



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**  
Ciências da Saúde

# **Identificação de biomarcadores em fluidos biológicos para o diagnóstico precoce da Doença de Parkinson: Realidade ou Utopia?**

**Rui Pedro Vianez Gonçalves**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Prof. Doutora Luiza Rosado

Coorientadora: Prof. Carla Fonseca

**Covilhã, agosto de 2014**

# Dedicatória

Dedico este trabalho à minha tia-avó Maria Adelaide Figueiro (1927-2014) que sempre esteve presente na minha vida enchendo-a de alegria e, infelizmente, não teve a oportunidade de presenciar este momento.

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer especialmente à Professora Doutora Luiza Rosado por ter aceite orientar a presente dissertação e por toda a disponibilidade e empenho demonstrados.

Gostaria também de agradecer à Professora Carla Fonseca o esforço empreendido para ajudar na elaboração desta dissertação.

Agradeço aos meus pais do fundo do coração, pois sem eles este momento não seria possível.

Agradeço à minha irmã toda a motivação que me deu. Embora estejas noutra País fazes questão de estar sempre presente ao meu lado.

À minha família por todo o apoio que deram.

À Faculdade de Ciências da Saúde e à Universidade da Beira Interior por terem sido uma segunda casa nesta etapa da minha vida.

Por fim, mas não menos importante, aos meus amigos por estarem presentes sempre que é necessário.

# Resumo

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central tendo sido descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson como “paralisia agitante”. É uma patologia crónica e progressiva responsável pela degeneração celular dos neurónios dopaminérgicos da porção compacta da *substantia nigra*, refletindo-se sintomaticamente sobretudo a nível motor mas também a nível não motor.

O diagnóstico desta patologia é essencialmente clínico e baseia-se na presença de pelo menos dois de quatro sinais cardinais: tremor em repouso; rigidez; bradicinesia e instabilidade postural. No entanto, e apesar do diagnóstico se basear em sintomas motores, esta patologia apresenta também sintomas não motores que muitas vezes surgem numa fase pré-clínica da doença, antecedendo os sintomas motores, mas que são muitas vezes subvalorizados tanto pelos médicos como pelos doentes.

Tendo em conta que a Doença de Parkinson é incurável, o tratamento sintomático desta patologia visa preservar a função motora, melhorar a qualidade de vida e evitar complicações induzidas pela própria medicação.

Já que o diagnóstico desta patologia é realizado aquando da apresentação dos sintomas motores, ou seja, numa fase tardia da doença é de vital importância iniciar o tratamento neuroprotetor o mais cedo possível, de preferência durante a fase pré-clínica da doença, de maneira a retardar o mais possível o surgimento dos sintomas motores. Para que tal seja possível é necessário diagnosticar a Doença de Parkinson nesta fase pré-clínica.

Neste sentido, ao longo da última década, têm-se intensificado os esforços na pesquisa/investigação de biomarcadores para a Doença de Parkinson que permitam então diagnosticar precocemente esta patologia. São várias as entidades que têm sido propostas como potenciais biomarcadores para esta patologia sendo os biomarcadores bioquímicos aqueles que mais interesse têm em ser descobertos uma vez que estarão presentes em fluidos corporais como o líquido cefalorraquidiano, sangue ou saliva, o que facilita a colheita de amostras e têm um custo mais baixo.

Atualmente ainda não foi possível identificar nenhum biomarcador para a Doença de Parkinson mas aqueles que já foram estudados aparentam ter um futuro promissor. À medida que se vai sabendo mais acerca da etiopatogénese da Doença de Parkinson, vão surgindo novos potenciais biomarcadores, o que leva a crer que no futuro um ou mais biomarcadores irão ser identificados para a Doença de Parkinson.

# Palavras-chave

Doença de Parkinson; Biomarcadores;  $\alpha$ -sinucleína; DJ-1; Sangue; Líquido cefalorraquidiano; Saliva.

# Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease of the central nervous system that was first described in 1817 by the English physician James Parkinson as "shaking palsy". It is a chronic and progressive pathology responsible for cellular degeneration of dopaminergic neurons of the *substantia nigra*, reflected symptomatically in a motor way and in a non-motor way.

The diagnosis of this pathology is essentially clinical and is based on the presence of two of four cardinal signs: resting tremor; rigidity; bradykinesia and postural instability. However, and despite the diagnosis is based on motor symptoms, this disease also presents non-motor symptoms which often arise in a pre-clinical stage of disease, prior to motor symptoms, but they are often undervalued both by physicians and patients.

Given that Parkinson's disease is incurable, symptomatic treatment of this condition aims to preserve motor function, improve quality of life and prevent complications induced by the medication itself.

Since the diagnosis of this pathology is performed upon presentation of motor symptoms, ie, at a late stage of the disease it is vital that neuroprotective therapy starts as early as possible, preferably during the preclinical phase of the disease in order to slow down as much as possible the emergence of motor symptoms. To make this possible it is necessary to diagnose Parkinson's disease in this preclinical phase.

In this sense, over the last decade, it has been intensifying the efforts in research/investigation of biomarkers for Parkinson's disease to enable early diagnosis of this condition. There are several entities that have been proposed as potential biomarkers for this disease being the biochemical biomarkers those that have more interest in being discovered as they will be present in body fluids such as cerebrospinal fluid, blood or saliva, which facilitates the taking of samples and have a lower cost.

Currently it is still not possible to identify any biomarker for Parkinson's disease but those that have been studied appear to have a promising future. As we will learn more about the etiopathogenesis of the Parkinson's Disease, new potential biomarkers will emerge, which suggests that in the future one or more biomarkers will be identified for Parkinson's Disease.

# Keywords

Parkinson's Disease; Biomarkers;  $\alpha$ -synuclein; DJ-1; Blood; Cerebrospinal fluid; Saliva

# Índice

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Palavras-chave.....	v
Abstract.....	vi
Keywords.....	vii
Índice.....	viii
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Acrónimos.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Métodos.....	3
4. Doença de Parkinson.....	4
4.1 Etiologia e Patogénese.....	4
4.1.1 Neurotoxinas ambientais.....	4
4.1.2 Stress oxidativo.....	5
4.1.3 Anormalidades Mitocondriais.....	5
4.1.4 Excitotoxicidade.....	5
4.1.5 Fatores Genéticos.....	5
4.2 Sintomatologia e Diagnóstico.....	7
4.2.1 Sintomas motores.....	7
4.2.2 Sintomas Não-Motores.....	9
4.3 Tratamento.....	10
4.3.1 Terapias Não-Farmacológicas.....	10
4.3.2 Tratamento Farmacológico dos Sintomas Motores.....	10
4.3.2.1 Levodopa/Carbidopa.....	10
4.3.2.2 Inibidores da MAO-B.....	11
4.3.2.3 Agonistas Dopaminérgicos.....	11
4.3.2.4 Anticolinérgicos e Amantadina.....	11
4.3.3 Terapia Neuroprotetora.....	12

4.3.4	Tratamento Cirúrgico .....	12
4.3.5	Tratamento dos Sintomas Não-Motores.....	13
4.3.5.1	Depressão.....	13
4.3.5.2	Demência.....	13
4.3.5.3	Sintomas psicóticos .....	13
4.3.5.4	Ansiedade .....	14
4.3.5.5	Distúrbios do sono.....	14
5.	Biomarcadores .....	15
5.1	Qual a necessidade de ter tais marcadores na DP? .....	15
5.1.1	Melhorar e/ou facilitar o diagnóstico .....	15
5.1.2	Para acompanhar a progressão da doença e demonstrar a eficácia do tratamento	15
6.	Biomarcadores da Doença de Parkinson.....	17
6.1	Exames de imagem como biomarcadores .....	17
6.1.1	<i>Radiotracer neuroimaging</i> .....	17
6.1.2	Ultrassonografia Transcraniana .....	18
6.1.3	Imagem por Ressonância Magnética .....	18
6.2	Biomarcadores Clínicos .....	19
6.2.1	Distúrbio comportamental do sono REM idiopático.....	19
6.2.2	Défices Olfativos/Hipósμία .....	20
6.2.3	Obstipação.....	20
6.3	Biomarcadores Genéticos .....	21
6.4	Biomarcadores Bioquímicos.....	21
6.4.1	Biomarcadores no Líquido Cefalorraquidiano .....	21
6.4.1.1	Complemento.....	22
6.4.1.2	$\alpha$ -sinucleína .....	22
6.4.1.3	DJ-1.....	23
6.4.1.4	Tau e $\beta$ -amilóide.....	24
6.4.2	Biomarcadores no Sangue.....	25
6.4.2.1	$\alpha$ -sinucleína .....	25
6.4.2.2	DJ-1.....	26
6.4.2.3	Ácido úrico.....	27
6.4.3	Biomarcadores na Saliva .....	28
7.	Conclusão .....	30

Referências Bibliográficas ..... 32

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Formas autossômicas dominantes e recessivas da Doença de Parkinson.....	6
Tabela 2 - Aspectos que diferenciam a DP do tremor essencial.....	8

# Lista de Acrónimos

**4-HNE** - 4-hidroxi-2-nonenal

**$\alpha$ -sin** - Proteína  $\alpha$ -sinucleína

**AB** - Proteína  $\beta$ -amilóide

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**ATP** - Adenosina Trifosfato

**BIPAP** - *Bi-level Positive Airway Pressure* (pressão positiva em vias aéreas a dois níveis)

**COMT** - Catecol-O-metiltransferase

**CPAP** - *Continuous Positive Airway Pressure* (pressão positiva contínua das vias aéreas)

**DA** - Doença de Alzheimer

**DATATOP** - *Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism* (Terapia antioxidante do parkinsonismo com deprenil e tocoferol)

**DCB** - Degeneração corticobasal

**DCL** - Demência com Corpos de Lewy

**DP** - Doença de Parkinson

**ECP** - Estimulação Cerebral Profunda

**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EM** - Esclerose Múltipla

**EMG** - Eletromiografia

**H** - Homens

**HR** - *Hazard Ratio* (Razão de Risco)

**IRSN** - Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina

**ISRS** - Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

**ITD** - Imagem por tensores de difusão

JNK - *c-Jun- N-terminal kinase*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LRRK2 - *Leucine-rich repeat kinase 2*

M - Mulheres

MAO - B - Enzima monoamino oxidase B

MAPT - *Microtubule-associated protein tau* (proteína tau associada a microtúbulos)

MIBG - <sup>123</sup>I-meta-iodo-benzil-guanidina

MPP<sup>+</sup> - N-metil-4-fenilpiridínio

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina

MRI - *Magnetic Resonance Imaging* (Imagem por Ressonância Magnética)

MSA - *Multiple system atrophy* (Atrofia Multissistémica)

NMSQuest - *Non Motor Symptoms Questionnaire* (Questionário de sintomas não-motores)

p-tau - *Phosphorylated tau* (Proteína tau fosforilada)

PET - *Positron Emission Tomography* (Tomografia por Emissão de Positrões)

PINK1 - *PTEN-induced putative kinase 1*

PRECEPT - *Parkinson Research Examination of CEP-1347*

PSP - *Progressive Supranuclear Palsy* (Paralisia Supranuclear Progressiva)

RBD - *REM Behaviour Disorder* (Distúrbio comportamental do sono REM)

REM - *Rapid Eye Movement* (movimento rápido dos olhos)

RTI - *Radiotracer Neuroimaging*

SNCA - *Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)*

SPECT - *Single photon emission computed tomography* (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único)

t-tau - Proteína tau total

UPDRS - *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson)

UT - Ultrasonografia transcraniana

# 1. Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que acomete cerca de 1% da população mundial com mais de 65 anos. É a segunda doença neurodegenerativa mais comum, atingindo mais de uma em cada mil pessoas na Europa. Em Portugal estima-se que a prevalência da DP ronde os 13000 doentes. Esta patologia geralmente tem início após os 50 anos (1, 2).

A DP caracteriza-se por sintomas como diminuição do grau de movimento (acinesia), movimentos lentos (bradicinesia), rigidez muscular e tremor em repouso, devido à degeneração da *substantia nigra* que envia fibras nervosas secretoras de dopamina para o núcleo caudado e putâmen (3). Contudo, a DP está também associada a sintomas não motores como depressão, alucinações e outros sintomas psicóticos, deterioração cognitiva, disfunção urinária, disfagia, distúrbios do sono entre outras. Muitas destas alterações não motoras ocorrem antes do aparecimento dos sintomas motores (fase pré-clínica da doença), no entanto, por serem comuns a diversas outras patologias, não permitem fazer o diagnóstico de DP (o qual é feito clinicamente através da presença dos sintomas motores). Apesar disso, estas alterações podem ser associadas à deteção de outros marcadores bioquímicos da doença (4-6).

Alterações nos níveis de proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína e DJ-1 foram detetadas em vários fluidos corporais de doentes com DP tendo sido sugeridas como prováveis biomarcadores da doença. No entanto, são várias as entidades que atualmente estão a ser estudadas como possíveis biomarcadores da DP.

Uma vez que o diagnóstico da DP é realizado apenas numa fase relativamente tardia da doença, ou seja, apenas quando os sintomas motores se manifestam, e, tendo em conta que estes se manifestam quando cerca de 80% da dopamina estriatal e 60% das células dopaminérgicas da *substantia nigra* foram destruídas, é muito importante sermos capazes de diagnosticar a doença precocemente de maneira a haver a possibilidade de se efetuar uma terapia neuroprotetora mais eficaz (2, 3).

