



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Neuroproteção: Abordagem na Doença de Parkinson

Luís Filipe Ferreira Tavares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Álvarez Pérez

Covilhã, junho de 2015



# Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e a todos aqueles que me ajudaram nesta caminhada.

*“O médico que só sabe de Medicina, nem de Medicina sabe.” - Abel Salazar*



# Agradecimentos

Agradeço aos meus pais que me acompanharam e apoiaram incondicionalmente e por toda a confiança que sempre me transmitiram ao longo de todo este percurso.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Alvarez, agradeço por ter aceitado o convite para a orientação da minha dissertação de mestrado e pelo seu apoio, ajuda, disponibilidade e paciência demonstrada durante a realização da mesma.

Um agradecimento especial a todos os elementos da Desertuna - Tuna Académica da Universidade da Beira Interior, que sempre me apoiaram e que se tornaram a minha família na Covilhã.



## Resumo

Os tratamentos disponíveis para a doença de Parkinson, melhoram a qualidade de vida dos pacientes que sofrem desta doença neurodegenerativa. Contudo, nenhum mostrou ser unicamente eficaz em prevenir ou atrasar a progressão da doença.

Nos últimos anos, muitos têm sido os avanços feitos na descoberta dos diversos mecanismos que estão implicados no desenvolvimento da doença de Parkinson como o stress oxidativo, disfunção mitocondrial, agregação proteica, inflamação, toxicidade celular e apoptose. Estes diversos mecanismos sugerem a descoberta de novos e potenciais tratamentos.

A presente dissertação pretende realizar uma revisão sobre a neuroprotecção na doença de Parkinson, baseada na literatura científica mais recente, analisando os diferentes mecanismos implicados na doença e estratégias neuroprotetoras que estão em estudo clínico ou pré-clínico, e que aparentam ser as mais promissoras.

Para a elaboração deste trabalho efetuou-se a pesquisa de artigos científicos na base de dados Pubmed, no sítio [clinicaltrials.org](http://clinicaltrials.org) e em alguns livros na área neurológica.

A análise, inferida ao longo desta dissertação, permitiu mostrar que ainda existe um longo caminho a percorrer no que à neuroprotecção diz respeito. É necessário ultrapassar as barreiras atuais sobre a falta de conhecimento sobre a patofisiologia da doença e deficiências na metodologia usada para estudar a progressão da doença. Não obstante disso, a atividade destinada a compreender e tratar a doença de Parkinson tem crescido exponencialmente e em última instância, deverá resultar em terapias que modifiquem com sucesso o curso da doença.

Num futuro próximo, esperam-se os resultados dos ensaios clínicos que ainda estão a decorrer.

## Palavras-chave

Doença de Parkinson, Neuroproteção, ensaios clínicos, modificadores da doença, patofisiologia.



# Abstract

Current treatments for Parkinson's disease improve the quality of life of the patient that suffer from this neurodegenerative disease. Yet, none have proven to be effective in preventing or slowing the progression of this disease.

In recent years, many advances have been made to find the underlying processes that lead to Parkinson's disease, such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, protein aggregation, inflammation, cell toxicity and apoptosis. These various discovery suggest potentially new treatments.

This dissertation intends to conduct a review of neuroprotection in Parkinson's disease, based on the latest scientific literature, analyzing the different mechanisms involved in the disease, and neuroprotective strategies that are in clinical or preclinical study, that appear to be more promising.

For the preparation of this work a research of scientific articles was carried out in databases such as PubMed, clinicaltrials.org well as neurology books

The analysis, inferred along this dissertation, demonstrated that there is still a long way to go in neuroprotection. It is necessary to overcome the barriers present on the lack of knowledge about the pathophysiology of the disease and disability in the methodology used to study its progression. Despite that, the activity aimed at understanding and treating Parkinson's disease has grown exponentially and ultimately should result in therapies that successfully modify the curse of the disease.

The field is awaiting the results of several clinical trials under development.

## Keywords

Parkinson's disease, Neuroprotection, Clinical Trials, Disease-Modifying, Pathophysiology.



# Índice

Lista de Figuras.....	XIV
Lista de Tabelas.....	XVI
Lista de Acrónimos.....	XVIII
Capítulo 1 - Introdução.....	1
Capítulo 2 - Metodologia.....	3
Capítulo 3 - Doença de Parkinson.....	5
3.1 - Visão Geral.....	5
3.1.1 - Epidemiologia.....	5
3.1.2 - Manifestações Clínicas.....	5
3.1.3 - Manifestações Patológicas.....	6
3.2 - Etiologia.....	6
Capítulo 4 - Neuroproteção.....	9
4.1 - Definição.....	9
4.2 - O Estudo da Neuroproteção.....	9
4.3 - Patofisiologia da Doença de Parkinson e alvos para a Neuroproteção.....	10
4.4 - Estratégias Neuroprotetoras.....	12
4.5 - Outros Agentes Farmacológicos.....	20
4.6 - Abordagens Não Farmacológicas.....	22
Capítulo 5 - Limites de Estudos Anteriores.....	23
5.1 - Limites dos Ensaio Clínicos.....	23
5.2 - Limites dos Modelos Animais.....	24
5.3 - Limites dos Biomarcadores.....	25
Capítulo 6 - Conclusão.....	27
Capítulo 7 - Bibliografia.....	29



# Lista de Figuras

Figura 1 -	Incidência da idade e do sexo na DP .....	6
Figura 2 -	Mecanismos patogénicos que podem ser potenciais alvos para terapias Neuroprotetoras na DP .....	12
Figura 3 -	Ação neuroprotetora dos Antagonistas A2a .....	17
Figura 4 -	Esquema de como o ácido clavulânico atua na neuroproteção num modelo induzido com MPP+ .....	21
Figura 5 -	Descrição esquemática do “delayed-start design” .....	24



# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Mecanismos patogénicos da DP e alvos neuroprotetores .....	10
---	----



# Lista de Acrónimos

6-OHDA - 6 Hidroxidopamina  
α-syn - Alfa-Synucleína  
AINES - Anti-Inflamatórios Não Esteroides  
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro  
CDNF - Fator neurotrófico Cerebral Dopaminérgicos  
Co-Q10 - Coenzima Q10  
DAT - Transportadores de Dopamina  
DP - Doença de Parkinson  
ELLDOPA - Earlier versus Later L-Dopa  
EP - Eritropoietina  
FGF - Fator de crescimento de Fibroblastos  
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado Glial  
GF - Fator de Crescimento Nervoso  
GSH - Glutathiona  
IL-1β - Interleucina 1Beta  
IL-6 - Interleucina 6  
L-dopa - Levodopa  
MAO-B - Monoamino Oxidase B  
MANF - Fator Neurotrófico Derivado dos Astrócitos  
MPP+ - 1-Metil-4-Fenilpiridínio  
MPTP - 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina  
NINDS - National Institute of Neurological Disorders and Stroke  
NMDA - N-Metil-D-Aspartato  
PET - Tomografia por Emissão de Positrões  
ROS - Espécies Reativas de Oxigénio  
SN - Sistema Nervoso  
Sn - Substancia Nigra  
SNC - Sistema Nervoso Central  
Snc - Substancia Nigra pars compacta  
SPECT - Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único  
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa  
UPDRS - Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson



# Capítulo 1

## Introdução

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva que causa tremor, rigidez, bradicinesia e alteração da marcha. Estes défices motores estão associados a uma perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na Sn e conseqüentemente, o foco terapêutico da DP tem abordado a substituição da dopamina, o que tem melhorado a qualidade de vida de muitos dos pacientes. Contudo, os doentes desenvolvem sintomas motores que são difíceis de controlar com os tratamentos disponíveis e também desenvolvem uma variedade de sintomas não-motores, como desordens do sono, anosmia e prejuízo cognitivo, que são refratários aos tratamentos existentes. Estas complicações, que normalmente são tardias, tornam de grande importância o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras que possam ser aplicadas no início da doença, para prevenir ou atrasar o aparecimento dos sintomas incapacitantes (1).

Estudos patológicos têm demonstrado que a degeneração dopaminérgica é apenas uma parte do problema (2) e que a duração da DP estende-se por décadas, desde os primeiros sinais até aos estágios finais passando pelos estágios intermédios onde o sistema motor está envolvido. O curso longo e lento da doença oferece uma possibilidade para haver tratamentos que retardem ou impeçam o processo neurodegenerativo da doença e que sendo empregues numa fase precoce, possam evitar as complicações gravemente debilitantes da DP avançada. Portanto, importa definir tratamentos "neuroprotetores" que possam atrasar ou impedir a degeneração de populações neuronais, tanto dopaminérgicas como não-dopaminérgicas, envolvidas na doença de Parkinson (1).

A principal barreira existente hoje em dia é a falta de um tratamento neuroprotetor significativo que possa ser aplicado depois de feito o diagnóstico da doença e a descoberta de tais tratamentos é uma meta importante alvo de inúmeros estudos em desenvolvimento.

Assim, o objetivo deste trabalho passa por abordar a neuroproteção na DP, fazendo uma revisão dos artigos científicos e publicações mais atuais sobre o tema.



## Capítulo 2

### Metodologia

Como metodologia para a realização desta monografia foi utilizado o motor de busca *PubMed* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) pela sua credibilidade e impacto na comunidade científica médica. Dado o grande volume de entradas e para que a informação utilizada fosse a mais atual possível, foram usados como critérios de inclusão publicações feitas nos últimos 20 anos (1995-2015) em língua inglesa, usando para a pesquisa as seguintes palavras-chave: Parkinson's disease; Neuroprotection. Também foi utilizado o sítio [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.org) utilizando as palavras-chave: Parkinson; Neuroprotection.

