



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Stress Oxidativo e Doença de Parkinson

Henrique Jorge Rijo Mendes Martins Elvas

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

Orientador: Prof. Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

Covilhã, maio de 2017

Aos meus pais, porque sem eles não seria possível a realização deste Sonho, que é a Medicina.

Agradecimentos

Agradecer, em primeiro lugar, à Professora Doutora Graça Baltazar, pela orientação, paciência e dedicação que demonstrou durante a realização desta dissertação.

Aos meus pais, pelo carinho e acompanhamento ao longo do meu percurso universitário, que durou um pouco mais do que devia.

À Sofia pelo amor e pela ajuda, tanto nesta dissertação, como ao longo de todo curso de Medicina.

Aos meus irmãos Vasco e Filipe que, embora longe, sempre me mantiveram motivado a continuar a trabalhar para atingir os meus sonhos.

Aos meus companheiros de casa que tornaram esta estadia na Covilhã um começo para uma longa amizade.

À minha querida avozinha que, ao realizar o meu sonho, realizarei também o dela.

Aos restantes familiares e amigos que sempre permaneceram do meu lado.

Resumo

A doença de Parkinson é um transtorno crónico e progressivo do movimento. Segundo dados da Associação Europeia de Doença de Parkinson, esta doença afeta mais de 1,2 milhões de pessoas em toda a Europa e está associada a um custo anual estimado de 13,9 mil milhões de euros.

O maior fator de risco para a Doença de Parkinson é a idade. A idade média de início é de 60 anos, embora mais de uma em cada dez pessoas sejam diagnosticadas antes dos 50 anos. Esta patologia é predominantemente caracterizada por sintomas motores, mas também é acompanhada por uma ampla gama de sintomas não-motores que incluem disfunções do sistema nervoso autónomo e distúrbios comportamentais.

Atualmente, não há cura ou tratamento capaz de retardar ou interromper a progressão da doença e, embora na fase inicial o tratamento da Doença de Parkinson traga um alívio sintomático marcado, ao longo do tempo os efeitos colaterais como discinesia, comportamento impulsivo e compulsivo, alucinações e delírios podem surgir.

A Doença de Parkinson é uma doença idiopática que parece resultar de interações ambientais com fatores de predisposição genética. Até à data, os eventos iniciais subjacentes aos processos neurodegenerativos na doença não são bem compreendidos, contudo a desregulação do stress oxidativo é aceite como um dos processos precipitantes e/ou potenciadores da morte neuronal que ocorre nesta patologia. A presença de dopamina, os elevados níveis de ferro na *substantia nigra* ou a elevada suscetibilidade dos neurónios dopaminérgicos aos processos inflamatórios são exemplos de fatores geradores de stress oxidativo. Por outro lado, mutações associadas à doença em genes que codificam proteínas mitocondriais ou proteínas reconhecidas como antioxidantes são também possíveis contribuidores do stress oxidativo.

Vários marcadores oxidativos, quer do tecido cerebral, quer em tecidos periféricos de doentes de DP comprovam o estado pró-oxidativo na doença. Alguns estudos sugerem ainda que este estado oxidativo pode ser favorecido pelas terapias que visam repor a transmissão dopaminérgica como a levodopa ou os agonistas dopaminérgicos.

As evidências que mostram a relação entre elevados níveis de stress oxidativo e a Doença de Parkinson levaram vários grupos de investigação a avaliar o impacto de estratégias baseadas no uso de antioxidantes em controlar os marcadores oxidativos e em travar os sintomas da doença. A Coenzima Q10, Pioglitazona ou os Inibidores da mieloperoxidase são exemplos de compostos com atividade antioxidantes estudados neste âmbito.

O presente trabalho teve como objetivo rever a informação existente sobre a relação entre o stress oxidativo e a Doença de Parkinson e analisar os dados existentes sobre o potencial dos antioxidantes como possível estratégia terapêutica nesta patologia.

Palavras-chave

Doença de Parkinson; Stress Oxidativo; Radicais Livres; Antioxidantes; L-DOPA.

Abstract

Parkinson's disease is a chronic and progressive movement disorder. According to data from the European Parkinson's Disease Association, this disease affects more than 1.2 million people across Europe and is associated with an estimated annual cost of 13.9 billion euros.