## 2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo realizar uma revisão exaustiva acerca da Doença de Parkinson e de potenciais biomarcadores desta patologia que possam ser usados no diagnóstico e/ou na avaliação da progressão da doença, particularmente em fluidos biológicos. Com esta revisão, pretendeu-se ainda averiguar se existe uma associação entre estes biomarcadores e as alterações não motoras da fase pré-clínica da Doença de Parkinson, possibilitando o diagnóstico precoce da doença.

### 3. Métodos

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed (<http://www.pubmed.com>) e Biblioteca do Conhecimento Online (<http://www.b-on.pt>) com a associação da palavra “*Parkinson*” com as palavras “*etiology*”; “*pathophysiology*”; “*diagnosis*”; “*non-motor symptoms*”; “*treatment*”; “*biomarker(s)*”; “*a-synuclein*”; “*DJ-1*”; “*Cerebrospinal fluid*”; “*blood*” e “*saliva*”.

Não houve restrição de data mas sim do idioma, tendo pesquisado apenas em português, espanhol e inglês. Foram selecionados mais de três centenas de artigos com base no resumo, dos quais foram lidos na íntegra cerca de duzentos artigos.

Foi também realizada uma pesquisa bibliográfica em livros da especialidade e consultados os seguintes sites: Medscape (<http://emedicine.medscape.com/>) e Uptodate (<http://www.uptodate.com/pt/home>).

## 4. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817 como “paralisia agitante” pelo médico inglês James Parkinson (7). É uma patologia neurodegenerativa crônica e progressiva que envolve os gânglios da base consistindo, principalmente, na degeneração celular dos neurónios dopaminérgicos da porção compacta da *substantia nigra* e formação de neuritos e corpos de Lewy nas células sobreviventes (8, 9). Também envolve os sistemas colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos refletindo-se sintomaticamente sobretudo a nível motor, embora também existam sintomas não motores decorrentes da disfunção monoaminérgica múltipla (10).

### 4.1 Etiologia e Patogénese

A etiopatogénese da DP não é ainda totalmente conhecida. Contudo pode-se definir como uma deficiente degradação de proteínas anormais por parte do sistema proteossomal da ubiquitina. São vários os fatores implicados na patogénese da morte celular - neurotoxinas ambientais, stress oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e fatores genéticos - que contribuem para a acumulação anormal de proteínas e formação de corpos de Lewy, que por sua vez, levam a uma disfunção celular e conseqüente morte das células dopaminérgicas (2, 11, 12).

#### 4.1.1 Neurotoxinas ambientais

São vários os estudos que associam um risco aumentado de desenvolver DP com habitação em zonas rurais, ingestão de água do poço, maior exposição a herbicidas e pesticidas, trabalho em minas, assim como a exposição a diversos produtos químicos industriais. Contudo, não há uma evidência científica de relação causa-efeito entre estes fatores ambientais e a ocorrência de DP (13-15). Existem também estudos que indicam haver uma relação inversa entre o tabagismo e a cafeína e a DP (16-18).

O fator ambiental recebeu mais atenção com o estudo da neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina), na década de 80, detetada em drogas (subproduto da heroína) utilizadas por jovens que desenvolveram parkinsonismo (2, 19). A ação tóxica era realizada pela presença de MPP<sup>+</sup> (N-metil-4-fenilpiridínio) - metabolito ativo da MPTP. O MPP<sup>+</sup> interiorizado inibe a fosforilação oxidativa ao interagir com o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, inibindo assim a produção de ATP e reduzindo o metabolismo do oxigénio molecular, o que possibilita a formação de quantidades maiores de peróxido e radicais hidroxila que reagem com os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos provocando a morte celular (19-21).

#### 4.1.2 Stress oxidativo

O stress oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e os sistemas biológicos de defesa antioxidativos. Este é um dos fatores que contribui para a morte das células dopaminérgicas através da ação conjunta do aumento da formação de peróxidos, redução do agente antioxidante glutatião e do aumento da reatividade ao ferro, levando à formação de oxi- radicais tóxicos (13).

#### 4.1.3 Disfunção Mitocondrial

A disfunção mitocondrial que ocorre na DP foi reforçada por estudos de Parkinsonismo induzido pela MPTP onde ocorre inibição seletiva do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na porção compacta da *substantia nigra* do mesencéfalo (13, 19). As alterações que ocorrem no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial provocam uma insuficiência respiratória mitocondrial que, por sua vez, contribui para a lesão neuronal e consequente morte dos neurónios na DP. Assim, a disfunção mitocondrial (decorrente de fatores externos ou genéticos), provoca uma cascata de eventos que culminam com a apoptose (morte celular programada) (13-15, 22).

#### 4.1.4 Excitotoxicidade

A excitotoxicidade é o processo patológico através do qual ocorre lesão e morte dos neurónios após estimulação excessiva dos recetores glutaminérgicos pelo glutamato (principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central), ou por substratos semelhantes. Este processo deve-se a um aumento do influxo de cálcio livre por parte das células neuronais e consequente lesão das proteínas do citoesqueleto, de membranas lipídicas e do ADN, provocando assim a morte das mesmas (13, 23).

#### 4.1.5 Fatores Genéticos

Tendo em conta que cerca de 20% dos pacientes com DP têm um familiar direto com essa mesma patologia e que 5-10% dos pacientes com DP têm parkinsonismo familiar, é natural que se pense que haja uma predisposição genética para esta patologia (13).

A tabela 1 resume os principais genes e loci genéticos relacionados com a DP descobertos até ao momento. Park 1, Park 4 e Park 5 conduzem a uma forma autossómica dominante de DP com características atípicas como idade de início precoce e rápida progressão dos sintomas. Park 1 deve-se a uma mutação no gene da  $\alpha$ -sinucleína (SNCA) que leva a uma anormal agregação desta proteína. Park 2 e Park 7 levam a distúrbios autossómicos recessivos também com características atípicas como formas juvenis de parkinsonismo. Park 2 codifica uma proteína chamada parkina que é uma ligase da ubiquitina. Mutações nesta proteína parecem ser a principal causa para a forma autossómica recessiva da DP.

Uma vez que a ubiquitinação das proteínas as marca como alvos para serem degradadas pelo sistema proteolítico (proteossoma), estas descobertas sugerem que um processamento proteolítico anormal é importante na patogénese de algumas formas de DP. A mais recente mutação identificada é no gene LRRK2 (leucine-rich repeat kinase-2). Apesar de o mecanismo de ação desta mutação não ser plenamente conhecido, evidências sugerem que uma atividade quinase anormal pode mediar a morte das células dopaminérgicas. Um mecanismo semelhante a este pode também ocorrer na Park 6, resultando de mutações na PINK1 (2, 24).

**Tabela 1 - Formas autossómicas dominantes e recessivas da Doença de Parkinson (25)**

Genetic forms with PARK acronym	Mode of inheritance	Chromosomal location	Gene	OMIM®
PARK1 (=PARK4)	Autosomal dominant	4q	<i>SNCA</i>	168601
PARK2	Autosomal recessive	6q	<i>Parkin</i>	600116
PARK3	Autosomal dominant	2p	?	602404
PARK5	Autosomal dominant	4p	<i>UCHL1</i>	191342
PARK6	Autosomal recessive	1p	<i>PINK1</i>	605909
PARK7	Autosomal recessive	1p	<i>DJ1</i>	606324
PARK8	Autosomal dominant	12p-q	<i>LRRK2</i>	607060
PARK9	Autosomal recessive	1p	?	606693
PARK10	?	1p	?	606852
PARK11	?	2q	?	607688

?, unknown gene; *LRRK2*, leucin-rich repeat kinase 2; OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man®; *PINK1*, phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1; *SNCA*,  $\alpha$ -synuclein; *UCHL1*, ubiquitin C-terminal hydrolase.

## 4.2 Sintomatologia e Diagnóstico

O diagnóstico da DP é essencialmente clínico e pode ser feito com alguma confiança em pacientes que apresentem pelo menos dois de quatro sinais cardinais: tremor em repouso; rigidez; bradicinésia; instabilidade postural. O diagnóstico também se baseia na resposta à levodopa. O tremor em repouso é particularmente importante, visto estar presente em 85% dos pacientes com DP, sendo o diagnóstico desta patologia bastante complicado na ausência deste sintoma. Um começo gradual e unilateral dos sintomas ajuda ao diagnóstico (2, 26).

### 4.2.1 Sintomas motores

O sintoma motor mais incapacitante da DP é a bradicinésia que interfere com todos os aspetos da vida quotidiana. O controlo motor fino também está debilitado, evidenciado pela diminuição da destreza manual e micrografia. Hipofonia e sialorreia são outras manifestações preocupantes decorrentes da bradicinésia (2, 27, 28).

O tremor de repouso surge tipicamente unilateral, com uma frequência de 4-6 Hz, acometendo inicialmente a extremidade distal do membro superior, envolvendo os dedos e pulsos. Normalmente o tremor progride proximalmente e ocasionalmente para o membro inferior ipsilateral antes de surgir do outro lado. O tremor pode afetar outras partes do corpo como lábios, língua e mento mas, ao contrário do tremor essencial, raramente afeta a cabeça e o pescoço. O tremor de repouso da DP diferencia-se do tremor essencial por diversas características que estão presentes na tabela 2 (2, 29).

Tabela 2 - Aspectos que diferenciam a DP do tremor essencial (30)

Feature	Parkinson's disease	Essential tremor
Age at onset (y)	55–75	10–80
Family history	+/-	++
Tremor frequency (Hz)	4–6	5–10
Tremor characteristics	Supination–pronation	Flexion–extension
Influencing factors		
Rest	Increases	Decreases
Action	Decreases	Increases
Mental concentration	Decreases	Increases
Writing	Decreases (micrographia)	Increases (tremulous)
Walking	Increases	Decreases
Alcohol	—	Decreases
Postural tremor	Re-emergent	Without latency
Kinetic tremor	+/-	Yes
Limb tremor	Asymmetric	Symmetric
Distribution other than limbs	Face, jaw, lips, chin	Head, voice
Neuroimaging—dopaminergic system	Marked dopaminergic deficit	Mild dopaminergic deficit
Mid-brain sonography	Marked hyper-echogenicity	Mild hyper-echogenicity
Neuropathology	Nigrostriatal degeneration, Lewy bodies	Mild cerebellar degeneration, Lewy bodies in the substantia nigra, brainstem and cerebellum some cases
Treatment	Anticholinergics, amantadine, dopaminergic drugs, deep brain stimulation	Alcohol, beta-blockers, primidone, topiramate, gabapentin, botulinum toxin, deep brain stimulation

A rigidez é outro sintoma motor característico da DP e é sentida pelo paciente como uma resistência uniforme ao movimento passivo de um membro (flexão, extensão, rotação). Interrupções breves e regulares da resistência durante o movimento passivo dão a sensação de “roda dentada”, sobretudo se estiver associada ao tremor. A rigidez pode associar-se a dor, e ombros doridos é uma das manifestações iniciais da DP mais frequentes apesar de ser comumente mal diagnosticada como artrite, bursite ou lesão da coifa dos rotadores (2, 31). Distonia envolvendo o braço distal ou a perna pode aparecer precocemente na DP, sobretudo em pacientes mais jovens.

Distúrbio da marcha é outro dos sintomas motores da DP sendo caracterizada por passos curtos e uma tendência de virar o corpo em bloco. Conhecida como marcha parkinsoniana ou festinante resulta da combinação de uma postura de flexão do tronco (inclinado para a frente) e perda dos reflexos posturais, o que leva a que o paciente acelere a marcha na tentativa de acompanhar o centro de gravidade do corpo (2). O “congelamento” da marcha é uma característica que ocorre numa fase mais avançada da patologia e ocorre normalmente em cinco situações: no início da marcha; quando o paciente tenta mudar de direção ou virar sobre si mesmo; em espaços fechados (como por exemplo uma porta); ao chegar ao seu destino; e em espaços abertos (2, 32).

Anormalidades do equilíbrio e da postura tendem a aumentar com a progressão da doença. Flexão da cabeça, camptocormia - flexão excessiva do tronco, nomeadamente da coluna tóracolumbar, que surge quando o paciente está em pé, agrava com a marcha e melhora/desaparece quando se senta/deita na posição supina - e tendência para manter o braço em flexão são algumas das deformações posturais características da DP (2, 33, 34). A instabilidade postural é também um dos sintomas mais incapacitantes desta patologia contribuindo para quedas e lesões, conduzindo a maior morbilidade e mortalidade (35). As quedas surgem muito tardiamente, cerca de 108 meses após o início da DP, o que permite diferenciar esta patologia de outras como por exemplo paralisia supranuclear progressiva (PSP - *Progressive supranuclear palsy* - as quedas surgem cerca de 16,8 meses após o início da patologia) e da atrofia multissistémica (MSA - *Multiple system atrophy* - as quedas surgem cerca de 42 meses após o início da patologia) (36).

#### 4.2.2 Sintomas Não-Motores

São vários os sintomas não-motores relacionados com a DP, aparecendo muitas vezes numa fase pré-clínica da doença, antecedendo os sintomas motores, tais como perturbações do sistema nervoso autónomo, distúrbios cognitivos, distúrbios sensoriais e do sono. Estes sintomas são comuns e, na maior parte das vezes, são subvalorizados tanto pelos médicos como pelos doentes (37).

As perturbações do sistema nervoso autónomo podem surgir como hipotensão ortostática, distúrbios da sudorese, disfunção esfínctérica e erétil, obstipação e seborreia (38, 39).