Foram ainda utilizados alguns livros de referência da área neurológica.



# Capítulo 3

## Doença de Parkinson

### 3.1 - Visão Geral

#### 3.1.1 - Epidemiologia

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em todo o mundo a seguir à doença de Alzheimer (3-7). Está estimado que aproximadamente 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos da América e mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo sofram desta doença (4, 8).

A idade em que surgem os sintomas será por volta dos 60 anos, embora em alguns casos a doença possa surgir aos 20 anos, ou até, em doentes mais jovens (4). A frequência da DP aumenta com a idade, sendo de 1 a 3 casos por 100 000 pessoas com menos de 45 anos, 3100 casos por 100 000 pessoas em idades compreendidas entre os 75 - 85 anos e 4300 casos por 100 000 pessoas com mais de 85 anos (9).

A DP afeta homens e mulheres de todas as raças, de todas as ocupações e de todos os países (4). Estudos recentes sugerem que existem diferenças entre géneros no risco de vir a sofrer de DP, severidade dos sintomas e respostas ao tratamento, sendo a incidência da doença 1.5x maior nos homens em comparação com as mulheres (10-12).

Estudos epidemiológicos sugerem que a vida em ambientes rurais, exposição a herbicidas, pesticidas e a metais pesados aumenta o risco de DP (13, 14).

Cerca de 50 000 novos casos são diagnosticados anualmente e espera-se que esse valor aumente à medida que aumenta a esperança média de vida das populações (15).

#### 3.1.2 - Manifestações Clínicas

A DP é caracterizada por manifestações motoras, nomeadamente, tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e alteração da marcha, que respondem ao tratamento dopaminérgico, e por manifestações não motoras, que surgem com o evoluir da doença, como instabilidade postural, dificuldade no discurso, distúrbios autonómicos (sexuais, gastrointestinais), alterações sensoriais, transtornos de humor (ansiedade, depressão, apatia), alterações do sono, défice cognitivo e demência. Estas também são conhecidas como manifestações não dopaminérgicas porque não respondem ao tratamento dopaminérgico (4, 6, 14).

A doença tem um início insidioso, que gradualmente piora, que afeta normalmente um lado do corpo antes de envolver o lado contra lateral. Normalmente, o primeiro sintoma a ser reconhecido é o tremor de repouso embora em alguns casos possa não existir (14).

### 3.1.3 - Manifestações Patológicas

A DP é caracterizada pela morte dos neurónios dopaminérgicos na Snc, pela redução da dopamina no corpo estriado e pelas inclusões proteicas intracitoplasmáticas conhecidas por corpos de Lewy (4-6, 13). Quando o nível de dopamina no estriado é de cerca de 30% devido à morte de 60% dos neurónios dopaminérgicos, surgem os primeiros sintomas motores (8, 13, 16).

A degeneração neuronal também pode afetar os neurónios colinérgicos no núcleo basal de Meynert, os neurónios noradrenérgicos no locus coeruleus, neurónios serotoninérgicos nos núcleos de rafe, neurónios do sistema olfatório, hemisférios cerebrais, medula espinhal e o sistema nervoso autónomo periférico (4). Esta degeneração não dopaminérgica será a causa dos sintomas não motores que surgem antes da degeneração dopaminérgica num estágio inicial, sendo que os sintomas motores surgem num estágio intermédio da doença (15).

## 3.2 - Etiologia

As últimas evidências sugerem que a DP tem uma causa multifatorial, que engloba o envelhecimento, predisposição genética, exposição a toxinas ambientais, fatores imunes e inflamatórios e características inatas do sistema nigroestriatal dopaminérgico. Isto sugere que a DP representa uma síndrome e nenhum mecanismo aparenta ser a causa primária da doença, pelo contrário, a neurodegeneração resulta da ação sinérgica entre várias causas e mecanismos (1).

De entre estes múltiplos fatores, que se suspeita desempenharem um papel fundamental na DP, o envelhecimento parece ser o maior fator de risco para a doença de Parkinson (17).

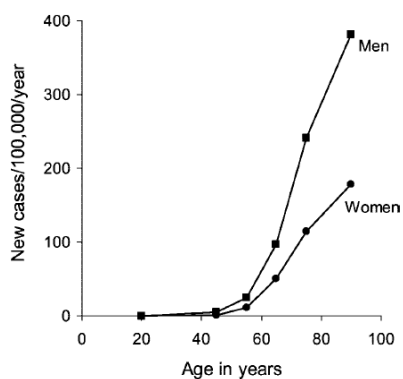


Figura 1 - Incidência da idade e do sexo na DP (Adaptado de (14)).

As toxinas ambientais são uma possível causa porque observou-se que o parkinsonismo pode ser causado pela injeção de MPTP e pela intoxicação crónica de manganês (13). O MPTP é uma neurotoxina que leva à degeneração dos neurónios dopaminérgicos e perda da dopamina no corpo estriado (18). Muitos dos estudos feitos em animais usam esta toxina para gerar parkinsonismo (19).

Na última década, descobertas excitantes foram feitas ao nível das mutações genéticas. Estudos de genes autossómicos dominantes ( $\alpha$ -synuclein, LRRK2) e recessivos (Parkin, DJ1, PINK1 e ATP13A2) trouxeram conhecimentos significativos sobre os mecanismos de morte dos neurónios dopaminérgicos, como a disfunção mitocondrial, stress oxidativo, neuroinflamação e degradação proteica (13).

Para estudar a neurodegeneração na DP, os investigadores focaram inicialmente a sua atenção nos neurónios dopaminérgicos, sendo que hoje em dia, a atenção centra-se também noutros locais, como é o caso das células gliais vizinhas (13) e dos DAT (20). A dopamina é o principal neurotransmissor responsável pela atividade locomotora, motivação, e cognição, sendo que a disfunção nos DAT está associada a condições neurológicas como a DP (20).



## Capítulo 4

# Neuroproteção

### 4.1 - Definição

A neuroproteção pode ser considerada uma forma de terapia para atrasar a progressão da doença. Na última década, os conceitos de potenciais abordagens neuroprotetoras, estão em desenvolvimento e estudo, em ensaios clínicos controlados, que se focam em agentes para reduzir o stress oxidativo, combater a excitotoxicidade, fatores tróficos, melhorar a função mitocondrial, atacar a inflamação e inibir a apoptose celular (14).

### 4.2 - O Estudo da Neuroproteção

Ao longo das últimas duas décadas, avanços significativos foram feitos a fim de se obter um melhor conhecimento sobre a etiologia e patogénese da DP, graças a inúmeros estudos clínicos e post mortem, assim como modelos experimentais in vitro e in vivo. O estudo da neuroproteção assenta em estudos experimentais com animais e estudos com humanos utilizando escalas de observação ou biomarcadores. Nos modelos animais, existem os modelos de indução tóxica, em que há a introdução de neurotoxinas, principalmente a 6-OHDA ou a MPTP em camundongos e os modelos transgénicos, em que se induz mutações genéticas e que estão a ser usados para validação pré-clínica de potenciais fármacos (21). Os efeitos neurotóxicos da MPTP são desencadeados pelo ião MPP+, que é seletivo e acumula-se nas mitocôndrias dos neurónios dopaminérgicos, levando à produção de ATP, elevação da concentração intracelular de cálcio e geração de radicais livres, sendo assim, responsável pela morte celular (18). A neurotoxina 6-OHDA atua como potente inibidor das enzimas mitocondriais, fazendo com que os neurónios não possam exercer as suas funções fisiológicas normais levando à sua morte. Os estudos clínicos em humanos são baseados no exame neurológico e usa-se a escala UPDRS que envolve a observação da função motora e a avaliação das atividades diárias dos pacientes (1). Por fim, existem os estudos em humanos com biomarcadores que são objetivamente medidos, como por exemplo, os estudos de neuroimagem com PET e SPECT com marcadores dopaminérgicos. Contudo, e embora não exista hoje em dia, nenhum biomarcador validado para estudar a neuroproteção na DP, pensa-se que a neuroimagem com marcadores dopaminérgicos, represente a melhor abordagem para estudar a progressão da doença em estudos clínicos de neuroproteção (22).

### 4.3 - Patofisiologia da DP e alvos para a neuroproteção

Como referido anteriormente, existem diferentes mecanismos implicados no desenvolvimento da DP, que estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Mecanismos patogénicos da DP e alvos neuroprotetores (Adaptado de (1)).

Mecanismo patogénico da DP	Alvos para a neuroproteção
Stress Oxidativo e Disfunção Mitocondrial	Inibidores do Metabolismo da Dopamina (inibidores da MAO, agonista do recetor de dopamina) Potenciadores das Mitocôndrias (CoQ10) Outros Antioxidantes (Vit.E, ácido úrico) Promotores da Glutathione (Selênio)
Agregação Proteica	Inibidores da Agregação da $\alpha$ -syn Agentes que Reduzem os Níveis da $\alpha$ -syn Promotores da Função da Parkin Promotores da Função do UCH-L1 Promotores das Vias Proteossomal e Lisossomal
Neuroinflamação	Agentes Anti-inflamatórios (AINES, Estatinas, Minociclina)
Excitotoxicidade	Antagonistas do Recetor NMDA Antagonistas dos Canais de Cálcio
Apoptose e Vias de Morte Celular	Agentes Anti-Apoptóticos
Perda de Fatores Tróficos	Fatores Neurotróficos (GDNF, Neurturina)

#### Stress oxidativo e disfunção mitocondrial

O stress oxidativo resulta de um excesso de radicais livres que é secundário a um excesso de produção de espécies reativas ou resulta da falha nos mecanismos que normalmente limitam a sua produção. Esse excesso de espécies reativas reage com as macromoléculas celulares, interrompendo as suas funções normais e está descrito no SN de pacientes com DP (23).