The biggest risk factor for Parkinson's is age. The average age of onset is 60 years, although more than one in ten people are diagnosed before the age of 50. This pathology is predominantly characterized by motor symptoms but is also accompanied by a wide range of non-motor symptoms including autonomic nervous system dysfunction and behavioral disorders.

There is currently no cure or treatment capable of delaying or disrupting the disease progression. Although early treatment of Parkinson's disease brings substantial symptomatic relief, side effects such as dyskinesia, impulsive and compulsive behavior, hallucinations and delusions may arise.

Parkinson's disease is an idiopathic disease that seems to result from environmental interactions with genetic predisposition factors. To date, the initial events underlying the neurodegenerative processes in the disease are not well understood, however, the deregulation of oxidative stress is accepted as one of the precipitating processes and/or enhancers of neuronal death that occurs in this pathology. The presence of dopamine, elevated iron levels in the *substantia nigra* or the high susceptibility of dopaminergic neurons to inflammatory processes are examples of factors that generate oxidative stress. On the other hand, mutations associated with Parkinson's in genes encoding mitochondrial proteins or proteins recognized as antioxidants are also possible contributors of oxidative stress.

Several oxidative markers, both in brain and peripheral tissues of Parkinson's patients, confirm the pro-oxidative state in the disease. Some studies also suggest that this oxidative state may be further enhanced by therapies aimed at restoring dopaminergic transmission such as levodopa or dopaminergic agonists.

Evidence showing the relationship between elevated levels of oxidative stress and Parkinson's Disease has led several research groups to evaluate the impact of strategies based on the use of antioxidants in controlling oxidative markers and stopping the progression of symptoms of the disease. Q10 Coenzyme, Pioglitazone or myeloperoxidase inhibitors are examples of antioxidant compounds studied herein.

The objective of the present study was to review the existing information on the relationship between oxidative stress and Parkinson's Disease and to analyze the existing data on the potential of antioxidants as a possible therapeutic strategy in this pathology.

Keywords

Parkinson's Disease; Oxidative Stress; Free Radicals; Antioxidants; L-DOPA.

Índice

Agradecimentos	III
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
Lista de acrónimos	XII
Introdução e contextualização	1
Objetivos	3
Metodologia	4
Stress Oxidativo	5
Definição	5
Agentes oxidantes	6
Espécies Reativas de Oxigénio (ROS).....	6
Espécies intermediárias reativas de azoto (RNS)	6
Agentes antioxidantes.....	8
Peroxidação lipídica	10
8-Hidroxi guanosina	10
Outros marcadores estudados	10
Marcadores imagiológicos	11
Stress Oxidativo e doenças Neurodegenerativas	12
Stress oxidativo induzido por metais	12
Ativação da microglia	13
Stress Oxidativo e Doença de Parkinson	14
Doença de Parkinson	14
Etiologia e Patofisiologia	14
Disfunções associadas ao Stress Oxidativo na Doença de Parkinson	16
Disfunção mitocondrial	16
Toxinas ambientais	17
Excitotoxicidade	18
Metabolismo da dopamina.....	19
Ferro e Stress oxidativo.....	21
Stress oxidativo e DP familiar	22

Acumulação de α -sinucleína	22
Alterações de Stress Oxidativo no diagnóstico da Doença de Parkinson	24
Formas de tratamento atuais	26
Impacto do tratamento com L-DOPA no SO	27
Propostas de abordagens terapêuticas baseadas no controlo do SO	28
Coenzima Q10	28
Hidrogénio molecular	29
Pioglitazona	30
Inibidores da mieloperoxidase	30
MitoQ	30
Deferiprona	31
Conclusões e perspetivas futuras	32
Bibliografia	34

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema com os principais objetivos da dissertação	3
Figura 2 - Principais mecanismos de formação de ROS e posteriores modificações	7
Figura 3 - Principais fatores responsáveis pela Neurodegeneração	14
Figura 4 - Organização dos núcleos da base.....	15
Figura 5 - Resumo esquemático do mecanismo de excitotoxicidade	18
Figura 6 - Esquema simplificado do metabolismo da dopamina	19
Figura 7 - Esquema simplificado da oxidação da dopamina	20

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas da DP	1
Tabela 2 - Principais espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)	6
Tabela 3 - Principais agentes antioxidantes enzimáticos	8
Tabela 4 - Principais agentes antioxidantes não enzimáticos.....	9
Tabela 5 - Teoria da Progressão de Braak - Estádios de Braak.....	23

