M. et al. Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett.* v. 585, p. 1113, 2011.

CENCI, M. A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci.* v. 30, p. 236–243, 2007.

CHAN, C. S. et al. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* v. 447, p. 1081–1086, 2007.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* v. 18, p. 169–176, 2009.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1780, p. 1362–1367, 2008.

- CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* v. 75, p. 333-366, 2006.
- CLARKE, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol Berl.* v. 181 p. 195-213, 1990.
- CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease *JAMA.* v. 311, p. 1670-1683, 2014.
- COSTA, C. A.; CHECLER F. Apoptosis in Parkinson's disease: Is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cellular Signalling.* v. 23, p. 963–968, 2011.
- DAVEY, G. P.; BOLANOS, J. P. Peroxiredoxin 5 links mitochondrial redox signalling with calcium dynamics: impact on Parkinson's disease. *J Neurochem.* v. 125, p. 332–333, 2013.
- DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* v. 5, p. 525–535, 2006.
- DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* v. 13, p. 281–285, 1990.
- DICKSON, D. W. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* v. 2, p. 9258, 2012.
- DU, Y. et al. An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. *Autophagy.* v. 5, p. 663-675, 2009.
- EL-ANDALOUSSI, S. et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* v.7, p. 2112–2126, 2012.
- FAUVET, B. et al. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* v. 287, p. 15345-15364, 2012.
- FOLLMER, C. et al. Dopamine affects the stability, hydration, and packing of protofibrils and fibrils of the wild type and variants of alpha-synuclein. *Biochemistry.* v. 46, p. 472-482, 2007.
- GASCOIGNE, K. UPDATE: Parkinson's disease. *Chemist & Druggist.* v. 3, 2012.
- GERFEN, C. R. et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* v. 250, p. 1429–1432, 1990. Mudei
- GERFEN, C. R.; KEEFE, K. A.; GAUDA, E. B. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *Journal of Neuroscience.* v. 15, p. 8167–8176, 1995.

- GOLDBERG, J. A. et al. Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* v. 15, p. 1414–1421, 2012.
- GROSSMAN, E. et al. Cardiovascular effects of isradipine in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* v. 68, p. 65–70, 1991.
- GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's Disease: A Critical Review and New Findings. *Environmental Health Perspectives.* v.118, p. 1071-1080, 2010.
- GUZMAN, J. N. et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ 1. *Nature.* v. 468, p. 696–700, 2010.
- HAUSER, R. A.; LAUREN, C. S. Levodopa/carbidopa/entacapone in Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics.* v. 9, p. 7, 2009.
- HELTON, T. D. et al. Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 105, p. 19492-19497, 2008.
- HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* v. 425, p. 191–196, 2003.
- HUGHES, A. J.; DANIEL, S.E.; LEES, A.J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology.* v. 57, p.1497–1499, 2001.
- HUOT, P. et al. Increased levels of 5-HT1A receptor binding in ventral visual pathways in Parkinson's disease. *Mov Disord,* v. 27, p. 735-742, 2012.
- HURLEY, M. J.; DEXTER, D. T. Voltage-gated calcium channels and Parkinson's disease. *Pharmacol Ther.* v. 133, p. 324–333, 2012.
- ISHIHARA, L. S. et al. A. Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* v. 78, p. 1304-1309, 2007.
- IZUMI, Y. et al. Vulnerability to glutamate toxicity of dopaminergic neurons is dependent on endogenous dopamine and MAPK activation. *J Neurochem.* v. 110, p. 745-755, 2009.
- JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. What ARE Parkinson disease? Non-motor features transform conception of the shaking palsy [Special issue]. *Neurobiol Dis.* v. 46, p. 505-507, 2012.
- JANKOVIC, J. J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.* v. 20, p. 11–16, 2005.
- JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 9, p. 665–677, 2008.
- JOHNSON, B. A. et al. Treatment advances for cocaine-induced ischemic stroke: Focus on dihydropyridine-class calcium channel antagonists. *Am. J. Psychiatry.* v. 158, p. 1191–1198, 2001.