O metabolismo da dopamina promove o stress oxidativo devido à produção de quinonas, peróxidos e outras ROS. A disfunção mitocondrial é outra fonte de produção de ROS que pode causar dano às mitocôndrias. Esta acontece devido à inibição do complexo I pelo MPP+ e por mutações adquiridas no DNA mitocondrial (14, 24, 25). Também o aumento de ferro, que surge no SN de pacientes com DP, promove o dano oxidativo particularmente na presença de neuromelanina (26).

Por outro lado, a concentração de glutathione, um antioxidante, está diminuída na Snc de pacientes post mortem com DP, o que evidencia o comprometimento dos mecanismos endógenos protetores (27).

## Agregação proteica

Uma agregação proteica anormal é fonte de toxicidade celular e esta parece ser um importante mecanismo em diversas doenças neurodegenerativas (1).

Na DP, a proteína de agregação primária é a  $\alpha$ -syn, que é o maior componente dos corpos de Lewy e das neurites de Lewy. Evidências abundantes relacionam a  $\alpha$ -syn à DP, embora o mecanismo pelo qual esta causa dano neuronal não seja conhecido (28).

## Neuroinflamação

A neuroinflamação tem sido cada vez mais reconhecida como um mecanismo primordial envolvido na patogênese da DP. A ativação da microglia, a elevação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , níveis séricos elevados de proteínas do complemento e a presença destas nos corpos de Lewy, foram detetadas em pacientes com DP (29).

As células microgлияis, que funcionam como o sistema imunológico residente no SN, são fundamentais para a reação inflamatória. A ativação da microglia pode induzir a expressão do óxido nítrico sintase e libertar quantidades significativas de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ , o que pode danificar os neurónios dopaminérgicos (30).

## Excitotoxicidade

A excitotoxicidade tem sido associada como um mecanismo patogénico em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. O glutamato é o neurotransmissor excitatório principal no SN dos mamíferos e o condutor primário do processo excitotóxico (1). Os neurónios dopaminérgicos no SNC têm elevados níveis de recetores NMDA que são ativados pelo glutamato que provém dos núcleos subtalâmicos e do córtex. A ativação excessiva destes recetores resulta num aumento intracelular dos níveis de cálcio, que por sua vez pode ativar as vias de morte celular (31). Por outro lado, o influxo de cálcio promove à produção de peroxinitrito que está aumentado no SN de pacientes post mortem com DP (32).

## Apoptose

A apoptose, ou a morte celular programada, é um mecanismo que está envolvido diretamente na DP. A apoptose foi observada em modelos animais de DP, mas é improvável que seja um mecanismo inicial no desenvolvimento da doença mas sim uma fase terminal que é ativada pelo stress oxidativo, pela agregação proteica, excitotoxicidade e processo inflamatório (33).

## Perda de fatores tróficos

A perda de fatores neurotróficos contribui para a morte celular na DP. Sabe-se que o BDNF, o GDNF e o GF estão reduzidos no SNC de pacientes com DP (34, 35).

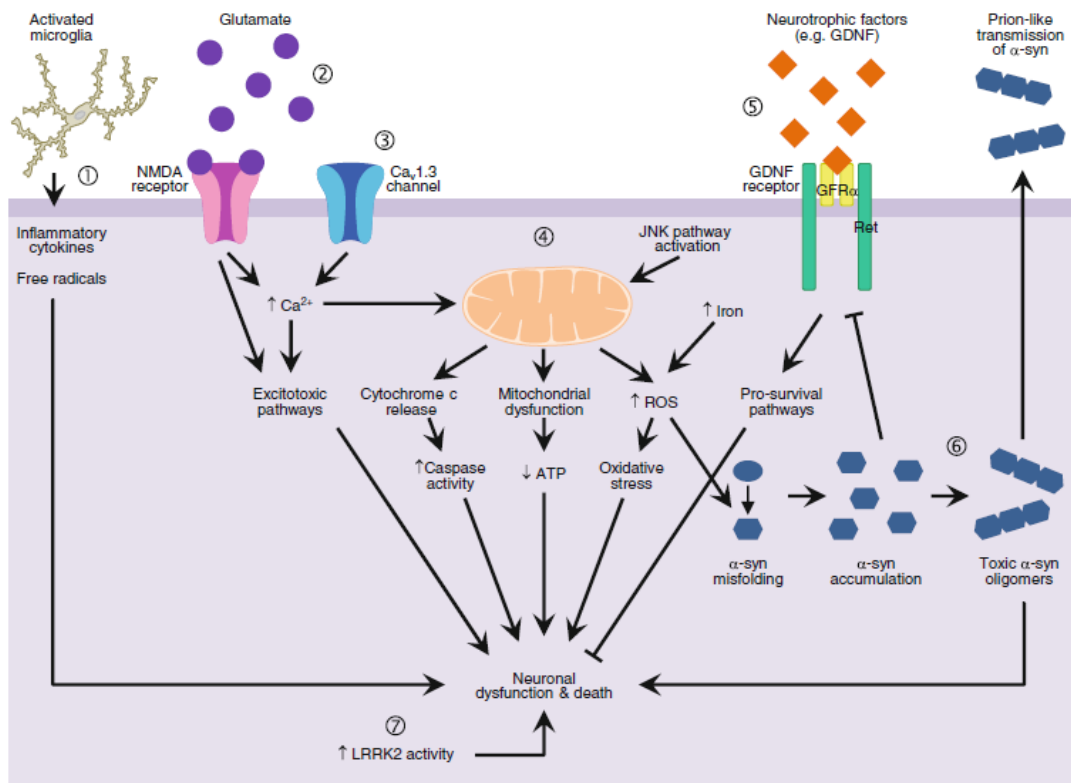


Figura 2 - Mecanismos patogênicos que podem ser potenciais alvos para terapias Neuroprotetoras na DP. 1) Neuroinflamação; 2) Excitotoxicidade; 3) Alteração da Homeostasia do Cálcio; 4) Disfunção Mitocôndrial, Stress Oxidativo e Apoptose; 5) Perda de Fatores Neurotróficos; 6) Agregação Proteica; 7) Aumento da Atividade da Quinase LRRK2 (Adaptado de (25)).

## 4.4 - Estratégias neuroprotetoras

Muitos fármacos têm demonstrado ser eficazes em modelos animais de DP, contudo, tais terapias ainda não são claramente viáveis na DP em humanos devido à complexidade da doença e sua causa multifatorial, bem como às limitações dos ensaios clínicos para monitorizar a progressão da doença e os efeitos que novas terapias possam causar. Recentemente, a Academia Americana de Neurologia concluiu que “ Nenhum tratamento demonstrou ser neuroprotetor” (36).

## Levodopa como agente neuroprotetor

A L-dopa é uma das mais antigas e efetivas terapias para os sintomas da DP. Embora seja largamente usada, até muito recentemente não se sabia o impacto que o seu uso teria na progressão da DP a longo prazo. Como o catabolismo da dopamina produz radicais livres, havia preocupação que os pacientes tratados com L-dopa fossem alvos da neurodegeneração, e, por outro lado, ensaios pré-clínicos sugeriam que esta fosse neuroprotetora (1).

O ELLDOPA foi um estudo clínico randomizado, duplo cego controlado com placebo, que contou com 361 pacientes de DP, desenhado para avaliar como o tratamento com L-dopa modifica a progressão da doença. Os resultados foram inconclusivos devido ao facto de que o efeito da L-dopa sobre os sintomas da doença interferirem com a avaliação da progressão da doença, e, por outro lado, as técnicas de neuroimagem terem fiabilidade incerta. Assim, atualmente, não é claro se a L-dopa é neuroprotetora (37) e também não há nenhuma evidência que sugira que a L-dopa seja tóxica em doentes com DP. É recomendado que os médicos usem a L-dopa na menor dose clínica possível para fornecer controlo satisfatório (38).

## Agonistas dos recetores dopaminérgicos

Foi proposto que os agonistas dos recetores dopaminérgicos fossem potenciais fármacos neuroprotetores porque ao se ligarem aos recetores iriam diminuir a libertação de dopamina e assim reduzir o stress oxidativo. Estudos experimentais in vitro e em animais, demonstraram que tais agonistas podiam reduzir a morte celular dopaminérgica (39).

Dois ensaios clínicos foram concebidos para avaliar as propriedades neuroprotetoras dos fármacos agonistas da dopamina. O ensaio CALM-PD comparou o uso de pramipexol com a L-dopa e o ensaio REAL-PET comparou o uso de ropinirol com L-dopa. Em ambos, o resultado sugere que os agonistas dopaminérgicos têm efeito neuroprotetor (40, 41).

## Agentes Antioxidantes

Baseado no importante papel que o stress oxidativo tem na patogenia da DP, vários ensaios clínicos foram conduzidos usando vários antioxidantes, entre os quais a vitamina E e inibidores da MAO-B - selegilina e a rasagilina.

O primeiro grande ensaio clínico realizado foi o DATATOP que avaliou o efeito da vitamina E e da selegilina em pacientes com DP. A vitamina E foi selecionada por ser um potente antioxidante lipossolúvel e a selegilina por aumentar a dopamina no corpo estriado, diminuir o stress oxidativo e prevenir o MPTP de se converter em MPP+. Para além disso, a selegilina

tem uma porção de propargilamina que aparenta ter efeitos anti-apoptóticos por bloqueio da gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (25).