Lista de acrónimos

DP	Doença de Parkinson
SO	Stress Oxidativo
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNC	<i>Substantia Nigra pars compacta</i>
RNS	Espécies reativas de Azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
SOD	Superóxido Dismutase
MnSOD	Superóxido Dismutase 2
GSH	Glutationa
8-OHG	8-Hidroxi-guanosina
DHB	Dihidrobenzoato
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LB	Corpo de Lewy (<i>Lewy Body</i>)
L-DOPA	Levodopa
PET	Tomografia por emissão de Positrões (<i>Positron Emission Tomography</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
MPO	Mieloperoxidase
MitoQ	Mitoquinona
MAO	Monoamina Oxidase
MAO-B	Monoamina Oxidase tipo B
COMT	Catecol-O-Metiltransferase
CoQ10	Coenzima Q10
Água-H ₂	Água com hidrogénio molecular
RNA	Ácido Ribonucleíco
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
DFP	Deferiprona

Introdução e contextualização

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, a seguir à Doença de Alzheimer.(1) É uma patologia crónica e progressiva que se caracteriza pela perda de neurónios dopaminérgicos da *Substantia Nigra pars compacta* (SNc) e pela presença de corpos de Lewy (LB), embora estes últimos não sejam exclusivos desta doença. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas no mundo sofram de DP, sendo o sexo masculino o mais afetado.(2)

Em Portugal existem cerca de treze mil pessoas com DP, de acordo com o primeiro Estudo Epidemiológico de Avaliação da Prevalência da Doença de Parkinson, promovido pela Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson, com o apoio da Direção-Geral da Saúde. (3)

A maioria dos casos de DP ocorre de forma esporádica (cerca de 90%), outros de forma hereditária (cerca de 10%) e a sua etiologia não é ainda totalmente conhecida. A incidência da DP aumenta com a idade mas, aproximadamente 4% das pessoas com DP são diagnosticadas antes dos 50 anos.(1, 4, 5)

Clinicamente, a DP caracteriza-se por parkinsonismo - um conjunto de sintomas que inclui rigidez muscular, bradicinesia e/ou tremor de repouso. Pode ainda acompanhar-se de disfunção da marcha e hipomímia (expressão facial tipo máscara).(1, 5) Para além dos sintomas principais suprarreferidos, a DP apresenta outros sintomas motores (p.e. paragens durante a marcha, instabilidade postural) e não motores (p.e. distúrbios autonómicos, alterações sensoriais ou do sono, alterações do humor, comprometimento cognitivo e demência) como apresentado detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas da DP - Adaptado de C. Warren Olanow, Jose A. Obeso. Parkinson's Disease and other Movement Disorders In: 19th ed. Dennis L. Kasper S. L. Hauser, J. L. Jameson, Anthony S. Fauci, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo, editors. New York: Mc Graw Hill Education; 2015. p. 2609

Principais características motoras	Outras características motoras	Características não motoras
Bradicinesia	Micrografia	Anosmia
Tremor de repouso	Hipomímia	Alterações sensoriais (p.e. dor)
Instabilidade postural	Hipofonia	Alterações comportamentais do sono
	Disfagia	Distúrbios autonómicos
	<i>Freezing</i>	Hipotensão postural Distúrbios genitourinários e gastrointestinais Disfunção sexual
		Comprometimento cognitivo (p.e. demência)

Atualmente, o diagnóstico de DP é clínico e é considerado quando o doente apresenta parkinsonismo associado a tremor de repouso assimétrico e confirmado com uma resposta mantida e substancial à L-DOPA.(1)

O tratamento da DP envolve mais do que uma abordagem terapêutica medicamentosa. Para além da utilização de L-DOPA, com o objetivo de substituir a perda de dopamina, encontram-se ainda disponíveis agonistas dopaminérgicos, inibidores da Catecol-O-metiltransferase (COMT) e da monoamina oxidase (MAO). Tratamentos cirúrgicos, como a estimulação elétrica profunda são também usadas.