- KANG, S. et al. Ca_v1.3-selective L-type calcium channel antagonists as potential new therapeutics for Parkinson's disease. *Nat Commun.* v. 3, p. 1146, 2012.
- KEENEY, P. M. et al. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J. Neurosci.* v. 26, p. 5256–5264, 2006.
- KHAN, M. M. et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* v. 1328, p. 139–151, 2010.
- KLEIN, C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. *Arch Neurol.* v. 63, p. 328–334, 2006.
- KNOTT, A. B. et al. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 9, p. 505–518, 2008.
- LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol.* v. 59, p. 591–596, 2006.
- LEE, M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* v. 14, p. 21–32, 2013.
- LEE, S. J. et al. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. *Neurosci. Res.* v. 70, p. 339–348, 2011.
- LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. *Lancet.* v. 373, p. 2055–2066, 2009.
- LIANG, C. L. et al. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* v. 203, p. 370–380, 2007.
- LIPTON, S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci.* v. 8, p. 803–808, 2007.
- LIU, S.; ZHAO, M. Neuroprotective effect of estrogen: role of nonsynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *Brain Res Bull.* v. 93, p. 27–31, 2013.
- MARK, M.H. Lumping and splitting the Parkinson plus syndromes: dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, progressive supranuclear palsy, and cortical-basal ganglionic degeneration. *Neurol. Clin.* v. 19, p. 607–27, 2001.
- MASLIAH, E. et al. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron.* v. 46, p. 857–868, 2005.
- MASLIAH, E. et al. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One.* v. 6, p. 19338, 2011.

- MATSUBARA, K. et al. Tansospirone, a 5-HT_{1A} agonist, ameliorates movement disorder via non-dopaminergic systems in rats with unilateral 6-hydroxydopamine-generated lesions. *Brain research*. v. 1112, p. 126-133, 2006.
- MATTSON, M. P. Parkinson's disease: don't mess with calcium. *J Clin Invest*. v. 122, p. 1195–1198, 2012.
- MEHTA A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. v. 698, p. 6–18, 2013.
- MEIRELES, J.; MASSANO, J. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical features, diagnosis, and management. *Front Neurol*. v. 3, 2012.
- MEYER, E. E.; ROSENBERG, K. J.; ISRAELACHVILI, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 103, p. 15739, 2006.
- MOUSSEAU, N.; DERREUMAUX, P. Exploring energy landscapes of protein folding and aggregation. *Front. Biosci*. v. 13, p. 4495-4516, 2008.
- NADJAR, A.; GERFEN, C. R.; BEZARD, E. Priming for L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? *Prog. Neurobiol*. v. 87, p. 1–9, 2009.
- NAGLEY P. et al. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim Biophys Acta*. v. 1802, p. 167-185, 2010.
- NODA, M.; BEPPU, K. Possible contribution of microglial glutamate receptors to inflammatory response upon neurodegenerative diseases. *J Neurol Dis*. v. 1, p. 131, 2013.
- NUSSBAUM, R. L. Putting the parkin into Parkinson's. *Nature*. v. 392, p. 544– 545, 1998.
- OBESO, J. A. et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. v. 23, p. 8–19, 2000. Mudei
- OHNO, Y. et al. *Management of cognitive impairments in schizophrenia: the therapeutic role of 5-HT receptors*. In: Sumiyoshi T, editor. *Schizophrenia Research: Recent Advances*, New York, Nova Science Publishers, p. 321-335, 2012.
- OLANOW, C. W.; SCHAPIRA, A. H. V. Therapeutic Prospects for Parkinson Disease. *Child Neurology Society/American Neurological Association*. v. 74, p. 337-347, 2013.
- OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. Scientific and Clinical Basis for the treatment of PD. *Neurology*; v. 72, 2009.
- OLNEY, J. W.; HO, O. L.; RHEE, V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*. v. 14, p. 61-76, 1971.
- ONO, K. et al. *Neurochem. Int*. v. 48, p. 275, 2006.