Os distúrbios cognitivos incluindo depressão (58%), ansiedade (54%), apatia (49%) e alucinações (44%) são comuns na DP e afetam a maioria dos pacientes numa determinada altura durante o curso da doença, segundo um estudo realizado em 2007 com uma amostra de 537 doentes com DP (40).

O distúrbio comportamental do sono REM (cujo acrónimo em inglês é RBD - *REM behaviour disorder*), considerado um estado pré-parkinsoniano, é caracterizado por um aumento do conteúdo violento dos sonhos acompanhado por falar, gritar, socar, pontapear ou outro tipo de movimentos (41, 42).

Sintomas sensoriais como acatisia (que se caracteriza por inquietação, ansiedade, parestesia, agitação), dor constante ou desconforto nas extremidades, disfunção olfativa (hipósmia) são também frequentes em pacientes com DP embora não sejam reconhecidos como tal (43-45).

## 4.3 Tratamento

Uma vez que esta patologia é incurável, os objetivos do tratamento consistem em preservar a função motora, melhorar a qualidade de vida e evitar complicações induzidas pela medicação (46). Muitos fatores devem ser tidos em conta relativamente ao início do tratamento e qual a abordagem a seguir, tais como, a idade, distúrbios cognitivos ou psiquiátricos, comorbilidades, emprego, estilo de vida e a severidade dos sintomas. Tradicionalmente, o início do tratamento era efetuado quando os sintomas motores interferiam significativamente com o emprego ou com a vida social dos doentes. No entanto, dado que na altura em que surgem os sintomas motores já ocorreu uma perda de cerca de 60%-80% da dopamina, tem-se tornado comum iniciar o tratamento mais cedo, ou seja, antes de haver debilidades funcionais (47, 48). As opções para o tratamento inicial incluem terapias não-farmacológicas, tratamento farmacológico e terapia neuroprotectora. Pode-se ainda considerar tratamento cirúrgico.

### 4.3.1 Terapias Não-Farmacológicas

Estudos em animais e humanos têm aumentado a evidência de que exercício físico e fisioterapia, nos estágios mais precoces da patologia, são benéficos e podem ser neuroprotectores (49). Daí ser importante que todos os pacientes com DP adotem uma rotina de exercício físico ou que consultem um fisioterapeuta para desenvolver um plano de exercício. Da mesma forma, exercícios direcionados para o discurso e para problemas de deglutição também mostraram ter efeitos benéficos e podem ser iniciados muito antes de ocorrerem problemas significativos (50).

### 4.3.2 Tratamento Farmacológico dos Sintomas Motores

Relativamente ao tratamento farmacológico dos sintomas motores são várias as opções como levodopa/carbidopa, inibidores da MAO-B (enzima monoamino oxidase B), agonistas dopaminérgicos e, menos usualmente, anticolinérgicos e amantadina.

#### 4.3.2.1 Levodopa/Carbidopa

Este é o tratamento mais eficaz para a DP e que, a certo ponto durante o curso da doença, se revela necessário para praticamente todos os pacientes. A levodopa (precursor da dopamina) é convertida em dopamina, através da dopa-descarboxilase, no cérebro, restaurando o balanço normal entre a inibição e a excitação do núcleo caudado e putâmen. Isto leva a uma melhoria dos sintomas motores, principalmente da rigidez e acinesia. A razão para se administrar um precursor da dopamina (levodopa) e não a própria dopamina é que, ao contrário da levodopa, a dopamina não atravessa a barreira hemato-encefálica (3). Contudo, em elevadas doses e com uso contínuo, resulta em flutuações motoras e discinesias (51, 52).

A associação da levodopa com carbidopa (inibidor da dopa-descarboxilase) reduz a conversão periférica da levodopa, diminuindo os efeitos secundários predominantes da dopamina circulante como náuseas, vômitos e hipotensão. Além disso, ao minimizar a degradação periférica da levodopa prolonga a sua meia-vida aumentando a sua disponibilidade para o cérebro. Outro método de melhorar a biodisponibilidade da levodopa no plasma e seu consequente acesso ao cérebro é a inibição do metabolismo periférico da levodopa através da via da catecol-O-metiltransferase (COMT). O entacapone é um exemplo de um inibidor da COMT que melhora o transporte da levodopa através da barreira hemato-encefálica e a sua conversão em dopamina. Contudo, a coadministração de levodopa e inibidores da COMT está associada a um aumento da discinesia (53).

#### 4.3.2.2 Inibidores da MAO-B

Como o próprio nome indica os inibidores da MAO-B (enzima que degrada monoaminas) bloqueiam esta enzima o que permite que mais dopamina alcance o cérebro. Os medicamentos desta classe atualmente disponíveis são a selegelina e rasagelina e ambos têm efeito moderado quando administrados em monoterapia (54, 55). A selegelina é metabolizada em metabolitos de anfetamina que podem causar insónias, alucinações e confusão, ao contrário da rasagelina que não contém estes metabolitos pelo que é bem tolerada (48, 56).

#### 4.3.2.3 Agonistas Dopaminérgicos

Os agonistas da dopamina atravessam prontamente a barreira hemato-encefálica para atuar diretamente nos recetores dopaminérgicos pós-sinápticos (sobretudo do tipo D2). Em comparação com a levodopa têm uma meia vida maior o que permite uma estimulação mais uniforme dos recetores dopaminérgicos e têm uma menor incidência de complicações motoras. Existem duas classes de agonistas dopaminérgicos: os ergotamínicos (primeira geração) e os não ergotamínicos (segunda geração) (57, 58). Os ergotamínicos (bromocriptina, pergolida, cabergolina e lisurida), atualmente, não são muito utilizados devido a fortes evidências de que aumentam o risco de doença cardíaca valvular. (59) Os não ergotamínicos, face ao que foi dito anteriormente, são os agonistas dopaminérgicos de primeira linha e podem ser administrados “per os” (pramipexol e ropinirol), por via transdérmica (rotigotina) ou por via subcutânea (apomorfina) (57, 58).

#### 4.3.2.4 Anticolinérgicos e Amantadina

A amantadina normalmente não é usada numa fase inicial da doença já que este medicamento é mais eficaz no tratamento da discinesia induzida pela levodopa (48). Vários estudos sobre o tratamento com amantadina numa fase inicial da DP demonstraram uma leve a moderada melhoria nos sintomas motores em comparação com o placebo,

contudo a maioria destes estudos teve apenas a duração de 2-4 semanas (60). Os efeitos colaterais mais comuns deste fármaco incluem náuseas, cefaleias, edema e eritema.

Os anticolinérgicos são úteis no controlo do tremor em repouso e distonia tanto em monoterapia como coadjuvante (61).

### 4.3.3 Terapia Neuroprotetora

Do ponto de vista farmacológico, as estratégias atuais envolvem a interrupção da cascata de eventos bioquímicos que leva à morte das células dopaminérgicas. O primeiro ensaio clínico na DP foi o estudo DATATOP (Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism) no qual a monoterapia com selegelina atrasava a necessidade de tratamento com levodopa de 9-12 meses em doentes diagnosticados recentemente. O antioxidante vitamina E (tocoferol) não teve efeito (62, 63).

Dois agentes bioenergéticos, Coenzima Q10 e creatina, mostraram ter um papel protetor sobre os neurónios dopaminérgicos contra vários agentes tóxicos em modelos animais (ratos) (64, 65). Foi efetuado um estudo em que foram administradas diferentes doses (300, 600 e 1200mg/dia) de coenzima Q10 a pacientes com DP durante 16 meses ou até haver necessidade de tratamento com levodopa e cujos resultados demonstraram a sua eficácia no abrandamento da deterioração funcional progressiva da DP (66). A creatina, sendo eficaz em melhorar a função mitocondrial, poderá ser útil no desaceleramento da progressão da DP, contudo ainda não há estudos que comprovem esse suposto efeito da creatina devido a amostras pequenas ou curta duração dos estudos efetuados (67).

Os agonistas da dopamina estão sob estudo como possíveis agentes neuroprotectores com base nas suas propriedades antioxidantes resultando em parte das suas capacidades em diminuir a metabolização da dopamina, eliminar radicais livres e interferir com a sinalização celular proapoptótica (68, 69).

Outros agentes promissores incluem os inibidores da óxido nítrico sintetase e agentes antiapoptóticos como a c-Jun N-terminal kinase (JNK) (70, 71).

### 4.3.4 Tratamento Cirúrgico

O tratamento cirúrgico estereotáxico desta patologia era realizado vastamente na década de 50, nomeadamente palidotomia e tálamotomia (procedimentos neuroablativos), contudo a introdução da levodopa nos anos 60 levou ao “abandono” da terapia cirúrgica (72). O ressurgimento no uso da cirurgia estereotáxica, nos anos 90, deve-se às complicações a longo prazo da levodopa, nomeadamente flutuações motoras e discinesias (73). Assim sendo, as principais indicações para o tratamento cirúrgico são o tremor intratável e flutuações motoras induzidas pela levodopa ou discinesias (74).

A estimulação cerebral profunda (ECP) é, atualmente, o procedimento cirúrgico estereotáxico de primeira linha, sendo os procedimentos neuroablativos apenas alternativas à ECP quando esta não é viável devido a razões técnicas, monetárias ou por preferência do paciente (75). A ECP é realizada, na maioria das vezes, bilateralmente e simultaneamente, mas ECP unilateral pode ser muito eficiente em casos assimétricos. Os alvos deste procedimento são os núcleos da base, nomeadamente o núcleo subtalâmico e o globo pálido interno. As razões que favorecem a ECP em detrimento dos procedimentos neuroablativos são não criarem lesões cerebrais e o estimulador poder ser programado tendo em consideração diversas variáveis como a localização do eletrodo, amplitude e frequência, de forma a induzir efeitos terapêuticos melhores enquanto minimiza os efeitos adversos (76).

#### 4.3.5 Tratamento dos Sintomas Não-Motores

São diversos os tratamentos que visam os sintomas não-motores da DP. Tanto a “*American Academy of Neurology*” como a “*Movement Disorders Society*” elaboraram documentos acerca do tratamento destes sintomas (77, 78).

##### 4.3.5.1 Depressão

Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) são os medicamentos mais comuns no tratamento da depressão na DP com eficácia comprovada. Apesar de não haver evidência de um ISRS em particular ser mais eficaz do que outro, o citalopram, o escitalopram e a sertralina têm menores interações medicamentosas em comparação com a paroxetina e a fluoxetina (79).

Os antidepressivos tricíclicos, nomeadamente a nortriptilina e a desipramina, também têm eficácia comprovada no tratamento da depressão na DP. No entanto, devido à sua associação com elevados efeitos colaterais não são muito utilizados (80).

Medicamentos antiparkinsonianos como o pramipexol (agonista dopaminérgico) e a selegilina (inibidor da MAO-B) também exercem efeitos antidepressivos (81, 82).

##### 4.3.5.2 Demência

Inibidores da acetilcolinesterase (rivastigmina e donepezilo) podem melhorar os sintomas de demência na DP providenciando uma estabilização do declínio cognitivo (77, 78).

##### 4.3.5.3 Sintomas psicóticos

O uso de antipsicóticos típicos, tais como haloperidol e a clorpromazina, pode exacerbar os sintomas motores da DP pelo que devem ser evitados (77, 78).

A quetiapina é o antipsicótico atípico mais utilizado uma vez que raramente exacerba os sintomas motores e não é necessário um controlo sanguíneo. Contudo, a sua eficácia não foi comprovada em ensaios clínicos (77, 78).

A clozapina é um antipsicótico atípico que também pode ser utilizado mas requer um controlo sanguíneo devido ao seu potencial para provocar agranulocitose e outros efeitos colaterais graves. Por esta razão este medicamento está reservado para os pacientes que não respondem à quetiapina (77, 78).

#### 4.3.5.4 Ansiedade

Os ISRS e a venlafaxina (IRSN - inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina) têm um efeito benéfico. As benzodiazepinas também podem ser utilizadas mas com cautela e por curtos períodos de tempo devido aos seu efeitos colaterais como sonolência, distúrbios cognitivos e problemas de equilíbrio. Técnicas de modificação comportamental podem desempenhar um importante papel no tratamento da ansiedade (83).

#### 4.3.5.5 Distúrbios do sono

As benzodiazepinas podem ajudar no tratamento do RBD e, caso ocorra apneia obstrutiva do sono, esta pode ser tratada através de ventilação mecânica não invasiva com pressão positiva (CPAP, do inglês "*Continuous Positive Airway Pressure*" ou BIPAP, do inglês "*Bi-level Positive Airway Pressure*"). Técnicas de higiene do sono são aconselhadas e incluem evitar estimulantes ou líquidos antes de deitar, evitar refeições pesadas ao jantar e regular o horário de sono. Para o tratamento da sonolência diurna pode-se utilizar o modafinil (83, 84).

## 5. Biomarcadores

Os biomarcadores ou marcadores biológicos são entidades que podem ser medidas experimentalmente e indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo ou uma resposta a um agente farmacológico (85).

Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, tais como, fisiológicos (funções de órgãos), físicos (alterações características em estruturas biológicas), histológicos (amostras de tecido obtidas por biópsia) e anatómicos. Podem ser células específicas, moléculas, genes, enzimas ou hormonas. Provavelmente os mais relevantes em investigação médica são os marcadores bioquímicos que podem ser obtidos com relativa facilidade a partir de fluidos corporais e que estão ao dispor dos investigadores (86).

Devem ser objetivos, económicos, acessíveis, facilmente quantificáveis e que se correlacionem com a presença ou gravidade da patologia (87).