O objetivo do estudo era saber quando iniciar a terapia com L-dopa. Os pacientes tratados com a vitamina E não experimentaram nenhuma vantagem, enquanto aqueles que foram tratados com a selegilina, demonstraram um atraso significativo na necessidade da terapia com L-dopa, comparativamente aqueles tratados com placebo, o que demonstrou um potencial efeito modificador da doença, embora, o facto de que a própria selegilina provavelmente tivesse efeitos sintomáticos que melhorariam os sintomas motores da DP tenha sido uma importante limitação do estudo (14, 25).

Outro ensaio clínico desenvolvido foi o SINDEPAR, em que os pacientes tratados com a selegilina experienciaram menos deterioração em comparação com os que receberam o placebo, o que sugere que a selegilina possa atrasar a progressão da doença (42).

A Rasagilina é um inibidor da MAO-B mais potente que a selegilina e os seus metabolitos têm efeitos neuroprotetores. Foram desenvolvidos 2 ensaios clínicos - TEMPO e o ADAGIO. No primeiro estudo, avaliou-se pacientes tratados com rasagilina comparativamente com placebo, sendo que os resultados sugeriram que o tratamento precoce conferia benefício embora a duração do estudo fosse curta e o tamanho dos grupos fosse pequeno (43). No segundo estudo, que teve uma amostra maior e durou mais tempo, a rasagilina demonstrou capacidade neuroprotetora na avaliação da escala UPDRS (3, 44) contudo os estudos TEMPO e ADAGIO trouxeram mais questões do que respostas definitivas (45).

Estudos epidemiológicos apontam o ácido úrico como potencial agente neuroprotetor na DP por atuar como antioxidante ao eliminar as ROS e nitrogénio. Estudos epidemiológicos demonstram uma diminuição da incidência da DP em indivíduos com níveis séricos de uratos elevados e indivíduos com gota (46). Um estudo de coorte prospetivo mais recente, mostrou que indivíduos em dietas que promovem altos níveis de urato têm um risco reduzido de desenvolver a doença (47). Contudo, tais benefícios têm de ser ponderados pelo risco de desenvolver gota ou doenças cardiovasculares (1). Recentemente, ensaio SURE-PD avaliou a inosina, um precursor do urato num estudo randomizado, duplo-cego, envolvendo 75 doentes. Os resultados demonstraram que a inosina oral é segura, tolerável e eficaz em aumentar a concentração sérica de urato em doentes de DP, o que sugere potencial efeito neuroprotetor (48).

Em modelos experimentais, o clioquinol, um quelante de ferro, está associado a uma redução na morte dopaminérgica. Por outro lado, a deferiprona, outro quelante de ferro oral, foi estudada em um pequeno ensaio clinico piloto, que resultou no aumento dos níveis da dopamina e melhoria das funções motoras. Mais estudos deverão ser realizado (49).

A zonisamida, um fármaco antiepilético, tem demonstrado fornecer benefício sintomático em pacientes com DP. Em modelos experimentais, a zonisamida tem efeito modulador sobre o stress oxidativo, sinalização intracelular de cálcio e atividade da caspase-3. Atualmente o ensaio clínico ZONIST está a avaliar a neuroproteção deste agente (25).

A formação excessiva de radicais livres e a depleção de GSH, o antioxidante primário do cérebro, foi demonstrada em paciente com DP. Alguns clínicos têm vindo a usar a GSH nos seus pacientes por via intravenosa, embora um estudo randomizado e controlado por placebo, não mostrou evidência a nível neuroprotetor (50). Um novo método, que utiliza a GSH por via intranasal demonstrou que esta é bem tolerada (51). Contudo, mais estudos são necessários para averiguar a eficácia deste agente (52). Outro estudo clínico que está a decorrer, utiliza a N-acetilcisteína, um precursor da GSH, para avaliar o aumento da GSH em doentes com DP (53).

Em modelos experimentais, os polifenóis, antioxidantes naturais encontrados no chá verde, demonstraram potencial neuroprotetor ao inibir a produção de óxido nítrico e de ROS (6, 54). Por conseguinte, um estudo randomizado controlado está em desenvolvimento para avaliar o efeito neuroprotetor do chá verde em doentes com DP (55).

### Potenciadores mitocondriais

Diversos ensaios clínicos têm sido feitos para investigar o potencial neuroprotetor que os potenciadores de mitocondriais possam ter. Destes destacam-se a Co-Q10 e a creatina.

A Co-Q10 é um cofator biológico essencial da cadeia de transporte de eletrões, também conhecido por ubiquinona, que tem efeito antioxidante na membrana mitocondrial (56). Um ensaio clínico piloto mostrou que pacientes que receberam uma dose mais elevada de Co-Q10 (1200mg/dia) tiveram menor deterioração do que aqueles tratados com placebo (14, 56), embora sem se poder confirmar se é um agente neuroprotetor e sendo necessários estudos maiores (14).

A creatina é um composto azotado de guanidina que ajuda a fornecer energia às células musculares e nervosas. É levada para dentro do cérebro e do músculo por um transportador de creatina-dependente de sódio, e torna-se fisiologicamente ativa quando se transforma em fosfocreatina (56). A creatina promove a produção mitocondrial de ATP e parece ser neuroprotetora em modelos experimentais (1, 14). Num ensaio clínico piloto que comparou 60 pacientes tratados com creatina ou com um placebo durante 2 anos, não se observaram diferenças (57).

## Agentes anti-apoptóticos

Muitos agentes anti-apoptóticos foram examinados em ensaios clínicos controlados. A TCH346 é um fator que inibe a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que pode por sua vez iniciar a apoptose. Embora em modelos experimentais a TCH346 tenha mostrado capacidade para reduzir a perda de células dopaminérgicas, um estudo randomizado, duplo-cego, que envolveu 301 pacientes, não conseguiu mostrar diferenças significativas (58).

Outro agente anti-apoptótico é o CEP-1347 que pode inibir a via c-Jun N-terminal kinase envolvida na morte celular mas que no ensaio clínico PRECEPT envolvendo 806 pacientes tratados com CEP-1347 e placebo, não mostrou resultados (59).

A minociclina, uma tetraciclina de segunda geração muito utilizada como agente antimicrobiano, é outra droga anti-apoptótica que tem sido associada à neuroproteção. A minociclina é um inibidor da caspase que tem efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade por inibir ativação e proliferação de microglia. Em modelos experimentais, demonstrou ser eficaz contra a perda de células dopaminérgicas, sendo necessários mais estudos (60).

## Fatores tróficos

Inúmeros fatores neurotróficos foram sugeridos e estudados em ensaios clínicos em humanos.

O GDNF é um fator neurotrófico potente, que dá suporte aos neurónios dopaminérgicos da Sn e tem demonstrado capacidade neuroprotetora em modelos animais da DP (1). Um ensaio clínico randomizado e controlado, envolvendo 34 pacientes, foi interrompido devido à falta de eficácia e pela ocorrência de eventos adversos, relacionados com o dispositivo de infusão intraputâmên e por vários pacientes terem desenvolvido anticorpos para o GDNF (61). Novos estudos com o GDNF estão em curso (25).

Uma alternativa para a infusão direta de fatores tróficos é por transferência de genes. Recentes esforços ao nível da terapia genética têm usado a neurturina, um fator neurotrófico relacionado com o GDNF que também promove a sobrevivência neuronal dopaminérgica. A neurturina (CERE-120) está contida num vetor vírus adeno associado (AAV-2) e demonstrou benefício no tratamento da DP num ensaio clínico com 12 pacientes. No entanto, estes resultados devem ser vistos como preliminares até que surjam novos dados de ensaios clínicos controlados (62).

As neuroimunofilinas, que são recetores intracelulares proteicos, que servem de local de ligação a fármacos imunossuppressores como a ciclosporina e a FK506, existem em grande número no cérebro e podem promover o crescimento neuronal independentemente dos seus

efeitos imunossupressores. As neuroimunofilinas demonstraram alguma evidência na neuroproteção em alguns modelos experimentais. O mecanismo de ação é desconhecido podendo envolver a indução de fatores neurotróficos ou a glutathione antioxidante. Um ensaio recente não mostrou diferenças significativas nos sintomas motores de pacientes tratados com neuroimunofilinas comparativamente aos tratados com placebo (63).

Outros fatores neurotróficos têm sido apontados como potenciais terapias neuroprotetoras em estudos pré-clínicos como o FGF, CDFN e o MANF (64).

### Antagonista do recetor de adenosina

Estudos experimentais recentes têm demonstrado que os antagonistas do recetor A<sub>2a</sub> têm propriedades neuroprotetoras. Os recetores A<sub>2a</sub> estão localizados em várias estruturas dos gânglios da base como por exemplo o corpo estriado, globo pálido, núcleo accumbens e o tuberculum olfactorium, e em outras áreas cerebrais como o hipocampo, córtex cerebral e núcleos talâmicos.

Alguns dados recentes mostram que os antagonistas seletivos podem não só reverter as deficiências motoras na DP como diminuir ou parar o progresso da doença (65).