- PARENT, M.; PARENT, A. Substantia Nigra and Parkinson's Disease: A Brief History of Their Long and Intimate Relationship. *The Canadian Journal Of Neurological Sciences*. v. 37, p. 313 – 319, 2010.
- PARKER, J. R. et al. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res*. v. 1189, p. 215–218, 2008.
- PASTERNAK, B. et al. Use of calcium channel blockers and Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. v. 175, p. 627–635, 2012.
- PLUN-FAVREAU, H. et al. The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat. Cell. Biol*. v. 9, p. 1243–1252, 2007.
- POOLE, A. C. et al. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 105, p. 1638-1643, 2008.
- PUCADYIL, T. J.; KALIPATNAPU, S.; CHATTOPADHYAY, A. The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell Mol Neurobiol*. v. 25, p. 553-580, 2005.
- RASCOL, O. et al. Treatment Interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet*. v. 359, p. 1589-1598, 2002.
- REICHMANN, H. View point: Etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. *Journal of the Neurological Sciences*. v. 310, p. 9–11, 2011.
- RODNITZKY, R. L. Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs*. v. 57, p. 845–849, 1999.
- ROUSE, S. T. et al. Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's Disease and related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 88, p. 427–435, 2000. Mudei
- SAMII, A.; NUTT, J. G.; RANSOM, B. R. Parkinson's disease. *Lancet*. v. 363, p. 1783-1793, 2004.
- SCHAPIRA, A. H. V. Aetiopathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol*. v. 258, p. 307–310, 2011.
- SCHAPIRA A. H. V. et al. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet*. v. 384, p. 545–555, 2014.
- SCHAPIRA, A. H. V. et al. Perspectives on recent advances in the understanding and treatment of Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*. v. 16, p. 1090–1099, 2009.
- SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, v. 7, p. 97–109, 2008.
- SCHAPIRA, A. H. V. Calcium dysregulation in Parkinson's disease. *Brain*. v. 136, p. 2015–2016, 2013.

- SHIMIZU, S.; OHNO, Y. Improving the Treatment of Parkinson's Disease: A Novel Approach by Modulating 5-HT_{1A} Receptors. *Aging and disease*. v. 4, p. 1-13, 2013.
- SILVA, F. L. et al. Vitamins K interact with N-terminus α -synuclein and modulate the protein fibrillization in vitro. Exploring the interaction between quinones and α -synuclein. *Neurochem. Int.* v. 62, p. 103-112, 2013. Mudei
- SIMUNOVIC, F. et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. Sonntag, *Brain*. v.132, p. 1795-1809, 2009.
- SURMEIER, D. J. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* v. 6, p.933–938, 2007.
- SURMEIER, D. J.; SCHUMACKER, P. T. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Biol Chem.* v. 288, p. 10736–10741, 2013.
- TAIN, L. S. et al. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci.* v. 12, p. 1129–1135, 2009.
- TASCHENBERGER, G. et al. Aggregation of alphaSynuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol.* v. 123, p. 671–683, 2012.
- TOFARIS, G. K. Lysosome-dependent pathways as a unifying theme in Parkinson's disease. *Mov Disord.* v. 27, p. 1364–1369, 2012.
- TRIMMER, P. A. et al. Parkinson's disease transgenic mitochondrial cybrids generate Lewy inclusion bodies. *J. Neurochem.* v. 88, p. 800–812, 2004. Mudei
- VINCOW, E. S. et al. The PINK1–Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 110, p. 6400–6405, 2013.
- VOLPICELLI-DALEY, L. A. et al. Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron.* v. 72, p. 57-71, 2011.
- WANG, X., et al. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell.* v. 147, p. 893–906, 2011.
- WANKER, E. E. Protein aggregation in Huntington's and Parkinson's disease: implications for therapy. *Molecular Medicine Today.* v. 6, p. 387-391, 2000.
- WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Physiology of the basal ganglia and pathophysiology of movement disorders of basal ganglia origin. *Movement Disorders: Neurological Principles and Practice.* p. 87–97, 1997.
- WOOD-KACZMAR, A. et al. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS ONE.* v. 3, p. 1–16, 2008.
- WÜLLNER U et al. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease – a cautionary note. *Acta Neuropathol.* v. 97, p. 408–412, 1999.

YU, Z. et al. Nitrated asynuclein induces the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats. *PLoS One*. v. 5, p. 9956, 2010.

YUAN J.; YANKNER B. A. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. v. 407, p. 802-809, 2000.

ZÁDORI, D. et al. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenes: Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*. v. 322, p. 187–191, 2012.

ZHANG, X. M.; ZHU, J. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Curr Neuropharmacol*. v. 9, p. 388–398, 2011.