### 5.1 Qual a necessidade de ter tais marcadores na DP?

#### 5.1.1 Melhorar e/ou facilitar o diagnóstico

Os biomarcadores teriam dois objetivos para a DP, diferenciação de indivíduos suscetíveis dos indivíduos normais antes da apresentação de sintomas (sensibilidade) e identificação da Doença de Parkinson e sua distinção de outras patologias que envolvem os gânglios da base - Demência com Corpos de Lewy (DCL), PSP, MSA - e outras síndromes parkinsonianas (especificidade). Mesmo em centros altamente especializados a sensibilidade do diagnóstico clínico da DP em pacientes sintomáticos é de cerca de 91% (88).

A necessidade de um diagnóstico precoce e pré-sintomático na DP é guiada pela evolução de putativos agentes neuroprotectores (70, 71) que seriam idealmente administrados antes do aparecimento dos sintomas clínicos ou motores da DP, tendo em conta que estes ocorrem quando 60-80% das células dopaminérgicas nigro-estriatais já morreram (47). Estima-se que a fase pré-sintomática da DP dure cerca de 5 anos (89, 90) providenciando uma oportunidade de estabelecer um diagnóstico precoce, ou seja, antes do início dos sintomas motores característicos da DP.

#### 5.1.2 Para acompanhar a progressão da doença e demonstrar a eficácia do tratamento

Quando o diagnóstico da DP é estabelecido, o papel dos biomarcadores altera-se. Um papel importante é providenciar, nos ensaios longitudinais de tratamento clínico,

“*surrogate endpoints*” (é a medida do efeito de um determinado tratamento que pode estar relacionado com um *endpoint* clínico - Resultado ou desfecho que se pretende quantificar através de um ensaio clínico desenhado para esse fim) que, caso sejam apropriadamente validados, podem fornecer um grau de objetividade e potencialmente permitir a redução tanto da duração do ensaio como do número de pacientes requeridos para haver significância (91, 92). Infelizmente atualmente, tais biomarcadores não existem para a DP.

Na DP estabelecida há dois problemas em particular que os biomarcadores vão ter de ultrapassar. Primeiro é difícil ter a certeza da magnitude do efeito do tratamento através da avaliação clínica dado que os sintomas flutuam ao longo do tempo e a maioria das avaliações dos pacientes são subjetivas. Com o objetivo de ultrapassar essa subjetividade têm sido elaboradas e utilizadas escalas de classificação, como a UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) (93). O segundo obstáculo é que alguns putativos agentes neuroprotectores (como por exemplo os agonistas da dopamina) também têm efeitos sintomáticos não relacionados com a sua ação modificadora da doença. Isto afeta a capacidade das escalas de classificação clínicas de detetarem uma ação neuroprotectora (94). Por estas razões há a necessidade de um biomarcador que detete com segurança um atraso na progressão da doença sem depender de sintomas.

# 6. Biomarcadores da Doença de Parkinson

São em grande número as entidades passíveis de atuar como biomarcadores da DP e, por forma a facilitar a sua revisão, vão ser agrupados em quatro categorias - exames de imagem como biomarcadores, biomarcadores clínicos, biomarcadores genéticos e biomarcadores bioquímicos.

## 6.1 Exames de imagem como biomarcadores

### 6.1.1 Radiotracer neuroimaging

Um dos biomarcadores mais bem estudados na DP é o “*radiotracer neuroimaging*” (RTI) do sistema nigroestriatal utilizando a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês “*Positron Emission Tomography*”) com  $^{18}\text{F}$ -fluorodopa ou  $^{11}\text{C}$ -VMAT2, ou utilizando ligandos de transportadores da dopamina como  $^{123}\text{I}$ -B-CIT tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, do inglês “*Single photon emission computed tomography*”) e [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]TRODAT-1 SPECT. A imagem do transportador de dopamina através da SPECT e da via nigroestriatal através da PET com fluorodopa é útil para a identificação de parkinsonismo pré-sináptico. Contudo o RTI não está vastamente disponível, é caro e não consegue diferenciar a DP de outras formas de parkinsonismo pré-sináptico (95, 96). Os RTI têm uma tremenda utilidade clínica na diferenciação entre parkinsonismo pré-sináptico e múltiplas outras condições com características clínicas que coincidam com as da DP, como parkinsonismo induzido por medicamentos, Doença de Alzheimer (DA), parkinsonismo/tremor psicogénico e tremor essencial. RTI também pode ser útil como um marcador pré-motor da DP, uma vez que os défices dopaminérgicos são evidentes em RTI muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores da DP (95, 97).

No entanto, a terapia sintomática pode regular ou modificar os resultados de RTI na DP. Os efeitos dos tratamentos atuais nestes putativos biomarcadores da progressão da doença ainda estão para ser determinados na sua totalidade, enquanto que vários ensaios clínicos demonstraram um rápido declínio dos marcadores de RTI nos indivíduos tratados com levodopa apesar de apresentarem uma melhoria clínica (95, 98).

À partida, o melhor método de diagnosticar pacientes com parkinsonismo utilizando RTI é através da combinação de duas técnicas de RTI:  $^{18}\text{F}$ -deoxiglicose PET e um exame dopaminérgico ( $^{18}\text{F}$ -fluorodopa PET,  $^{123}\text{I}$ -B-CIT SPECT ou [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]TRODAT-1 SPECT). Com esta combinação e utilizando uma análise automática de imagem, parece que os indivíduos com

com DP, MSA e PSP podem ser classificados com especificidades a rondar os 94%-97%, de acordo com alguns autores (99).

Exames de imagem utilizando  $^{123}\text{I}$ -meta-iodo-benzil-guanidina (MIBG) aparentam ser uma promessa na diferenciação da DP de MSA. Este exame é útil para a visualização de terminais catecolaminérgicos *in vivo* e, por isso, é útil na deteção de desnervação simpática cardíaca. Na DP e na DCL há uma perda significativa da ligação de  $^{123}\text{I}$ -MIBG ao coração, enquanto que na MSA e na PSP, há apenas uma modesta redução da inervação simpática cardíaca. Esta técnica é moderadamente sensível e específica para fazer a diferenciação nestas condições, embora comorbilidades e medicações possam alterar os resultados, pelo que devem ser considerados (100).

### 6.1.2 Ultrassonografia Transcraniana

Ao longo da última década a ultrassonografia transcraniana (UT) tem vindo a ser cada vez mais utilizada para ajudar os clínicos no diagnóstico diferencial das síndromes parkinsonianas. A primeira demonstração de um aumento da ecogenicidade por parte da *substantia nigra* utilizando a UT na DP foi feita por Becker et al em 1995 (101). Numerosos autores replicaram este trabalho e expandiram-no, tendo sido feitos vários estudos, principalmente na Áustria e Alemanha (102-104).

Em pacientes diagnosticados com DP, mais de 90% apresentam hiperecogenicidade da *substantia nigra* (105). A área hiperecogénica da *substantia nigra* não aumenta de tamanho à medida que a DP avança, e as autópsias de pacientes com DP aparentam correlacionar o teor de ferro do tecido com a hiperecogenicidade da *substantia nigra*. A área ecogénica da *substantia nigra* aparenta relacionar-se diretamente com a idade de início da DP mas não se altera ao longo do tempo (103). A constância relativa da área hiperecogénica da *substantia nigra* na DP sugere que este achado é, provavelmente, um marcador para a doença mas não é capaz de servir como um indicador da progressão da doença. Há alguma evidência de que a UT pode ser utilizada no diagnóstico diferencial de parkinsonismo (106).

### 6.1.3 Imagem por Ressonância Magnética

A imagem por ressonância magnética convencional (MRI) revela alterações estruturais do cérebro como reduções no volume (atrofia) e alterações nos tempos de relaxação T1 e T2. No entanto, esta técnica, na DP, revela uma estrutura normal da *substantia nigra* pelo que não é diagnosticamente útil. Estudos de análise volumétrica através da MRI também falharam em detetar uma redução de volume da *substantia nigra* na DP, possivelmente por causa de dificuldades em definir, com precisão, o limite da porção compacta da *substantia nigra* (107). Contudo, a MRI revela lesões estruturais como tumores dos gânglios basais, doença de pequenos vasos, alterações de sinal dos gânglios basais

devido a doença de Wilson, envenenamento por manganésio ou efedrona e hidrocefalia, permitindo assim que estas desordens sejam excluídas como causas secundárias de parkinsonismo.

Um trabalho recente utilizando uma técnica de MRI, nomeadamente imagem por tensores de difusão (ITD), aparenta ser bastante promissor no que toca ao diagnóstico diferencial de DP e no seguimento da progressão da doença. Os autores identificaram alterações de ITD na porção caudal da *substantia nigra* de pacientes com DP em comparação com controlos saudáveis com a mesma idade. Eles foram capazes de distinguir corretamente pacientes com DP precoce não tratada dos controlos com base em características de ITD da porção caudal da *substantia nigra* (108).

## 6.2 Biomarcadores Clínicos

Um paciente pode apresentar-se com tremor em repouso assimétrico e bradicinésia com características associadas de perda de mímica facial e redução do balanço do braço ipsilateral ao tremor em repouso (sem história de exposição a agentes bloqueadores de dopamina). Se a progressão destes sintomas for gradual e se responder positivamente ao tratamento com levodopa ao longo do tempo, é quase certo (>90%) que este paciente apresentará DP na autópsia (109).

Infelizmente, muitos pacientes com parkinsonismo não apresentam as características clássicas da DP que permitem um diagnóstico definitivo (110). Nos cuidados primários, os pacientes podem ser diagnosticados como tendo DP quando na verdade têm parkinsonismo induzido por medicamentos, tremor essencial ou parkinsonismo atípico (MSA ou PSP) em cerca de 50% dos casos. Mesmo nas mãos de neurologistas, cerca de 10%-15% dos pacientes com DP precoce são mal diagnosticados (111).

### 6.2.1 Distúrbio comportamental do sono REM idiopático

O RBD é caracterizado pela ausência de atonia durante o sono REM. Pode ser idiopático ou causado por uma variedade de condições como a abstinência de sedativos/hipnóticos ou outros medicamentos. O diagnóstico requer um polissonograma com eletromiografia (EMG) do mento, que tipicamente mostra um aumento da atividade tónica do mento através da EMG durante o sono REM. RBD idiopática é talvez um dos sinais mais precoces da DP em muitos pacientes, precedendo os sintomas motores da DP por muitos anos (112, 113). Pesquisas recentes identificaram RBD idiopática como um dos sintomas/sinais pré-motores mais correlacionado com o futuro desenvolvimento de uma sinucleinopatia (MSA, DCL ou DP) ou demência, com um risco de cerca de 52% de se desenvolver uma destas condições em 12 anos (112). Dado o alto risco destes pacientes para desenvolverem uma sinucleinopatia, o uso deste biomarcador clínico vai ajudar os clínicos e os pesquisadores a testarem potenciais terapias modificadoras da doença mais cedo, ainda

na fase pré-motora da DP. Parece haver uma correlação definida entre a RBD idiopática e resultados neuroimagingológicos típicos de DP na UT, e défices olfativos, indicando que a RBD idiopática é um excelente marcador pré-motor de futura patologia neurodegenerativa (114).

### 6.2.2 Défices Olfativos/Hipósμία

A identificação de défices olfativos pode preceder os sintomas motores da DP por muitos anos (115). A identificação de défices olfativos através de testes como o “*University of Pennsylvania Smell Identification Test*” (UPSIT) ou o “*Sniffin’ Sticks*” podem ser úteis na diferenciação da DP de outros distúrbios do movimento e outras formas de parkinsonismo (116, 117). Contrastando com outros potenciais biomarcadores, o olfato fica debilitado muito cedo no decurso da DP, precedendo os sintomas motores (115, 116). Os défices olfativos ocorrem em 70%-90% dos pacientes com DP mas não se correlacionam com a duração da doença, são bilaterais e não são influenciados pelo tratamento com levodopa (118). Contudo, muitos dos pacientes com DP, se não todos, não se apercebem dos défices olfativos aquando da sua apresentação (116, 118).

Apesar dos défices olfativos no UPSIT não serem específicos para a DP, a presença destes défices pode servir como um potencial biomarcador para ajudar os clínicos no diagnóstico diferencial da DP, nomeadamente diferenciando a DP de outras formas de parkinsonismo, uma vez que pacientes com parkinsonismo psicogénico, MSA, PSP, degeneração corticobasal (DCB) ou parkinsonismo vascular (118, 119) não têm défices olfativos significativos. Em 2007 Bohnen et al. identificou três cheiros no UPSIT que se correlacionam com défices dopaminérgicos imagingológicos em pacientes com DP (120).

Dado que os défices olfativos podem preceder o início da sintomatologia motora da DP por muitos anos, esta debilidade pode ser um biomarcador barato, vastamente disponível para a deteção precoce e diagnóstico da DP, sobretudo se for acoplado a exames de neuroimagem.

### 6.2.3 Obstipação

Há várias maneiras de definir e caracterizar a obstipação incluindo a frequência da motilidade intestinal e a consistência das fezes. A obstipação é muito comum na população em geral e ainda mais na DP, afetando a maioria dos pacientes (121). Pode preceder o desenvolvimento da DP por muitos anos, e no “*Honolulu Aging Study*”, a frequência da motilidade intestinal foi inversamente correlacionada com um risco de desenvolver DP, com aqueles que tinham uma motilidade intestinal menor a apresentarem um risco maior de desenvolverem DP (122). Contudo a obstipação, isoladamente, não é específica como um biomarcador precoce da DP mas em combinação com défices olfativos ou marcadores neuroimagingológicos pode ser bastante útil.