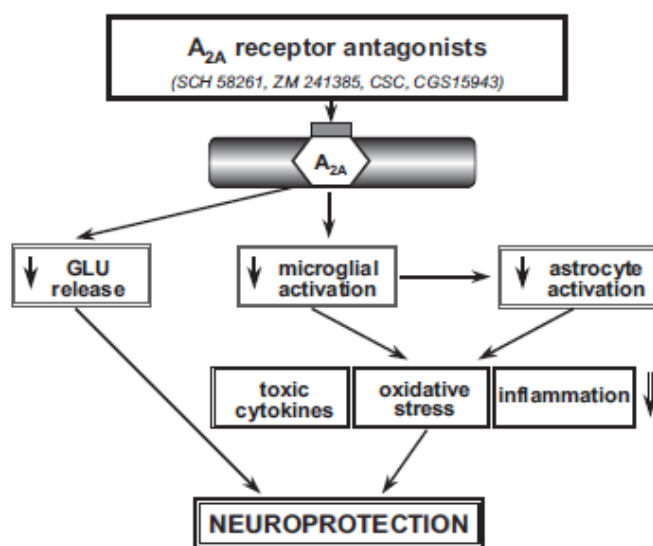


Figura 3 - Ação neuroprotetora dos Antagonistas A<sub>2a</sub>. Os antagonistas A<sub>2a</sub> reduzem a liberação de glutamato e por sua vez a excitotoxicidade provocada por este. Também inibem a ativação das células gliais e dos astrocitócitos que irá inibir a inflamação, a liberação de citocinas tóxicas e de radicais livres (Adaptado de (65)).

Estudos epidemiológicos têm indicado que cafeína pode reduzir a incidência de DP em homens (66). Como a cafeína atua como antagonista da adenosina pode assim ter

propriedades neuroprotetoras. A istradefilina, um antagonista do recetor A2a, demonstrou ser neuroprotetora em modelos experimentais da DP (1).

### Agentes Anti-Inflamatórios

Como referido anteriormente, sabe-se que a ativação da microglia, o aumento da produção de citocinas e o aumento das proteínas do complemento está demonstrada na DP.

Vários estudos revelam que certos AINES, como o ácido acetilsalicílico, têm qualidades neuroprotetoras, embora haja dados que se contradizem relativamente ao fármaco, dose e duração de tratamento. Vários estudos foram feitas, contudo, neste momento, não é claro que qualquer um dos AINES disponíveis tenha propriedades neuroprotetoras (1, 67).

Uma abordagem diferente e alternativa pode ser a utilização de estatinas, que além de diminuírem o colesterol, têm efeito anti-inflamatório, incluindo a redução de TNF $\alpha$ , óxido nítrico e da produção de microglia. As estatinas também podem agir para eliminar radicais livres. Em modelos animais foi mostrado que a sinvastatina reduz a perda de dopamina e em estudos epidemiológicos, o uso de sinvastatina está associado a uma incidência menor de DP. Outros estudos, sugerem que os baixos níveis de colesterol LDL aumentem o risco de DP, embora esta relação tenha de ser mais explorada num estudo prospetivo e randomizado (67).

Como referido anteriormente, a minociclina, para além do efeito anti-apoptótico, também tem efeito anti-inflamatório por bloquear a ativação da microglia. Em estudos experimentais, demonstrou-se que a minociclina protege contra a perda celular dopaminérgica e ensaios clínicos estão em desenvolvimento (68).

Estudos experimentais com agonistas beta-adrenérgicos sugerem que estes possam contribuir para a neuroprotecção. Baixas concentrações de salmeterol, um agonista beta2-adrenérgico de ação prolongada, demonstram efeitos anti-inflamatórios ao bloquear a ativação da microglia e considerando a eficácia destes compostos em concentrações tão baixas na inibição de respostas inflamatórias, eles parecem ter um potencial significativo na regulação da inflamação do SNC e no tratamento de doenças inflamatórias crónicas do SNC (69).

Um estudo experimental com o catalpol, um glicósido proveniente das raízes de *Rehmannia glutinose*, sugere que este tenha efeito neuroprotetor sobre os neurónios dopaminérgicos através da inibição da ativação da microglia e redução da produção de fatores pró-inflamatórios. Estas observações demonstram que o catalpol possa ser um potencial agente terapêutico (30).

Um estudo experimental mais recente, demonstra que a naringenina possa ser também um potencial agente neuroprotetor na DP por inibir a ativação da microglia. A naringenina é um

flavonoide encontrado em citrinos, que tem efeito anti-inflamatório por inibir a liberação de óxido nítrico, inibir a expressão do óxido nítrico sintase e a ciclo-oxigenase-2 (70).

### Inibidores da agregação da $\alpha$ -syn

A  $\alpha$ -syn parece ser um importante mediador na toxicidade da DP embora o mecanismo não seja bem compreendido. Novas terapias têm por fundamento a redução da agregação da  $\alpha$ -syn reduzindo a produção da própria proteína, aumento da eliminação da  $\alpha$ -syn, prevenindo ou reduzindo modificações químicas que podem promover espécies agregadas ou por interferir diretamente com a agregação.

A eliminação da  $\alpha$ -syn pode ser reforçada pela ativação da via proteossomal ou lisossomal e o aumento do parkin ou da atividade do UCH-L1 pode promover a eliminação da  $\alpha$ -syn. A proteína Hsp70 pode reduzir agregados de  $\alpha$ -syn, assim como a ativação lisossomal através da enzima catepsina D em modelos animais e bloqueadores diretos da agregação da  $\alpha$ -syn como a  $\beta$ -syn e as proteínas 14-3-3. Todas estas estratégias estão em desenvolvimento e em estudo antes de serem realizados ensaios clínicos em humanos (1).

### Inibidores da quinase

O gene LRRK2 codifica uma grande proteína, dardarina, que tem um domínio de quinase serina/treonina e um domínio de GTPase. A mutação mais comum que ocorre no LRRK2 é a G2019S, que ocorre no domínio quinase e está associada ao aumento da atividade da quinase. Inibidores da quinase da LRRK2 são uma potencial estratégia terapêutica para a neuroproteção (71). A CZC-25146 é um inibidor da LRRK2 que previne o dano neuronal em animais e em humanos (72). Outros dois inibidores, nomeadamente a GW5074 e o sorafenibe, mostraram eficácia contra a neurodegeneração em modelos experimentais. Estes achados sugerem que o aumento da atividade da quinase do LRRK2 é neurotóxico e a sua inibição poderá ter um efeito modificador na doença (73).

### Antagonistas do recetor de NMDA

Em modelos experimentais, os antagonistas dos recetores NMDA protegem contra a morte celular dopaminérgica, contudo, a fraca potência e baixa tolerabilidade dos agentes atualmente disponíveis, limitam grandemente o seu uso clínico (1).

Um pequeno ensaio clínico com o riluzol não mostrou qualquer efeito neuroprotetor. O riluzol é um fármaco com múltiplos mecanismos de ação, incluindo a inibição da liberação de glutamato, que num ensaio em pacientes com DP demonstrou ser bem tolerado. No entanto, um grande estudo multicêntrico com riluzol foi interrompido por falta de benefícios na análise dos dados (1, 14).

Os neurônios dopaminérgicos humanos têm recetores NMDA com uma composição incomum caracterizada pela expressão abundante de subunidades NR2D, que têm propriedades farmacológicas e fisiológicas distintas dos tipos de recetor encontrados em outras regiões do cérebro, e deste modo, o desenvolvimento de antagonistas com seletividade para subunidades específicas dos canais NMDA parece ser uma terapia promissora para a neuroprotecção na DP (74).

Uma outra abordagem será atuar diretamente nos sistemas de sinalização intracelular de cálcio. Estudos epidemiológicos sugerem que as dihidropiridinas, classe de medicamentos que pertence aos bloqueadores de cálcio usada para o tratamento da hipertensão arterial, tem menor incidência de DP. A isradipina, uma dihidropiridina, está sendo investigada como potencial agente neuroprotetor (75).

#### **4.5 - Outros agentes farmacológicos**

Em vários estudos tanto em animais como em humanos o estrogénio demonstrou potencial neuroprotetor na DP. Recentes descobertas que indicam que o tratamento com estrogénio induz à diferenciação de células estaminais neurais, tornando o estrogénio um potencial agente importante no transplante de células estaminais para pacientes com DP. O efeito benéfico do estrogénio em modelos animais da DP, fez com que se estudasse o efeito dos moduladores seletivos do recetor de estrogénio (SERMs), nomeadamente o tamoxifeno e o raloxifeno. Ambos demonstraram em modelos animais serem potenciais agentes neuroprotetores. Embora vários estudos sugerirem que o estrogénio e os SERMs possam ter efeito neuroprotetor, mais estudos epidemiológicos e clínicos são necessários para estudar as relações entre o sexo ou o estrogénio/SERMs e a incidência de DP (11).

A exenatida, um fármaco usado no tratamento da diabetes tipo II, tem demonstrado efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de DP. Um ensaio clínico já foi realizado em DP e certamente este agente será alvo de mais estudos para avaliar os seus potenciais efeitos neuroprotetores (76).

A nicotina tem sido proposta como agente neuroprotetor devida à baixa prevalência de DP em fumadores. No entanto, estudos controlados têm fornecido resultados discordantes. Atualmente, um estudo clínico randomizado e controlado de nicotina transdérmica em 6 pacientes, demonstrou eficácia como agente neuroprotetor embora mais estudos sejam necessários (77).

A EPO tem demonstrado ser capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da Sn da morte celular em modelos animais e pensasse que possa atuar como anti-inflamatório na neurodegeneração. Um estudo com a EPO mostrou que é segura e bem tolerada em pacientes com DP (78). O filgrastim, um fator estimulador das colónias de granulócitos, também

mostrou ser neuroprotetor em modelos experimentais e está atualmente a decorrer um ensaio clínico para avaliar a sua eficácia neuroprotetora (79).