## 6.3 Biomarcadores Genéticos

Numerosos fatores genéticos podem desempenhar um papel na suscetibilidade para desenvolver DP, contudo, a grande maioria dos casos de DP (>85%) são esporádicos e não herdados (123).

Determinadas mutações genéticas têm um papel mais proeminente do que outras. Em pacientes com DP juvenil (DP com idade de início <20 anos), deve-se considerar realizar o teste para PARK2 ou parkina, disponível comercialmente, dado que 80-90% dos pacientes com parkinsonismo juvenil podem ter esta forma autossômica recessiva de DP. (124) Do mesmo modo, seria sensato considerar mutações do gene LRRK2 (especialmente G2019S) no parkinsonismo autossômico dominante, dado que esta mutação emergiu como a forma genética mais comum de DP em caucasianos (123, 125). Mutações no gene da glucocerebrosidase estão mais frequentemente presentes em indivíduos com DP em relação aos controles, indicando que mutações neste gene estão fortemente associadas ao desenvolvimento de DP (126).

## 6.4 Biomarcadores Bioquímicos

Marcadores bioquímicos, particularmente aqueles que refletem a patogênese da DP, são extremamente necessários em amostras facilmente acessíveis do ponto de vista clínico (líquido cefalorraquidiano - LCR, sangue e saliva), sendo que até à data, os marcadores bioquímicos mais extensamente estudados são aqueles presentes no LCR. São vários os potenciais marcadores bioquímicos da DP assim como a sua utilidade clínica e investigacional. Contudo, nenhum destes marcadores reúne completamente os critérios definidos para ser um biomarcador ideal da DP. Os mais recentes candidatos a marcadores são descobertos através da utilização da tecnologia “-omics” e ainda estão num estágio preliminar com os resultados a serem obtidos em coortes pequenas. Portanto a validação destes marcadores necessita de coortes maiores (127, 128). Em semelhança ao campo dos biomarcadores de neuroimagem, os maiores desafios em relação aos marcadores bioquímicos incluem a definição de biomarcadores prodrômicos e outros relacionados com as disfunções não-motoras.

### 6.4.1 Biomarcadores no Líquido Cefalorraquidiano

Tendo em conta que alterações moleculares que ocorrem no cérebro são refletidas na composição do LCR, este fluido representa uma fonte ideal de biomarcadores de diferentes processos patofisiológicos caracterizando fases precoces da doença, quando o diagnóstico clínico é mais complicado. Por exemplo, AB<sub>42</sub>, tau total (t-tau) e tau fosforilada (p-tau) são marcadores da DA que refletem esta patologia numa fase pré-demência (129). Com o mesmo intuito, principalmente na última década, tem havido uma contínua pesquisa/investigação de biomarcadores da DP no LCR (130).

#### 6.4.1.1 Proteínas do complemento

Foi sugerido que a ativação do sistema do complemento está envolvida na patogénese de diversas doenças neurodegenerativas incluindo DA, DP e esclerose múltipla (EM). Num estudo realizado em 2005 por Finehout et al., foram comparados os níveis das seguintes proteínas do complemento - C3b, C4b, fator B e fator H - entre indivíduos normais (controlos) e pacientes diagnosticados com DA, DP, EM e neurosífilis, observando uma maior diminuição dos níveis destas proteínas do complemento nos pacientes com patologias neurodegenerativas em relação aos controlos. Além disso, as alterações quantitativas das proteínas do complemento permitiram o diagnóstico diferencial da DP e EM em relação à DA e neurosífilis, contudo não foi possível distinguir a DP da EM (131).

#### 6.4.1.2 $\alpha$ -sinucleína

A  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) é uma proteína de 140 aminoácidos que está presente abundantemente nas células neuronais (132). Já há alguns anos que a  $\alpha$ -sin tem sido implicada na etiologia e patogénese da DP, tendo sido identificada como o principal componente da agregação anormal de proteínas nas células neuronais (corpos de Lewy) (133). Mutações *missense* no gene SNCA que codifica a  $\alpha$ -sin foram identificadas em doentes com DP autossómica dominante (134). Um dos primeiros estudos realizados com o intuito de avaliar a presença e a concentração de  $\alpha$ -sin no LCR comparando 12 doentes com DP a 10 controlos, foi realizado por Borghi et al. em 2000. A conclusão do estudo foi que, apesar de a  $\alpha$ -sin ser libertada pelos neurónios no espaço extracelular, não existiam diferenças entre os doentes com DP e os controlos, pelo que a  $\alpha$ -sin no LCR não parecia ser um biomarcador fiável para o diagnóstico da DP (135). No entanto, em 2006, com a utilização de uma nova técnica de ELISA para quantificar os níveis de  $\alpha$ -sin no LCR, foram verificadas concentrações desta proteína significativamente inferiores na DP do que nos controlos (não havendo interações da idade ou género com o diagnóstico) devido a: 1 - agregação intracelular da  $\alpha$ -sin e subsequente acumulação nos neurónios afetados; 2 - redução patológica da atividade funcional dos neurónios que libertam a  $\alpha$ -sin; 3 - redução da expressão do gene SNCA pelas células saudáveis, em resposta a um evento de sinalização associado à DP, que levaria a uma diminuição da exocitose da  $\alpha$ -sin (9). Em 2008, Mollenhauer et al. verificaram uma concentração inferior de  $\alpha$ -sin no LCR de doentes com patologias neurodegenerativas, particularmente do tipo sinucleinopatias (136). No ano seguinte, e no seguimento dos estudos previamente citados (9, 136), Ohrfelt et al. (137) utilizaram uma nova técnica de ELISA em que o LCR era colhido no dia em que iria ser processado sendo submetido a centrifugação seguida de armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser analisado, para detetar concentrações de  $\alpha$ -sin no LCR  $<50\text{pg/mL}$ . Neste estudo foram comparados doentes com DA, DP, DCL e 55 controlos saudáveis, cujos resultados apresentaram uma concentração de  $\alpha$ -sin bastante inferior apenas no grupo dos doentes com DA, indo contra a hipótese de a  $\alpha$ -sin poder ser um biomarcador

confiável para o diagnóstico de DP sugerida pelos dois estudos anteriores (9, 136). Ohrfelt et al. (137) apontaram que o ensaio descrito por Tokuda et al. (9) necessitava de LCR concentrado (submetido a manipulação extensa com ciclos de revestimento, lavagem e incubação após a colheita, centrifugação e incubação do LCR), o que poderia ter levado a uma quantificação dos níveis de  $\alpha$ -sin inadequada, enquanto que o ensaio descrito por Mollenhauer et al. (136) necessitava de incubação extrema do LCR a 4°C por um período de 48 horas (para que ocorresse o revestimento das placas com o anticorpo), o que poderia facilitar a oligomerização *in vitro* da proteína e consequente diminuição da sua concentração. Após um estudo de 2006 (138) que demonstrou concentrações elevadas de oligómeros de  $\alpha$ -sin no plasma na DP, Tokuda et al. (139), em 2010, resolveram investigar as concentrações de oligómeros da  $\alpha$ -sin e a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total no LCR de pacientes com DP, PSP, DA e controlos saudáveis utilizando a técnica de ELISA (ligeiramente modificada e por eles utilizada anteriormente (9)). Concluíram que as concentrações de oligómeros de  $\alpha$ -sin e a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total no LCR estavam elevadas em pacientes com DP em comparação com os controlos e com os pacientes com DA e PSP. A precisão diagnóstica aumentou ao utilizar a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total. Os níveis de oligómeros de  $\alpha$ -sin também estavam aumentados nos estádios iniciais da DP pelo que os oligómeros de  $\alpha$ -sin poderiam ser biomarcados no diagnóstico precoce da DP, ainda numa fase pré-sintomática e que a razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total poderia ser utilizada no rastreio de indivíduos com elevado risco de DP (139). Com o objetivo de avaliar o poder discriminatório de vários biomarcadores do LCR para a DP, Parnetti et al. (140) em 2014, mediram várias proteínas, que desempenham um papel importante na patogénese da doença, no LCR de 71 pacientes com DP e em 45 pacientes com outras condições neurológicas mas sem défices motores ou cognitivos (controlos). No que diz respeito aos biomarcadores relacionados com a  $\alpha$ -sin, eles confirmaram, o que outros previamente tinham constatado (9, 141, 142), que no grupo da DP há uma redução dos níveis de  $\alpha$ -sin total no LCR (140). Também constataram um aumento tanto nos oligómeros de  $\alpha$ -sin como na razão oligómeros/ $\alpha$ -sin total (140), indo de acordo com os resultados encontrados por Tokuda et al. (139) e Bruggink et al. (143).

#### 6.4.1.3 DJ-1

A DJ-1 é uma proteína multifuncional de 189 aminoácidos e, à semelhança da  $\alpha$ -sin, é expressa amplamente no sistema nervoso central e periférico, que tem sido implicada na proteção contra o stress oxidativo (144). Uma das causas de DP autossómica recessiva são as mutações *nonsense* do gene da DJ-1 (PARK7) (145). Em 2006, Waragai et al. (146), com a utilização de técnicas quantitativas de Western Blot no LCR, concluíram que as concentrações de DJ-1 no LCR de pacientes com DP eram mais elevadas que as dos controlos, sobretudo na fase inicial da doença, provavelmente devido a um efeito protetor antioxidativo da DJ-1 nas fases precoces da DP e, por essa razão, propuseram que a DJ-1 no LCR poderia ser um biomarcador para a DP numa fase precoce (146).

Na sequência dos resultados inconclusivos dos estudos, previamente referidos, acerca das concentrações de  $\alpha$ -sin e DJ-1 no LCR e a subsequente possibilidade de servirem como biomarcadores da fase precoce da DP, em 2010, Hong et al. (141) resolveram estudar as concentrações destas proteínas no LCR, utilizando uma técnica quantitativa inovadora conhecida como “Luminex”, que permitiu a quantificação destas proteínas com maior sensibilidade associada ao controlo de variáveis de enviesamento como contaminação sanguínea, gradiente rostro-caudal no LCR, idade e sexo. As conclusões que tiraram foram de que as concentrações de DJ-1 e  $\alpha$ -sin no LCR são dependentes da idade e influenciadas pela contaminação sanguínea do LCR. Definiram também que os doentes com DP têm concentrações de  $\alpha$ -sin e DJ-1 diminuídas no LCR em comparação com doentes com DA e controlos quando se elimina o efeito da contaminação sanguínea. Concluíram que, em indivíduos com >65 anos, a DJ-1 e a  $\alpha$ -sin conseguem discriminar pacientes com DP dos controlos, com sensibilidades e especificidades de 90 e 70% para a DJ-1 e 92 e 58% para a  $\alpha$ -sin, respetivamente. No entanto, a combinação de ambos os marcadores não aumenta a precisão diagnóstica (141).

#### 6.4.1.4 Tau e $\beta$ -amilóide

Estudos de associação genética (147, 148) encontraram associações entre o gene que codifica a proteína tau (MAPT) e a DP. Contudo, esta observação surgiu principalmente em coortes de descendentes europeus (147) mas não foi encontrada numa coorte japonesa, indicando que pode haver diferenças geográficas relativamente aos genes associados com a DP (148). Estudos utilizando coortes maiores reportaram que os níveis de tau e da p-tau estão diminuídos em pacientes com DP sintomática comparativamente aos controlos (149, 150).

Na DA já foi estabelecida uma relação entre uma diminuição nos níveis da  $A\beta_{42}$  no LCR e o distúrbio da cognição (sintoma que a DA tem em comum com a DP) (129). Em amostras de LCR obtidas a partir de pacientes com DP, as isoformas da proteína  $\beta$ -amilóide  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  estavam diminuídas em comparação com os controlos (151). Contudo, em contraste com a DA, não há um aumento consistente da tau em combinação com a diminuição da  $A\beta$  em pacientes com DP e distúrbios da cognição ou demência (149, 151, 152).

É de referir que devido à heterogeneidade de pacientes com DP, uma combinação de vários marcadores pode ser necessária para alcançar sensibilidades e especificidades elevadas. Tal é evidenciado pelo facto de que a razão entre a  $\alpha$ -sin com a percentagem de p-tau permite distinguir a DP de MSA (150). Além disso, a razão entre a fractalcina, um mediador inflamatório da microglia, e a  $A\beta_{42}$  correlaciona-se positivamente com a severidade e progressão da DP em estudos transversais e longitudinais de amostras de LCR (150). Assim, utilizando combinações de marcadores proteicos e/ou técnicas de imagem

poderia produzir-se um biomarcador que não só diagnosticasse a DP mas também permitisse acompanhar a progressão da doença.

## 6.4.2 Biomarcadores no Sangue

Um biomarcador sanguíneo era ideal dado que a flebotomia é uma técnica de baixo custo, minimamente invasiva e de fácil acesso. Contudo, vários desafios se colocam no desenvolvimento de um biomarcador sanguíneo. Em primeiro lugar não existe uma conexão direta entre o cérebro e o sangue periférico. Em segundo lugar, o sangue é uma mistura heterogênea de células, proteínas, lípidos e vários produtos do metabolismo. No entanto, apesar destes obstáculos, vários avanços nesta área de pesquisa ocorreram ao longo dos últimos anos.

### 6.4.2.1 $\alpha$ -sinucleína

Inicialmente pensava-se que esta proteína era estritamente intracelular mas a sua identificação tanto no LCR como no plasma forneceu evidências de que a  $\alpha$ -sin era secretada pelas células (153). Esforços intensos para estudar a  $\alpha$ -sin no LCR como biomarcador diagnóstico da DP estão em andamento com resultados promissores (139) (140). Já a pesquisa de um biomarcador sanguíneo baseando-se na  $\alpha$ -sin não tem corrido tão bem. Tentativas de medir oligómeros de  $\alpha$ -sin (138),  $\alpha$ -sin total (154) e  $\alpha$ -sin fosforilada (155) no plasma, todas com o objetivo de desenvolver um biomarcador sanguíneo, têm sido realizadas. Enquanto que um estudo preliminar comparando os níveis de oligómeros de  $\alpha$ -sin entre 34 pacientes com DP e controlos (com a mesma idade) mostrou que um elevado sinal (definido como  $>0.5$  de densidade ótica) ocorreu cerca de 3.5 vezes mais nos pacientes com DP em comparação com os controlos (138), outro estudo realizado pelo mesmo grupo que, anos mais tarde, comparou os níveis de várias formas de  $\alpha$ -sin (total, oligómeros, total fosforilada e oligómeros fosforilados) em 32 pacientes com DP e 30 controlos não foi capaz de reproduzir os mesmos resultados (155). Várias dificuldades técnicas, incluindo a grande abundância de  $\alpha$ -sin dentro dos glóbulos vermelhos e comorbidades existentes apenas num grupo, podem explicar a falta de reproductibilidade. De facto, estudos subsequentes reportaram tanto aumentos (156) como diminuições (157) na  $\alpha$ -sin plasmática de pacientes com DP em comparação com os controlos. Em julho deste ano, Shi et al. (158) publicaram um estudo em que descobriram, através de uma injeção intracerebroventricular de um radioisótopo de  $\alpha$ -sin no cérebro de ratos, que a  $\alpha$ -sin do LCR era prontamente transportada para o sangue. Subsequentemente desenvolveram uma técnica para avaliar os níveis de  $\alpha$ -sin nos exossomas de amostras de plasma individuais. Quando aplicada a uma grande coorte de amostras clínicas (267 pacientes com DP e 215 controlos), descobriram que, em contraste com as concentrações de  $\alpha$ -sin no LCR - que têm sido consistentemente relatadas a ser inferiores em pacientes com DP comparativamente aos controlos, os níveis de  $\alpha$ -sin

exossomal no plasma eram substancialmente superiores nos pacientes com DP, sugerindo um efluxo aumentado da  $\alpha$ -sin para o sangue periférico destes pacientes. Além disso, apesar de não se ter observado uma associação entre a  $\alpha$ -sin exossomal do plasma e a  $\alpha$ -sin do LCR, foi observada uma correlação significativa entre a  $\alpha$ -sin exossomal do plasma e a severidade da doença, assim como a sensibilidade e especificidade alcançada pela  $\alpha$ -sin exossomal do plasma era comparável àquelas determinadas pela  $\alpha$ -sin do LCR (158).

#### 6.4.2.2 DJ-1

Esta proteína surgiu como candidata a biomarcador da DP após mutações no gene que codifica a DJ-1 (PARK7) terem sido identificadas na DP familiar (159). Uma vez que esta proteína é considerada um possível biomarcador da DP no LCR (141, 146) pelas suas maiores concentrações no LCR de pacientes com DP em comparação com os controlos, em 2007 Waragai et al. (160) propuseram determinar os níveis de DJ-1 no plasma de pacientes com DP, em pacientes com DCL e controlos saudáveis (com idades ajustadas), através das técnicas de Western Blot e ELISA, com o objetivo de obterem resultados semelhantes àqueles observados no LCR. Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de DJ-1 no plasma de pacientes com DP eram superiores aos dos controlos. Além disso, os níveis plasmáticos de DJ-1 nos pacientes com DP avançada eram superiores àqueles observados numa fase precoce da DP, sugerindo uma correlação da DJ-1 plasmática com a severidade/progressão da DP. Os níveis plasmáticos da DJ-1 também estavam significativamente aumentados nos pacientes com DCL em comparação tanto com os controlos como com um estágio inicial da DP. Tendo em conta estes resultados, Waragai et al., sugerem que a DJ-1 plasmática pode ser um biomarcador útil na avaliação da severidade da DP e possivelmente em outras doenças com corpos de Lewy (160). Contudo no ano seguinte, Maita et al. (161) realizaram um estudo em que examinaram os níveis da DJ-1 plasmática, utilizando a técnica de ELISA, em 95 pacientes com DP e 70 controlos saudáveis não encontrando diferenças significativas entre os dois grupos. Além disso, também não encontraram correlações entre os níveis de DJ-1 plasmática e a idade, severidade clínica da DP nem com o nível de stress oxidativo (161).

Com o intuito de clarificar a utilidade da DJ-1 e  $\alpha$ -sin plasmáticas como biomarcadores da DP, Shi et al. (162) em 2010, estudaram amostras de 126 pacientes com DP e 122 controlos saudáveis utilizando a técnica Luminex, previamente utilizada por Hong et al. (141) na quantificação de ambas as proteínas no LCR, que em comparação com as técnicas de ELISA e Western Blot, apresenta maior sensibilidade e especificidade (162). O mais importante é que vários fatores de viés incluindo hemólise (medida através da hemoglobina), contaminação plaquetária (refletida pelos níveis de P-selectina solúveis) e a idade também foram avaliados neste estudo. Correlações positivas entre a hemoglobina e a DJ-1 assim como entre a P-selectina e a DJ-1 foram observadas. As contribuições dos diferentes componentes do sangue para os níveis de DJ-1 e  $\alpha$ -sin

plasmáticas também foram avaliadas e mais de 95% da DJ-1 e  $\alpha$ -sin plasmáticas era proveniente dos glóbulos vermelhos. Em relação ao efeito da idade, foi detetada uma diminuição na DJ-1 e  $\alpha$ -sin plasmáticas em pacientes com DP; apenas a  $\alpha$ -sin diminuiu com a idade nos controlos (162). Após este estudo tornou-se evidente que no desenvolvimento de biomarcadores é importante a existência de medidas de controlo de qualidade sobretudo em relação aos fatores que podem influenciar os resultados. Infelizmente, mesmo após o controlo de tais variáveis, neste estudo não houve diferenças significativas nos níveis plasmáticos da DJ-1 e  $\alpha$ -sin entre os pacientes com DP e controlos, sugerindo que estas proteínas não têm utilidade como biomarcadores para o diagnóstico e/ou prognóstico da DP (162). Lin et al. em 2012 (163), avaliaram os níveis de DJ-1 total e das suas isoformas no sangue utilizando técnicas de eletroforese e Western Blot, assim como espectroscopia de massa para a análise de isoformas de DJ-1 e modificações pós-translacionais. Este estudo confirmou que os níveis de DJ-1 total não eram diferentes entre os pacientes com DP e os controlos. Contudo, entre as modificações pós-translacionais identificadas, um ensaio específico e sensitivo poderia ser desenvolvido para a 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), frequentemente indicativa de stress oxidativo. Frações de isoformas específicas de DJ-1 HNE-modificadas foram consideradas como sendo significativamente diferentes em pacientes com DP em comparação com os controlos e num estadio tardio da DP em comparação com um estadio inicial (163).

#### 6.4.2.3 Ácido úrico

A relevância do ácido úrico na patofisiologia da DP foi sugerida pelas supostas propriedades antioxidantes do ácido úrico, quando em 1994 Church et al. (164) identificaram níveis diminuídos de ácido úrico na *substantia nigra* de pacientes com DP e que o ácido úrico tinha a capacidade de diminuir a oxidação de dopamina (164). O seu potencial como biomarcador da DP foi primeiramente introduzido pela análise dos níveis de ácido úrico e do risco da incidência de DP entre 7,968 homens inscritos no “Honolulu Heart Program” (165). Nessa coorte, os níveis de ácido úrico foram obtidos no início do estudo e após 30 anos de seguimento, durante os quais 92 homens desenvolveram DP. Homens com concentrações de ácido úrico acima da média, no início do estudo, tiveram uma redução de 40% na incidência de DP comparativamente àqueles com concentrações abaixo da média, após ajuste para a idade e historial de tabagismo (165). Num estudo prospetivo em 2005 (166), os níveis de ácido úrico foram obtidos no início do estudo em 4,695 participantes com idade >55 anos, em que 68 novos casos de DP foram detetados ao longo de 9,4 anos de seguimento. Após ajuste para a idade e género, níveis mais elevados de ácido úrico foram associados a um risco menor de DP com evidência de um efeito dependente da dose (166). Em 2008, Schwarzschild et al. (167) investigaram a utilidade do ácido úrico como marcador da severidade/progressão da DP, utilizando dados da coorte PRECEPT (Parkinson Research Examination of CEP-1347) (168). Neste ensaio com 806 pacientes com DP (“de novo”) inscritos, 399 tiveram as concentrações de ácido úrico

medidas no início e foram submetidos a vários exames motores assim como a  $^{123}\text{I}$ -B-CIT SPECT no início do ensaio e aproximadamente dois anos depois. 61% dos participantes necessitaram de terapia dopaminérgica durante o seguimento. A razão de risco (HR) de atingir esta necessidade terapêutica diminuiu com o aumento das concentrações de urato plasmático. Além disso, uma taxa menor significativa de alterações na escala UPDRS foi encontrada naqueles com uma concentração maior de urato plasmático contra aqueles que possuíam uma concentração inferior com especificidade para o género, pois essa associação não foi observada nas mulheres. Por fim, a percentagem de modificações na captação de  $^{123}\text{I}$ -B-CIT estriatal também diminuiu com o aumento das concentrações de urato no sangue (167).

Em 2013, Shen et al. (169), aplicaram uma meta-análise para investigar os níveis de ácido úrico em 1217 pacientes com DP comparativamente a 1276 controlos saudáveis. Os resultados deste estudo mostraram que pacientes com DP tinham concentrações de ácido úrico menores em comparação com os controlos saudáveis e que esta associação era mais significativa em homens do que em mulheres (169).

Este ano, Moccia et al. (170), face à consistente associação das concentrações plasmáticas baixas do ácido úrico com o risco aumentado de desenvolver DP e de prever o rápido declínio motor e cognitivo na DP estabelecida, resolveram avaliar a relação entre os níveis de ácido úrico plasmático e os sintomas não-motores em pacientes com DP (“de novo”). Para tal os pacientes incluídos no estudo tiveram de preencher o questionário de sintomas não motores (NMSQuest). Moccia et al. concluíram que concentrações baixas de ácido úrico no sangue estavam relacionadas com um *score* total maior no NMSQuest, em particular nos campos da atenção/memória, cardiovascular e do sono (170).

#### 6.4.3 Biomarcadores na Saliva

Relativamente aos biomarcadores da DP neste fluido corporal são poucos os estudos realizados até ao momento e apenas muito recentemente se começou a ponderar a possibilidade de existirem biomarcadores para a DP na saliva.

O primeiro estudo que surgiu acerca do potencial da saliva em fornecer biomarcadores para a DP foi em 2011 quando Devic et al. (171) se propuseram a observar se as proteínas  $\alpha$ -sin e DJ-1, extensamente estudadas no LCR e sangue como potenciais biomarcadores da DP, estariam presentes na saliva e verificar se tinham potencial para serem biomarcadores da DP. Esta pesquisa foi também motivada pelas seguintes descobertas: i) a glândula submandibular humana produz 70% e 63% do volume salivar total de repouso e estimulado, respetivamente (172); e ii) mostrou-se recentemente que a glândula submandibular estava envolvida pela sinucleinopatia nos estadios iniciais da DP (173-175). Devic et al. colheram amostras de saliva de 24 pacientes com DP (H/M = 17/7; média de idades = 63,5 anos) assim como de 25 controlos saudáveis (H/M = 11/14; média de

idades = 58 anos) em repouso, num estado não estimulado. As conclusões deste estudo foram de que foi possível identificar ambas as proteínas -  $\alpha$ -sin e DJ-1 - na saliva humana. Adicionalmente, é possível que a  $\alpha$ -sin e DJ-1 possam servir como marcadores diagnósticos da DP, uma vez que foi observado que os níveis de  $\alpha$ -sin tendem a diminuir enquanto os níveis de DJ-1 tendem a aumentar na DP. Resultados preliminares também sugerem que a  $\alpha$ -sin possa correlacionar-se com a severidade dos sintomas motores da DP (171).

Em 2013, Beach et al. (176) publicaram um estudo em que realizaram biópsias da glândula submandibular a 128 cadáveres autopsiados e neuropatologicamente classificados (28 com DP, 5 com DCL, 5 com PSP, 3 com DCB, 2 com MAS, 22 com DA com corpos de Lewy, 16 com DA sem corpos de Lewy e 50 sem patologia neurológica), com o objetivo de verificar o potencial diagnóstico desta técnica na DP. Fibras nervosas imunorreativas para a  $\alpha$ -sin fosforilada estavam presentes nas biópsias da glândula submandibular de todos os 28 cadáveres com DP e de 3 cadáveres com DA com corpos de Lewy, enquanto nenhum dos restantes apresentaram amostras positivas. Estes resultados sugerem que a biópsia da glândula submandibular pode ser um meio de melhorar a precisão do diagnóstico clínico da DP (176).

O estudo mais recente envolvendo a proteína DJ-1 é deste ano e foi realizado por Kang et al. (177) com o objetivo de explorar o potencial da DJ-1 como marcador para avaliar a progressão da DP verificando se há alguma associação entre as concentrações salivares de DJ-1 e a função dopaminérgica nigroestriatal. Nesta coorte grande (285 pacientes com DP e 91 controlos saudáveis) foi encontrada uma correlação entre a concentração salivar de DJ-1 e a captação de [ $^{99m}$ Tc]TRODAT-1 pelo núcleo putamen no grupo dos pacientes com DP. Assim, eles concluíram que os níveis de DJ-1 salivares são um potencial biomarcador para avaliar a função dopaminérgica nigroestriatal na DP (177).