O ácido clavulânico é um composto que mostrou capacidade para modular a atividade do SNC, melhorando a função motora em modelos animais. Embora o mecanismo não seja totalmente conhecido, identificou-se que o ácido clavulânico inibe a produção de ROS, o que sugere potencial neuroprotetor (80).

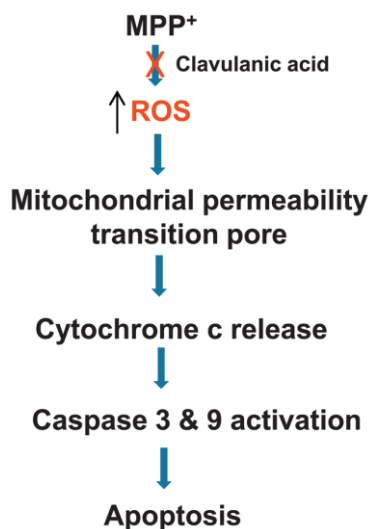


Figura 4 - Esquema de como o ácido clavulânico atua na neuroproteção num modelo induzido com MPP+ (Adaptado de (80)).

Os neuroesteroides são hormonas produzidas pelo sistema nervoso central e periférico e pelas glândulas endócrinas. Incluem o pregnenolona, a dehidroepiandrosterona, a progesterona e derivados metabólicos. De acordo com os conhecimentos atuais, estes agentes parecem exibir propriedades neuroprotetoras por um mecanismo multifatorial. A maioria dos estudos foram realizados em animais havendo a necessidade para a realização de estudos em humanos e embora o conhecimento esteja incompleto, este grupo de esteroides parece ser um promissor agente neuroprotetor em diversas doenças neurodegenerativas incluindo a DP (81).

A edaravona é um eficaz eliminador de radicais livres, que demonstrou capacidade antioxidante e anti-apoptótica em modelos experimentais e assim sendo, uma vez que a edaravona previne a degeneração neuronal, esperasse que o uso desta possa retardar a progressão da neurodegeneração (82).

A rapamicina é um macrolídeo que inibe certas ações da mTOR quinase, protegendo os neurónios de morte celular em modelos experimentais de DP. Os seus efeitos protetores parecem estar ligados ao bloqueio da RTP801/REDD1/Ddit4, que é uma proteína que induz a morte celular neuronal em modelos animais. Assim sendo, a capacidade neuroprotetora que, aparentemente, a rapamicina apresenta deve-se à supressão seletiva da quinase mTOR,

contrariamente à Torin1 que, inibindo todas as ações da mTOR, não demonstra efeito protetor (83).

Recentes estudos em animais, sugerem que o baclofeno, um agonista do recetor GABA-B, inibe a neuroinflamação e o stress oxidativo. No entanto, e embora estes resultados indiquem potencial neuroprotetor do baclofeno na prevenção da DP, mais estudos são necessários para melhor entender o papel dos recetores GABA-B na DP em humanos (18).

A fustina, um tipo de flavonoide, tem sido utilizado como suplemento alimentar e agente fitoterapêutico para a artrite reumatoide. Estudos em modelos experimentais, sugerem que a fustina protege os neurónios dopaminérgicos de morte celular por inibir o aumento do cálcio intracelular e de ROS. Mais estudos serão necessários para avaliar o potencial neuroprotetor deste agente (84).

#### **4.6 Abordagens não farmacológicas**

A estimulação cerebral profunda em modelos animais, resulta em sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos. Existem séries clínicas piloto de doentes tratados com estimulação cerebral contudo, ainda é prematuro avaliar o potencial neuroprotetor desta abordagem, uma vez que os doentes receberam simultaneamente tratamento farmacológico. Mais estudos serão necessários para avaliar se a estimulação cerebral profunda pode modificar a progressão da doença (85).

Estudos em animais têm demonstrado que o exercício físico intenso melhora a função motora dos doentes de parkinson. Atualmente, o estudo ParkCycle está a avaliar o efeito do exercício físico aeróbico na plasticidade cognitiva e adaptativa na DP (86) e outro estudo sobre a relação entre o exercício físico intenso e prevenção das quedas está em desenvolvimento (87).

# Capítulo 5

## Limites de Estudos Anteriores

Apesar das várias estratégias para a neuroproteção na DP, nenhum dos ensaios clínicos mostrou ser claramente modificador da doença. Contudo, estes estudos fornecem importantes conhecimentos sobre as limitações para desenvolver e testar novas terapias modificadoras da doença (25).

### 5.1 - Limites dos Ensaios Clínicos

Para determinar se uma terapia é neuroprotetora na DP, é essencial que esta seja testada em pacientes vivos. Tradicionalmente, os ensaios clínicos são avaliados pelos resultados do exame neurológico que demonstra progressão ou falta de progressão na doença.

A UPDRS envolve o exame clínico da função motora combinado com escalas de avaliação subjetivas da função dos doentes nas suas atividades diárias. Contudo, existem vários limites a esta escala. Em primeiro lugar, os tratamentos disponíveis têm um grande efeito sobre a escala UPDRS, o que pode dificultar as evidências da neuroproteção. Por outro lado, a escala é muito dirigida à disfunção motora, e em particular, é dirigida aos sintomas relacionados com o tremor. Por fim, grande parte da debilidade associada à DP não é considerada na escala como a disfunção autonómica e a fadiga (1). Recentemente, esta escala foi revista pela Movement Disorder Society (MDS) para torná-la mais sensível às alterações motoras e para detetar as alterações não motoras que frequentemente estão presentes nas fases iniciais da doença (88).

Para superar os efeitos sintomáticos potencialmente confusos de um tratamento, muitos ensaios incorporaram um “washout period” que consiste em parar o tratamento durante um determinado período de tempo para que os efeitos desse tratamento sejam eliminados. No entanto, estes efeitos podem durar mais que esse período e confundir os resultados dos ensaios. Uma abordagem alternativa é o “delayed-start design” em que existem dois grupos de pacientes e em que um grupo começa o tratamento alguns meses antes do outro. Esta abordagem assume que os efeitos sintomáticos serão iguais em ambos os grupos no fim do ensaio. Contudo, ainda existem alguns potenciais problemas com esta abordagem pois um tratamento mais prolongado pode resultar num aumento da sensibilidade ao fármaco. Apesar disso, muitos investigadores consideram esta a melhor abordagem para avaliar a neuroproteção em ensaios clínicos (1, 14).

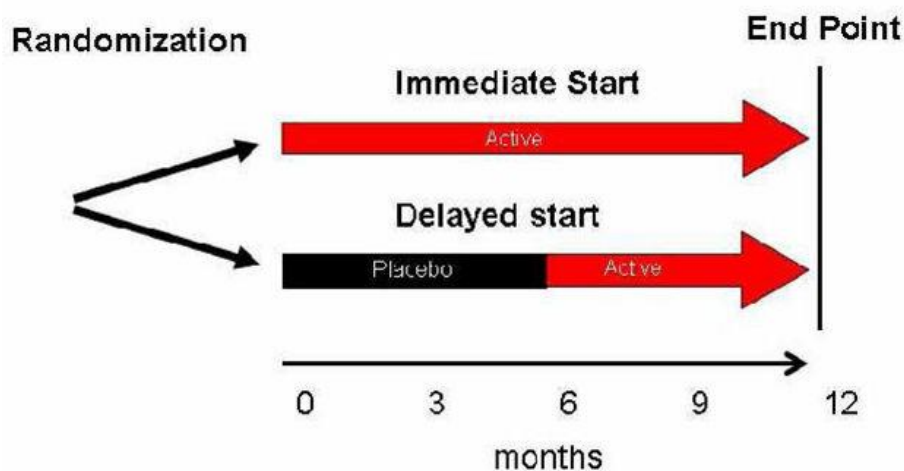


Figura 5 - Descrição esquemática do “delayed-start design”. Os pacientes de forma randomizada recebem o agente terapêutico imediatamente ou com um intervalo de tempo. Os pacientes do grupo imediato, fazem terapia desde o início do estudo até ao fim, enquanto que aqueles do grupo com intervalo de tempo, recebem um placebo inicialmente por período predeterminado e em seguida, recebem o agente terapêutico até ao fim do estudo (Adaptado de (1)).

Tendo em conta os desafios na definição neuroprotecção, a complexidade da doença, as limitações de modelos experimentais anteriores e a confusão relacionada com os efeitos da terapêutica sintomática, os investigadores do NINDS têm optado por utilizar estudos simples a longo prazo com objetivos múltiplos para avaliar a qualidade de vida, bem como os sintomas dopaminérgicos e não-dopaminérgicos dos pacientes. Todos estes problemas poderiam ser resolvidos se houvesse um biomarcador que pudesse confirmar o diagnóstico da DP ou medir objetivamente a progressão da doença e eficácia do tratamento (89).

## 5.2 - Limites dos Modelos Animais

A insuficiência de muitas terapias potencialmente neuroprotetores também pode ser explicada pelas limitações nos modelos animais pois atualmente, não existe um modelo animal que imite a patologia completa e a sintomatologia clínica da doença (1). Estes modelos também são conhecidos como modelos patogénicos (21). Tradicionalmente, os estudos pré-clínicos focam-se em modelos baseados na toxina 6-OHDA ou na MPTP. Estes dois tipos de modelos mostram a degeneração dos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais, embora a evolução tanto temporal como patológica destes modelos seja diferente da doença em humanos (1). A validade dos modelos animais aumentaria dramaticamente se as inclusões proteicas intraneurais, os corpos de Lewy, fossem observadas o que ainda não foi relatado (21). Ainda mais importante é o fato de não haver uma evidência substancial para o papel de qualquer uma destas toxinas na DP humana (1, 25).