## 7. Conclusão

Após a extensa revisão empreendida para a realização desta dissertação eis as conclusões acerca do estado da arte dos biomarcadores para a DP:

### 1. Biomarcadores de imagem:

- A RTI é útil na diferenciação entre parkinsonismo pré-sináptico e múltiplas outras condições com características clínicas que coincidam com as da DP, como parkinsonismo induzido por medicamentos, DA, parkinsonismo/tremor psicogénico e tremor essencial. É considerada um marcador pré-motor da DP por evidenciar défices dopaminérgicos muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores.

- A UT é considerada um marcador para a DP por demonstrar uma área hiperecogénica na *substantia nigra*; no entanto, como esta área hiperecogénica se mantém constante ao longo do curso da doença este exame não serve como indicador da progressão da doença.

- A MRI convencional na DP não é diagnosticamente útil pois revela uma estrutura normal da *substantia nigra*, no entanto revela outras lesões estruturais que permitem excluir uma série de desordens como causas secundárias de parkinsonismo. Já a ITD aparenta ser bastante promissora no que toca ao diagnóstico diferencial de DP e no seguimento da doença pois permite identificar alterações na porção caudal da *substantia nigra* de pacientes com DP.

### 2. Biomarcadores clínicos:

- Nenhum deste biomarcadores (RBD, défices olfativos e obstipação) isolado é específico para a DP. Contudo, em associação com exames neuroimagiológicos, podem ser úteis na deteção precoce da DP.

### 3. Biomarcadores genéticos:

- Determinadas mutações genéticas foram associadas com o risco de desenvolver DP, nomeadamente mutações no gene PARK2 ou parkin estão associadas com a DP juvenil, mutações no gene LRRK2 estão associadas com a DP em caucasianos e mutações no gene da glucocerebrosidase estão associadas ao desenvolvimento de DP. Contudo, mais de 85% dos casos de DP não são herdados pelo que investir nesta área não será muito útil.

#### 4. Biomarcadores bioquímicos:

- No LCR várias proteínas foram estudadas devido ao seu potencial como biomarcadores da DP:

- A  $\alpha$ -sin é um dos potenciais biomarcadores mais promissores, apesar de algumas conclusões divergentes nos estudos realizados.
- Quanto à proteína DJ-1 foram observadas concentrações elevadas no LCR da DP, principalmente na fase inicial da doença, pelo que esta proteína é um potencial biomarcador no diagnóstico precoce da DP.
- Os níveis das isoformas da proteína  $\beta$ -amilóide ( $AB_{40}$  e  $AB_{42}$ ) estão diminuídos na DP comparativamente aos controlos, no entanto este potencial biomarcador não é específico para a DP.

- No sangue os potenciais biomarcadores sugeridos foram a  $\alpha$ -sin, a DJ-1 e o ácido úrico:

- O potencial da  $\alpha$ -sin como biomarcador da DP neste fluido é incerto. Contudo, ao utilizar a  $\alpha$ -sin exossomal no plasma o potencial deste biomarcador aumenta, na medida em que foi estabelecida uma correlação entre a  $\alpha$ -sin exossomal do plasma e a severidade da DP.
- Não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis plasmáticos de DJ-1 entre pacientes com DP e controlos, pelo que esta proteína não tem utilidade como biomarcador da DP.
- Concentrações plasmáticas abaixo da média de ácido úrico estão associadas a um risco maior de desenvolver DP, bem como a sintomas não-motores dos pacientes com DP.

- Na saliva os biomarcadores propostos são a  $\alpha$ -sin e a DJ-1, no entanto são escassos os estudos realizados com este fluido, sendo necessário uma investigação mais profunda para se poder tirar alguma conclusão.

Em suma, a identificação de biomarcadores da Doença de Parkinson em fluidos biológicos para o diagnóstico precoce da doença atualmente é uma utopia. Nenhum dos potenciais biomarcadores referidos nesta dissertação cumpre todos os requisitos necessários para ser considerado um biomarcador plausível da DP, seja para o diagnóstico precoce da patologia seja para o prognóstico/avaliação da progressão da doença. Contudo, muitos destes potenciais biomarcadores são bastante promissores pelo que a investigação destes e de novos potenciais biomarcadores vai continuar e, talvez, num futuro próximo esta utopia irá tornar-se realidade.

# Referências Bibliográficas

1. von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2005;15(4):473-90.
2. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Larry Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. USA: McGraw-Hill Professional; 2011.
3. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2002.
4. Todorova A, Jenner P, Ray Chaudhuri K. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. *Practical neurology*. 2014.
5. Schapira A, Olanow W. *Principles of Treatment in Parkinson's Disease*. 1st ed. USA: Butterworth-Heinemann; 2005.
6. Adler CH. Premotor symptoms and early diagnosis of Parkinson's disease. *The International journal of neuroscience*. 2011;121 Suppl 2:3-8.
7. Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2002.
8. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of neurology*. 2000;247 Suppl 2:II3-10.
9. Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, et al. Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;349(1):162-6.
10. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2003;24(2):197-211.
11. McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2003;53 Suppl 3:S73-84; discussion S-6.
12. McPhee SJ, Ganong WF. *Fisiopatologia da Doença (Lange)*. 5ª edição ed2007.
13. Jankovic J, Tolosa E. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. 5th Edition ed. Baltimore2007.
14. Mizuno Y, Ikebe S, Mochizuki H, Matumine H, Kondo T. [Etiology and pathogenesis of parkinson's disease]. *No to shinkei = Brain and nerve*. 1996;48(1):5-17.
15. Adler CH, Ahlskog JE. *Parkinson's Disease and Movement Disorders: Diagnosis and Treatment Guidelines for the Practicing Physician*: Humana Press; 2000.
16. Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, et al. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012;27(10):1276-82.

17. Quik M, Perez XA, Bordia T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012;27(8):947-57.
18. van der Mark M, Nijssen PC, Vlaanderen J, Huss A, Mulleners WM, Sas AM, et al. A case-control study of the protective effect of alcohol, coffee, and cigarette consumption on Parkinson disease risk: time-since-cessation modifies the effect of tobacco smoking. *PloS one*. 2014;9(4):e95297.
19. Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*. 1985;35(7):949-56.
20. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(7):2173-7.
21. Adams JD, Jr., Chang ML, Klaidman L. Parkinson's disease--redox mechanisms. *Current medicinal chemistry*. 2001;8(7):809-14.
22. Burke RE. Programmed cell death and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1998;13 Suppl 1:17-23.
23. Ambrosi G, Cerri S, Blandini F. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*. 2014.
24. Vaughan JR, Davis MB, Wood NW. Genetics of Parkinsonism: a review. *Annals of human genetics*. 2001;65(Pt 2):111-26.
25. Klein C, Schlossmacher MG. *The Genetics of Parkinson Disease: Implications for Neurological Care*: Nature Publishing Group; 2006. Available from: [http://www.medscape.com/viewarticle/528722\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/528722_2).
26. Rao G, Fisch L, Srinivasan S, D'Amico F, Okada T, Eaton C, et al. Does this patient have Parkinson disease? *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;289(3):347-53.
27. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2001;124(Pt 11):2131-46.
28. Bagheri H, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Cismondo S, O'Connell D, Senard JM, et al. A study of salivary secretion in Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology*. 1999;22(4):213-5.
29. Shulman LM, Singer C, Bean JA, Weiner WJ. Internal tremor in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1996;11(1):3-7.
30. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(4):368-76.

31. Stamey W, Davidson A, Jankovic J. Shoulder pain: a presenting symptom of Parkinson disease. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2008;14(4):253-4.
32. Schaafsma JD, Balash Y, Gurevich T, Bartels AL, Hausdorff JM, Giladi N. Characterization of freezing of gait subtypes and the response of each to levodopa in Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2003;10(4):391-8.
33. Bloch F, Houeto JL, Tezenas du Montcel S, Bonneville F, Etchepare F, Welter ML, et al. Parkinson's disease with camptocormia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77(11):1223-8.
34. Melamed E, Djaldetti R. Camptocormia in Parkinson's disease. *Journal of neurology*. 2006;253 Suppl 7:VII14-6.
35. Voss TS, Elm JJ, Wielinski CL, Aminoff MJ, Bandyopadhyay D, Chou KL, et al. Fall frequency and risk assessment in early Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2012;18(7):837-41.
36. Williams DR, Watt HC, Lees AJ. Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77(4):468-73.
37. Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet neurology*. 2009;8(5):464-74.
38. Golab-Janowska M, Budzianowska A, Honczarenko K. [Autonomic disorders in Parkinson's disease]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. 2011;57(1):11-5; discussion 6.
39. Fereshtehnejad SM, Lokk J. Orthostatic hypotension in patients with Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Parkinson's disease*. 2014;2014:475854.
40. Aarsland D, Bronnick K, Ehrt U, De Deyn PP, Tekin S, Emre M, et al. Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007;78(1):36-42.
41. Borek LL, Kohn R, Friedman JH. Phenomenology of dreams in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007;22(2):198-202.
42. Manni R, Terzaghi M, Ratti PL, Repetto A, Zangaglia R, Pacchetti C. Hallucinations and REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease: dream imagery intrusions and other hypotheses. *Consciousness and cognition*. 2011;20(4):1021-6.
43. Comella CL, Goetz CG. Akathisia in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1994;9(5):545-9.
44. Saifee T, Lees AJ, Silveira-Moriyama L. Olfactory function in Parkinson's disease in ON versus OFF states. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81(11):1293-5.
45. Zambito Marsala S, Tinazzi M, Vitaliani R, Recchia S, Fabris F, Marchini C, et al. Spontaneous pain, pain threshold, and pain tolerance in Parkinson's disease. *Journal of neurology*. 2011;258(4):627-33.

46. Singh N, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 2007;81(1):29-44.
47. Lang AE. The progression of Parkinson disease: A hypothesis. *Neurology*. 2007;68(12):948-52.
48. Schapira AH, Olanow CW. Drug selection and timing of initiation of treatment in early Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2008;64 Suppl 2:S47-55.
49. Petzinger GM, Fisher BE, McEwen S, Beeler JA, Walsh JP, Jakowec MW. Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease. *Lancet neurology*. 2013;12(7):716-26.
50. Russell JA, Ciucci MR, Connor NP, Schallert T. Targeted exercise therapy for voice and swallow in persons with Parkinson's disease. *Brain research*. 2010;1341:3-11.
51. Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 ( Pt 11):2297-305.
52. Gomez JC, Rouco I, Velasco F, Tijero B, Garamendi I, Lezcano E, et al. [Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: variables that discriminate both complications in a sample of 285 patients]. *Neurologia*. 2008;23(8):494-8.
53. Salat D, Tolosa E. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *Journal of Parkinson's disease*. 2013;3(3):255-69.
54. Zhao YJ, Wee HL, Au WL, Seah SH, Luo N, Li SC, et al. Selegiline use is associated with a slower progression in early Parkinson's disease as evaluated by Hoehn and Yahr Stage transition times. *Parkinsonism & related disorders*. 2011;17(3):194-7.
55. Minguez-Minguez S, Solis-Garcia Del Pozo J, Jordan J. Rasagiline in Parkinson's disease: a review based on meta-analysis of clinical data. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2013;74:78-86.
56. Lecht S, Haroutiunian S, Hoffman A, Lazarovici P. Rasagiline - a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Therapeutics and clinical risk management*. 2007;3(3):467-74.
57. Alonso Canovas A, Luquin Piudo R, Garcia Ruiz-Espiga P, Burguera JA, Campos Arillo V, Castro A, et al. Dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurologia*. 2014;29(4):230-41.
58. Thorlund K, Wu P, Druyts E, Eapen S, Mills EJ. Nonergot dopamine-receptor agonists for treating Parkinson's disease - a network meta-analysis. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2014;10:767-76.
59. Steiger M, Jost W, Grandas F, Van Camp G. Risk of valvular heart disease associated with the use of dopamine agonists in Parkinson's disease: a systematic review. *Journal of neural transmission*. 2009;116(2):179-91.
60. Sawada H, Oeda T, Kuno S, Nomoto M, Yamamoto K, Yamamoto M, et al. Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. *PloS one*. 2010;5(12):e15298.
61. Katzenschlager R, Sampaio C, Costa J, Lees A. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003(2):CD003735.

62. DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group. *Archives of neurology*. 1989;46(10):1052-60.
63. Parkinson Study G. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*. 1993;328(3):176-83.
64. Beal MF, Matthews RT, Tieleman A, Shults CW. Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain research*. 1998;783(1):109-14.
65. Matthews RT, Ferrante RJ, Klivenyi P, Yang L, Klein AM, Mueller G, et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Experimental neurology*. 1999;157(1):142-9.
66. Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, et al. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Archives of neurology*. 2002;59(10):1541-50.
67. Xiao Y, Luo M, Luo H, Wang J. Creatine for Parkinson's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;6:CD009646.
68. Halbig TD, Tse W, Olanow CW. Neuroprotective agents in Parkinson's disease: clinical evidence and caveats. *Neurologic clinics*. 2004;22(3 Suppl):S1-S17.
69. Santra S, Xu L, Shah M, Johnson M, Dutta A. D-512 and D-440 as novel multifunctional dopamine agonists: characterization of neuroprotection properties and evaluation of in vivo efficacy in a Parkinson's disease animal model. *ACS chemical neuroscience*. 2013;4(10):1382-92.
70. Chambers JW, Pachori A, Howard S, Ganno M, Hansen D, Jr., Kamenecka T, et al. Small Molecule c-jun-N-terminal Kinase (JNK) Inhibitors Protect Dopaminergic Neurons in a Model of Parkinson's Disease. *ACS chemical neuroscience*. 2011;2(4):198-206.
71. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chemical Society Reviews*. 2014.
72. Okun MS, Vitek JL. Lesion therapy for Parkinson's disease and other movement disorders: update and controversies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2004;19(4):375-89.
73. Speelman JD, Bosch DA. Resurgence of functional neurosurgery for Parkinson's disease: a historical perspective. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1998;13(3):582-8.
74. Wagle Shukla A, Okun MS. Surgical treatment of Parkinson's disease: patients, targets, devices, and approaches. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014;11(1):47-59.
75. Hooper AK, Okun MS, Foote KD, Fernandez HH, Jacobson C, Zeilman P, et al. Clinical cases where lesion therapy was chosen over deep brain stimulation. *Stereotactic and functional neurosurgery*. 2008;86(3):147-52.
76. Terzic D, Abosch A. Update on deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Journal of neurosurgical sciences*. 2012;56(4):267-77.

77. Zesiewicz TA, Sullivan KL, Arnulf I, Chaudhuri KR, Morgan JC, Gronseth GS, et al. Practice Parameter: treatment of nonmotor symptoms of Parkinson disease: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010;74(11):924-31.
78. Seppi K, Weintraub D, Coelho M, Perez-Lloret S, Fox SH, Katzenschlager R, et al. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26 Suppl 3:S42-80.
79. Costa FH, Rosso AL, Maultasch H, Nicaretta DH, Vincent MB. Depression in Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2012;70(8):617-20.
80. Troeung L, Egan SJ, Gasson N. A meta-analysis of randomised placebo-controlled treatment trials for depression and anxiety in Parkinson's disease. *PloS one*. 2013;8(11):e79510.
81. Barone P, Poewe W, Albrecht S, Debieuvre C, Massey D, Rascol O, et al. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet neurology*. 2010;9(6):573-80.
82. Allain H, Pollak P, Neukirch HC. Symptomatic effect of selegiline in de novo Parkinsonian patients. The French Selegiline Multicenter Trial. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1993;8 Suppl 1:S36-40.
83. Ferreri F, Agbokou C, Gauthier S. Recognition and management of neuropsychiatric complications in Parkinson's disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;175(12):1545-52.
84. Friedman JH, Millman RP. Sleep disturbances and Parkinson's disease. *CNS spectrums*. 2008;13(3 Suppl 4):12-7.
85. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
86. Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgraduate medical journal*. 2009;85(1008):538-45.
87. Gasser T. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72(7 Suppl):S27-31.
88. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 4):861-70.
89. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain : a journal of neurology*. 1991;114 ( Pt 5):2283-301.
90. Marek K, Innis R, van Dyck C, Fussell B, Early M, Eberly S, et al. [123I]beta-CIT SPECT imaging assessment of the rate of Parkinson's disease progression. *Neurology*. 2001;57(11):2089-94.

91. Cohn JN. Introduction to Surrogate Markers. *Circulation*. 2004;109(25 suppl 1):IV-20-IV-1.
92. Biglan KM, Holloway RG. Surrogate endpoints in Parkinson's disease research. *Current neurology and neuroscience reports*. 2003;3(4):314-20.
93. Martinez-Martin P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gomez JB, Martinez-Sarries J, Bermejo F. Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 1994;9(1):76-83.
94. Nutt JG, Carter JH, Lea ES, Sexton GJ. Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy. *Annals of neurology*. 2002;51(6):686-93.
95. Mehta SH, Morgan JC, Sethi KD. Neuroimaging and transcranial ultrasonography in Parkinson's disease. *Current neurology and neuroscience reports*. 2008;8(4):297-303.
96. Jennings DL, Seibyl JP, Oakes D, Eberly S, Murphy J, Marek K. (123I) beta-CIT and single-photon emission computed tomographic imaging vs clinical evaluation in Parkinsonian syndrome: unmasking an early diagnosis. *Archives of neurology*. 2004;61(8):1224-9.
97. Ravina B, Eidelberg D, Ahlskog JE, Albin RL, Brooks DJ, Carbon M, et al. The role of radiotracer imaging in Parkinson disease. *Neurology*. 2005;64(2):208-15.
98. Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*. 2004;351(24):2498-508.
99. Tang CC, Poston KL, Eckert T, Feigin A, Frucht S, Gudesblatt M, et al. Differential diagnosis of parkinsonism: a metabolic imaging study using pattern analysis. *The Lancet Neurology*. 2010;9(2):149-58.
100. Rascol O, Schelosky L. 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson's disease and related disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2009;24 Suppl 2:S732-41.
101. Becker G, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology*. 1995;45(1):182-4.
102. Berg D, Siefker C, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *Journal of neurology*. 2001;248(8):684-9.
103. Berg D, Merz B, Reiners K, Naumann M, Becker G. Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2005;20(3):383-5.
104. Prestel J, Schweitzer KJ, Hofer A, Gasser T, Berg D. Predictive value of transcranial sonography in the diagnosis of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2006;21(10):1763-5.
105. Berg D, Becker G, Zeiler B, Tucha O, Hofmann E, Preier M, et al. Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound. *Neurology*. 1999;53(5):1026-31.

106. Walter U, Niehaus L, Probst T, Benecke R, Meyer BU, Dressler D. Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes. *Neurology*. 2003;60(1):74-7.
107. Geng DY, Li YX, Zee CS. Magnetic resonance imaging-based volumetric analysis of basal ganglia nuclei and substantia nigra in patients with Parkinson's disease. *Neurosurgery*. 2006;58(2):256-62; discussion -62.
108. Vaillancourt DE, Spraker MB, Prodoehl J, Abraham I, Corcos DM, Zhou XJ, et al. High-resolution diffusion tensor imaging in the substantia nigra of de novo Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72(16):1378-84.
109. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology*. 2001;57(8):1497-9.
110. Sethi KD, Mehta SH, Morgan JC. Differential diagnosis of Parkinson's Disease. *Handbook of Parkinson's Disease*. p. 40-60.
111. Meara J, Bhowmick BK, Hobson P. Accuracy of diagnosis in patients with presumed Parkinson's disease. *Age and ageing*. 1999;28(2):99-102.
112. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Fantini ML, Massicotte-Marquez J, Montplaisir J. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology*. 2009;72(15):1296-300.
113. Postuma RB, Gagnon JF, Rompre S, Montplaisir JY. Severity of REM atonia loss in idiopathic REM sleep behavior disorder predicts Parkinson disease. *Neurology*. 2010;74(3):239-44.
114. Iwanami M, Miyamoto T, Miyamoto M, Hirata K, Takada E. Relevance of substantia nigra hyperechogenicity and reduced odor identification in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep medicine*. 2010;11(4):361-5.
115. Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters E, Berendse HW. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2004;56(2):173-81.
116. Doty RL, Bromley SM, Stern MB. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*. 1995;4(1):93-7.
117. Wolz M, Hahner A, Meixner L, Lohle M, Reichmann H, Hummel T, et al. Accurate detection of Parkinson's disease in tremor syndromes using olfactory testing. *European neurology*. 2014;72(1-2):1-6.
118. Katzenschlager R, Zijlmans J, Evans A, Watt H, Lees AJ. Olfactory function distinguishes vascular parkinsonism from Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75(12):1749-52.
119. Katzenschlager R, Lees AJ. Olfaction and Parkinson's syndromes: its role in differential diagnosis. *Current opinion in neurology*. 2004;17(4):417-23.

120. Bohnen NI, Gedela S, Kuwabara H, Constantine GM, Mathis CA, Studenski SA, et al. Selective hyposmia and nigrostriatal dopaminergic denervation in Parkinson's disease. *Journal of neurology*. 2007;254(1):84-90.
121. Edwards LL, Quigley EM, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology*. 1992;42(4):726-32.
122. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2001;57(3):456-62.
123. Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics*. 2009;18(R1):R48-59.
124. Bruggemann N, Klein C. Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
125. Varcin M, Bentea E, Michotte Y, Sarre S. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012:624925.
126. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*. 2009;361(17):1651-61.
127. Shi M, Caudle WM, Zhang J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiology of disease*. 2009;35(2):157-64.
128. Caudle WM, Bammler TK, Lin Y, Pan S, Zhang J. Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(6):925-42.
129. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet neurology*. 2010;9(11):1118-27.
130. LeWitt P. Recent advances in CSF biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2012;18 Suppl 1:S49-51.
131. Finehout EJ, Franck Z, Lee KH. Complement protein isoforms in CSF as possible biomarkers for neurodegenerative disease. *Disease markers*. 2005;21(2):93-101.
132. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS letters*. 1994;345(1):27-32.
133. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
134. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276(5321):2045-7.
135. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, et al. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience letters*. 2000;287(1):65-7.

136. Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, et al. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Experimental neurology*. 2008;213(2):315-25.
137. Ohrfelt A, Grognat P, Andreassen N, Wallin A, Vanmechelen E, Blennow K, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders-a marker of synapse loss? *Neuroscience letters*. 2009;450(3):332-5.
138. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(3):419-25.
139. Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, et al. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2010;75(20):1766-72.
140. Parnetti L, Chiasserini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi MM, et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2014;29(8):1019-27.
141. Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(Pt 3):713-26.
142. Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Doring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet neurology*. 2011;10(3):230-40.
143. Bruggink KA, Kuiperij HB, Ekholm-Pettersson F, Verbeek MM. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2011;77(5):510; author reply -1.
144. Taira T, Takahashi K, Kitagawa R, Iguchi-Arigo SM, Arigo H. Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter. *Gene*. 2001;263(1-2):285-92.
145. Bonifati V, Oostra BA, Heutink P. Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of molecular medicine*. 2004;82(3):163-74.
146. Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, et al. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345(3):967-72.
147. Pankratz N, Wilk JB, Latourelle JC, DeStefano AL, Halter C, Pugh EW, et al. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Human genetics*. 2009;124(6):593-605.
148. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature genetics*. 2009;41(12):1303-7.

149. Montine TJ, Shi M, Quinn JF, Peskind ER, Craft S, Ginhina C, et al. CSF Abeta(42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2010;25(15):2682-5.
150. Shi M, Zhang J. CSF alpha-synuclein, tau, and amyloid beta in Parkinson's disease. *Lancet neurology*. 2011;10(8):681; author's reply -3.
151. Alves G, Bronnick K, Aarsland D, Blennow K, Zetterberg H, Ballard C, et al. CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81(10):1080-6.
152. Buongiorno M, Compta Y, Marti MJ. Amyloid-beta and tau biomarkers in Parkinson's disease-dementia. *Journal of the neurological sciences*. 2011;310(1-2):25-30.
153. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(13):1945-7.
154. Tinsley RB, Kotschet K, Modesto D, Ng H, Wang Y, Nagley P, et al. Sensitive and specific detection of alpha-synuclein in human plasma. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(12):2693-700.
155. Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, et al. Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(12):4127-37.
156. Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of neural transmission*. 2006;113(10):1435-9.
157. Li QX, Mok SS, Loughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, et al. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2007;204(2):583-8.
158. Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ginhina C, et al. Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2014.
159. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299(5604):256-9.
160. Waragai M, Nakai M, Wei J, Fujita M, Mizuno H, Ho G, et al. Plasma levels of DJ-1 as a possible marker for progression of sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2007;425(1):18-22.
161. Maita C, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, et al. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2008;431(1):86-9.

162. Shi M, Zabetian CP, Hancock AM, Gingham C, Hong Z, Yearout D, et al. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 2010;480(1):78-82.
163. Lin X, Cook TJ, Zabetian CP, Leverenz JB, Peskind ER, Hu SC, et al. DJ-1 isoforms in whole blood as potential biomarkers of Parkinson disease. *Scientific reports*. 2012;2:954.
164. Church WH, Ward VL. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain research bulletin*. 1994;33(4):419-25.
165. Davis JW, Grandinetti A, Waslien CI, Ross GW, White LR, Morens DM. Observations on serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *American journal of epidemiology*. 1996;144(5):480-4.
166. de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2005;58(5):797-800.
167. Schwarzschild MA, Schwid SR, Marek K, Watts A, Lang AE, Oakes D, et al. Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Archives of neurology*. 2008;65(6):716-23.
168. Parkinson Study Group PI. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69(15):1480-90.
169. Shen L, Ji HF. Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: evidence from meta-analysis. *BMJ open*. 2013;3(11):e003620.
170. Moccia M, Picillo M, Erro R, Vitale C, Longo K, Amboni M, et al. Is serum uric acid related to non-motor symptoms in de-novo Parkinson's disease patients? *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20(7):772-5.
171. Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, et al. Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 7):e178.
172. Cook D, Van Lennep E, Roberts M, Young J. Secretion by the major salivary glands. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 1994;2:1061-117.
173. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta neuropathologica*. 2010;119(6):689-702.
174. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2010;119(6):703-13.
175. Cersosimo MG, Perandones C, Micheli FE, Raina GB, Beron AM, Nasswetter G, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(1):188-90.
176. Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, et al. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(2):130-6.

177. Kang WY, Yang Q, Jiang XF, Chen W, Zhang LY, Wang XY, et al. Salivary DJ-1 could be an indicator of Parkinson's disease progression. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:102.