Com a descoberta da  $\alpha$ -syn, da parkin, da LRRK2 e outras proteínas através de estudos genéticos, os modelos genéticos têm sido desenvolvidos com algumas vantagens relativamente aos modelos patogénicos (25). A tendência atual é o uso de modelos genéticos também conhecido por modelos etiológicos (21). Estes modelos incorporam algumas características adicionais da doença, mas ainda ficam aquém de uma recriação autêntica. Por exemplo, um animal transgénico, mostra défices motores, inclusões da  $\alpha$ -syn e perda da dopamina mas nenhum consegue atualmente mostrar perda de neurónios dopaminérgicos (1).

### 5.3 - Limites dos biomarcadores

Os biomarcadores são características medidas objetivamente que podem indicar um processo patogénico subjacente. Atualmente, não existem biomarcadores validados para a DP, embora estejam em curso pesquisas para identificar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e mais preciso da DP, assim como permitir monitorizar a progressão da doença e respostas às intervenções terapêuticas (25).

As imagens adquiridas por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e por tomografia por emissão de positrões (PET) têm sido usadas para medir o número de células dopaminérgicas, embora tenham as suas limitações. Uma das preocupações em ambas as abordagens é o fato de que a química subjacente aos marcadores radioativos utilizados, possa ser alterada pelos efeitos farmacológicos dos tratamentos em estudo, de tal modo que, as mudanças nas imagens não sejam necessariamente as mudanças no número de neurónios dopaminérgicos. Além disso, algumas das características da DP em estágios avançados não tem uma grande base dopaminérgica e por conseguinte, não vão ser capturados os marcadores radioativos e assim sendo, estas técnicas de imagem ainda não foram validadas como medições alternativas adequadas para o estudo da neuroproteção (90).

Existem vários potenciais marcadores candidatos para além da neuroimagem. Estes incluem marcadores à base de proteínas, marcadores do stress oxidativo, marcadores para a inflamação, e marcadores para a medição de padrões de variação em genes e proteínas (22).

Um biomarcador também pode ajudar na orientação da dosagem dos fármacos. Tipicamente, as doses dos medicamentos em estudo baseiam-se na reprodução das concentrações plasmáticas em modelos animais. Contudo, as concentrações necessárias no cérebro podem ser diferentes das concentrações em modelos animais, e para além disso, um dado agente terapêutico possa só ser eficaz apenas dentro de uma gama de dose estreita. Assim sendo, é possível que estudos com resultados negativos com tratamentos promissores tenham ocorrido devido à seleção de uma dose incorreta.

Os investigadores têm de compreender os potenciais erros associados à utilização de biomarcadores tanto como medidas de diagnóstico como para avaliar a progressão da doença.

Embora a combinação de marcadores possa ser útil na precisão em diagnosticar a doença, também esta pode resultar em falsos positivos. Espera-se que os biomarcadores sejam utilizados num estágio final de um ensaio clínico, embora possam estar limitados, devido ao tratamento poder alterar o biomarcador mas não a doença ou poder alterar um importante aspeto da patofisiologia da doença mas que não é detetado pelo biomarcador (25).

## Capítulo 6

### Conclusão

A neuroprotecção na doença de Parkinson continua a ser uma importante meta a atingir. O sucesso de um tratamento neuroprotetor poderá transformar a DP num problema controlado com um efeito modesto sobre a qualidade de vida dos pacientes, em vez de ser a doença incapacitante e progressiva, que conhecemos hoje em dia (25).

Em 2003, o comité para identificar os agentes neuroprotetores na doença de Parkinson (CINAPS) publicou uma avaliação de 12 potenciais compostos neuroprotetores que deveriam ser estudados em mais ensaios clínicos, como por exemplo, a selegilina, a rasagilina, o pramipexol e a minociclina. Desde então, a lista de potenciais terapias tem crescido embora ainda se espere por alguma que em estudos humanos tenha sucesso (91).

Para que um potencial agente neuroprotetor seja eficaz, os pacientes devem ser tratados precocemente. No momento em que a maioria dos pacientes desenvolve os sintomas clínicos típicos, estima-se que pelo menos 60% dos neurónios dopaminérgicos da SNc já tenham degenerado e que já possam existir sintomas não motores anteriores a essa degeneração como os distúrbios do sono e distúrbios autónomos. Tais sintomas precoces são a base para a busca de métodos para detetar a DP pré-sintomática, que vão desde simples testes de olfato a estudos de neuroimagem sofisticados (8).

O interesse com a neuroprotecção é impulsionado em grande parte devido aos resultados dos estudos genéticos, patológicos e epidemiológicos em humanos embora um modelo animal com propriedades úteis em termos de neuroprotecção ainda não tenha sido identificado. A descoberta de genes que causam a DP tem enfatizado a diversidade da doença, pois esta envolve o sistema dopaminérgico como provavelmente outras causas inter-relacionadas. A maioria das mutações descobertas até agora são raras e improváveis de desempenharem um papel significativo em ensaios clínicos de maiores dimensões. No entanto, o estudo genético tem demonstrado que para haver eficácia neuroprotetora é essencial definir subgrupos de doentes e que deverá ser necessário combinar vários agentes para alcançar a neuroprotecção. Por fim, e embora muitas pesquisas sejam necessárias para se traduzir tais terapias teóricas em ensaios clínicos, é preciso ter em conta que estas abordagens podem conduzir a terapias que, para além de proteger contra a perda celular dopaminérgica, podem também proteger contra a perda de outras populações neuronais que estão em risco na DP e em distúrbios relacionados (1).

Na minha opinião, este trabalho permitiu perceber que existem ainda algumas barreiras quando se fala de neuroprotecção na DP, destacando-se a falta de conhecimento dos

mecanismos patofisiológicos e as deficiências na metodologia usada para estudar a progressão da doença. Atualmente, ainda não existe um fármaco com capacidade neuroprotetora e os estudos com neuroimagem não estão indicados como válidos tendo muitas limitações. Não obstante disso, a atividade destinada a compreender e a tratar a DP tem crescido exponencialmente e em última instância, deverá resultar em terapias que modifiquem com sucesso o curso da doença.

# Capítulo 7

## Bibliografia

1. Yacoubian TA, Standaert DG. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1792(7):676-87.
2. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 3//;24(2):197-211.
3. Fernandez M, Barcia E, Fernandez-Carballido A, Garcia L, Slowing K, Negro S. Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease. *Int J Pharm s*. 2012 Nov 15;438(1-2):266-78.
4. Harrison TR, Hauser SL, Josephson SA. *Harrison's neurology in clinical medicine*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2013. xiv, 879 p. p.
5. Huleatt PB, Khoo ML, Chua YY, Tan TW, Liew RS, Balogh B, et al. Novel arylalkenylpropargylamines as neuroprotective, potent, and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease. *J Med Chem*. 2015 Feb 12;58(3):1400-19.
6. Chen M, Wang T, Yue F, Li X, Wang P, Li Y, et al. Tea polyphenols alleviate motor impairments, dopaminergic neuronal injury, and cerebral alpha-synuclein aggregation in MPTP-intoxicated parkinsonian monkeys. *Neuroscience*. 2015 Feb 12;286:383-92.
7. Guo B, Xu D, Duan H, Du J, Zhang Z, Lee SM, et al. Therapeutic Effects of Multifunctional Tetramethylpyrazine Nitron on Models of Parkinson's Disease in Vitro and in Vivo. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(2):274-85.
8. Richardson JR, Hossain MM. Microglial ion channels as potential targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Plast*. 2013;2013:587418.
9. Schapira AHV, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet*. 2014;384(9942):545-55.
10. Wooten GF. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(4):637-9.
11. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007 5//;72(5):381-405.

12. Smith KM, Dahodwala N. Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Exp Neurol*. 2014 Sep;259:44-56.
13. Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2010 Oct;7(4):413-23.
14. Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. *NeuroRx*. 2004;1(1):139-54.
15. Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1842(8):1282-94.
16. Yin SM, Zhao D Fau - Yu D-Q, Yu Dq Fau - Li S-L, Li Sl Fau - An D, An D Fau - Peng Y, Peng Y Fau - Xu H, et al. Neuroprotection by scorpion venom heat resistant peptide in 6-hydroxydopamine rat model of early-stage Parkinson's disease. *Sheng Li Xue Bao*. 2014 Dec;66(6):658-66.
17. Wang X, Wang M, Yang L, Bai J, Yan Z, Zhang Y, et al. Inhibition of Sirtuin 2 exerts neuroprotection in aging rats with increased neonatal iron intake. *Neural Regen Res*. 2014 Set; 9(21):1917-22.
18. Tyagi RK, Bisht R, Pant J, Kumar P, Majeed AB, Prakash A. Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinson's disease in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Feb;67(2):211-7.
19. Quik M, Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Campos C, Perez XA. Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2009 Oct 1;78(7):677-85.
20. Castro-Hernandez J, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Salas-Hernandez J, Barroso-Chinea P, Moratalla R, et al. Prolonged treatment with pramipexole promotes physical interaction of striatal dopamine D3 autoreceptors with dopamine transporters to reduce dopamine uptake. *Neurobiol Dis*. 2015 Feb;74:325-35.
21. Bezard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord*. 2013 Jan;28(1):61-70.
22. Agarwal PA, Stoessel AJ. Biomarkers for trials of neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013 Jan;28(1):71-85.

23. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, et al. Oxidative DNA Damage in the Parkinsonian Brain: An Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra. *J Neurochem.* 1997;69(3):1196-203.
24. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000 Dec;3(12):1301-6.
25. AlDakheel A, Kalia LV, Lang AE. Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in Parkinson disease. *Neurotherapeutics.* 2014 Jan;11(1):6-23.
26. Sulzer D, Zecca L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res.* 2000 Feb;1(3):181-95.
27. Sian J, Dexter Dt Fau - Lees AJ, Lees Aj Fau - Daniel S, Daniel S Fau - Agid Y, Agid Y Fau - Javoy-Agid F, Javoy-Agid F Fau - Jenner P, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 1994 Sep;36(3):348-55.
28. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):839-40.
29. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 2007 Nov;208(1):1-25.
30. Tian YY, An LJ, Jiang L, Duan YL, Chen J, Jiang B. Catalpol protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in mesencephalic neuron-glia cultures. *Life Sci.* 2006 Dec 23;80(3):193-9.
31. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol Sci.* 1995 Oct;16(10):356-9.
32. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat.* 1996 Jun;10(3-4):179-90.
33. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Oct;65(2):135-72.

34. Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat.* 2001 Jun;21(4):277-88.
35. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 2000 Nov;166(1):127-35.
36. Suchowersky O, Gronseth G, Perlmutter J, Reich S, Zesiewicz T, Weiner WJ, et al. Practice Parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2006 Apr 11;66(7):976-82.
37. Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2004 Dec 9; 351(24):2498-508.
38. Olanow CW. Levodopa: effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015 Jan;30(1):37-44.
39. Iravani MM, Haddon CO, Cooper JM, Jenner P, Schapira AH. Pramipexole protects against MPTP toxicity in non-human primates. *J Neurochem.* 2006 Mar;96(5):1315-21.
40. Parkinson Study G. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on parkinson disease progression. *JAMA.* 2002;287(13):1653-61.
41. Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C, et al. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann Neurol.* 2003;54(1):93-101.
42. Stocchi F, Olanow CW. Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S87-97; discussion S-9.
43. Parkinson Study G. A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early parkinson disease. *Arch Neurol.* 2004;61(4):561-6.
44. Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, et al. A Double-Blind, Delayed-Start Trial of Rasagiline in Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2009 Sep 24;361(13):1268-78.
45. Ahlskog JE, Uitti RJ. Rasagiline, Parkinson neuroprotection, and delayed-start trials: Still no satisfaction? *Neurology.* 2010 Apr 6;74(14):1143-8.

46. de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2005 Nov;58(5):797-800.
47. Gao X, Chen H, Choi HK, Curhan G, Schwarzschild MA, Ascherio A. Diet, Urate, and Parkinson's Disease Risk in Men. *Am J Epidemiol*. 2008 Apr 1;167(7):831-8.
48. Parkinson Study Group S-PDI, Schwarzschild MA, Ascherio A, Beal MF, Cudkowicz ME, Curhan GC, et al. Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2014 Feb;71(2):141-50.
49. Devos D, Moreau C, Devedjian JC, Kluza J, Petrault M, Laloux C, et al. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 10;21(2):195-210.
50. Hauser RA, Lyons KE, McClain T, Carter S, Perlmutter D. Randomized, double-blind, pilot evaluation of intravenous glutathione in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009 May 15;24(7):979-83.
51. Intranasal Glutathione in Parkinson's Disease. Updated February 25, 2015. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01398748>. Accessed May 16, 2015.
52. Mischley LK, Vespignani MF, Finnell JS. Safety survey of intranasal glutathione. *J Altern Complement Med*. 2013 May;19(5):459-63.
53. N-Acetylcysteine for Neuroprotection in Parkinson's Disease (NAC for PD). Updated December 12, 2014. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01470027>. Accessed May 16, 2015.
54. Guo S, Yan J, Yang T, Yang X, Bezard E, Zhao B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biol Psychiatry*. 2007 Dec 15;62(12):1353-62.
55. Efficacy and Safety of Green Tea Polyphenol in De Novo Parkinson's Disease Patients. Updated August 15, 2011. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00461942>. Accessed May 16, 2015.
56. Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1147:395-412.
57. Bender A, Koch W Fau - Elstner M, Elstner M Fau - Schombacher Y, Schombacher Y Fau - Bender J, Bender J Fau - Moeschl M, Moeschl M Fau - Gekeler F, et al. Creatine

supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. *Neurology*. 2006 Oct 10;67(7):1262-4.

58. Olanow CW, Schapira AHV, LeWitt PA, Kieburtz K, Sauer D, Olivieri G, et al. TCH346 as a neuroprotective drug in Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*. 2006 Dec;5(12):1013-20.

59. Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*. 2007 Oct 9;69(15):1480-90.

60. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res*. 2001 Aug 3;909(1-2):187-93.

61. Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):459-66.

62. Marks Jr WJ, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RAE, et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol*. 2008 May;7(5):400-8.

63. Poulter MO, Payne KB, Steiner JP. Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? *Neuroscience*. 2004;128(1):1-6.

64. Yue X, Hariri DJ, Caballero B, Zhang S, Bartlett MJ, Kaut O, et al. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2014 Jan 31;258:385-400.

65. Wardas J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol*. 2002 Jul-Aug;54(4):313-26.

66. Ross G, Abbott RD, Petrovitch H, et al. Association of coffee and caffeine intake with the risk of parkinson disease. *JAMA*. 2000 May 24-31;283(20):2674-9.

67. Wahner AD, Bronstein JM, Bordelon YM, Ritz B. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2008 Apr 15;70(16 Pt 2):1418-22

68. NINDS NET-PD Investigators. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):664-71.

69. Peterson L, Ismond KP, Chapman E, Flood P. Potential benefits of therapeutic use of beta2-adrenergic receptor agonists in neuroprotection and Parkinson disease. *J Immunol Res*. 2014;2014:103780.
70. Wu LH, Lin C, Lin HY, Liu YS, Wu CY, Tsai CF, et al. Naringenin Suppresses Neuroinflammatory Responses Through Inducing Suppressor of Cytokine Signaling 3 Expression. *Mol Neurobiol*. 2015 Jan 13.
71. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, et al. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet*. 2007 Jan 15;16(2):223-32.
72. Chan BK, Estrada AA, Chen H, Atherall J, Baker-Glenn C, Beresford A, et al. Discovery of a Highly Selective, Brain-Penetrant Aminopyrazole LRRK2 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2012 Nov 23;4(1):85-90.
73. Liu Z, Hamamichi S, Lee BD, Yang D, Ray A, Caldwell GA, et al. Inhibitors of LRRK2 kinase attenuate neurodegeneration and Parkinson-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Parkinson's disease models. *Hum Mol Genet*. 2011 Oct 15;20(20):3933-42
74. Hallett PJ, Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*. 2004 May;102(2):155-74.
75. Parkinson Study G. Phase II safety, tolerability, and dose selection study of isradipine as a potential disease-modifying intervention in early Parkinson's disease (STEADY-PD). *Mov Disord*. 2013 Nov;28(13):1823-31.
76. Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Ell P, Soderlund T, et al. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. *J Clin Invest*. 2013 Jun;123(6):2730-6.
77. Villafane G, Cesaro P, Rialland A, Baloul S, Azimi S, Bourdet C, et al. Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial. *Eur J Neurol*. 2007 Dec;14(12):1313-6.
78. Safety Study of Erythropoietin (EPO) in Parkinson's Disease. Updated November 9, 2009. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01010802>. Accessed May 16, 2015.
79. Study of the Neuro-protective Effect of Granulocyte-colony Stimulating Factor on Early Stage Parkinson's Disease. Updated January 3, 2013. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01227681>. Accessed May 16, 2015.

80. Kost GC, Selvaraj S, Lee YB, Kim DJ, Ahn CH, Singh BB. Clavulanic acid inhibits MPP(+)-induced ROS generation and subsequent loss of dopaminergic cells. *Brain Res.* 2012 Aug 21;1469:129-35.
81. Wojtal K, Trojnar Mk, Czuczwar SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep.* 2006 May-Jun;58(3):335-40.
82. Xiong N, Xiong J, Khare G, Chen C, Huang J, Zhao Y, et al. Edaravone guards dopamine neurons in a rotenone model for Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6(6):e20677.
83. Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010 Jan 20;30(3):1166-75.
84. Park BC, Lee YS, Park H-J, Kwak M-K, Yoo BK, Kim JY, et al. Protective effects of fustin, a flavonoid from *Rhus verniciflua* Stokes, on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Exp Mol Med.* 2007 Jun 30;39(3):316-26.
85. Charles PD, Dolhun RM, Gill CE, Davis TL, Bliton MJ, Tramontana MG, et al. Deep brain stimulation in early Parkinson's disease: enrollment experience from a pilot trial. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 Mar;18(3):268-73.
86. The ParkCycle Study: Aerobic Exercise in PD. Updated November 12, 2014. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01562496>. Accessed May 16, 2015.
87. High-intensity Exercise and Fall Prevention Boot Camp for Parkinson's Disease. Updated May 26, 2015. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02230267>. Accessed May 16, 2015.
88. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord.* 2008 Nov 15;23(15):2129-70.
89. Grohm J, Kim SW, Mamrak U, Tobaben S, Cassidy-Stone A, Nunnari J, et al. Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* 2012 Sep;19(9):1446-58.
90. Eckert T, Eidelberg D. Neuroimaging and Therapeutics in Movement Disorders. *NeuroRx.* 2005 Apr;2(2):361-71.

91. Ravina BM, Fagan SC, Hart RG, Hovinga CA, Murphy DD, Dawson TM, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology*. 2003 Apr 22;60(8):1234-40.