Aquando do diagnóstico da DP, uma percentagem considerável dos neurónios dopaminérgicos já foram perdidos (cerca de 30%, de acordo com os dados mais recentes) Biomarcadores são ferramentas que ajudam na deteção, diagnóstico, seguimento da doença e ajudam a identificar possíveis alvos terapêuticos. O desenvolvimento de marcadores sensíveis e confiáveis da fase pré-clínica ou precoces da DP, constitui grande prioridade nas pesquisas atuais. Estes permitirão a identificação de indivíduos em risco (antes dos sintomas clássicos se desenvolverem), numa fase em que as medidas neuroprotetoras poderão ter maior impacto; auxiliarão na diferenciação da DP de outras causas de parkinsonismo; permitirão um melhor conhecimento acerca da etiopatogenia e também um desenvolvimento terapêutico direcionado à patogénese da DP, otimizando as intervenções.(6) Contudo, nenhum dos potenciais biomarcadores estudados até à data cumpre todos os critérios necessários para ser considerado um marcador adequado.(7)

A etiologia da DP não é, até à data, completamente conhecida, embora existam várias teorias que a tentam explicar. A teoria do Stress Oxidativo (SO) continua a ser a mais preponderante. O SO é uma condição na qual se instala um desequilíbrio significativo entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e o nível de antioxidantes, resultando em deterioração das células pela ação dos ROS em excesso.(8) Esta teoria pode assim explicar as características principais da DP: degeneração dos neurónios dopaminérgicos da SNc, redução da dopamina estriatal e inclusões intracitoplasmáticas proteínáceas (corpos de *Lewy*), ricas na proteína α -sinucleína. Estes últimos podem localizar-se na SN, *locus coeruleus*, no córtex e *nucleus basalis*.

O SO foi assim proposto como um dos mecanismos responsáveis pela patogénese de distúrbios neurodegenerativos. Deste modo, a produção excessiva de espécies reativas com poder oxidante e/ou atividade insuficiente de antioxidantes tem sido também implicada na patogénese de outras doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doença de Huntington.(5)

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos (1) analisar os dados que mostram a relação entre as alterações de SO e o desenvolvimento da DP; (2) analisar as alterações de diferentes marcadores de SO em DP; (3) analisar o impacto das terapêuticas atuais no stress oxidativo e de que forma poderão potenciar este SO; (4) rever os dados existentes sobre o impacto de estratégias baseadas no uso de antioxidantes no controlo da DP e da sua progressão.

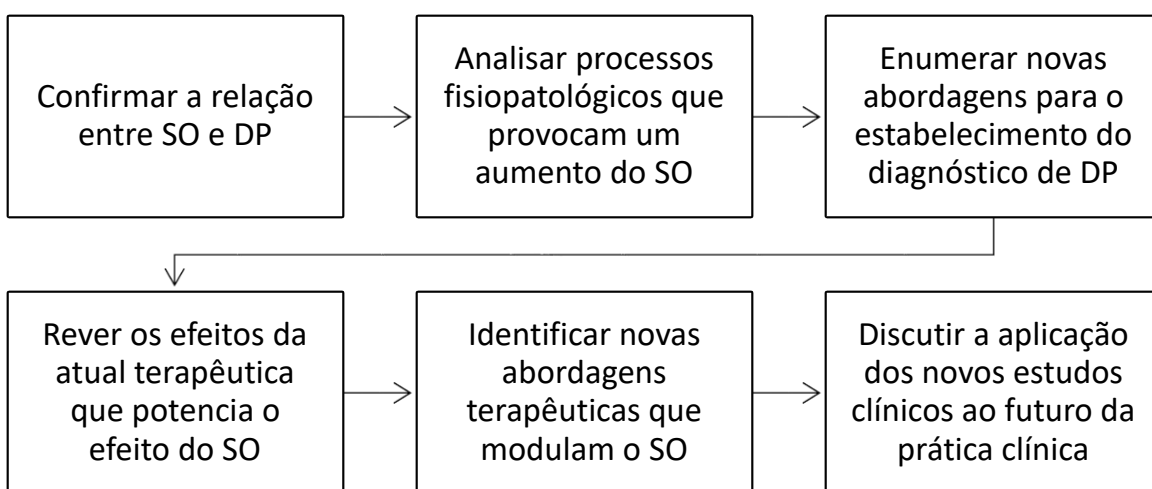


Figura 1 - Esquema com os principais objetivos da dissertação

Metodologia

A metodologia utilizada para a realização desta dissertação baseia-se numa revisão bibliográfica da informação mais atual existente sobre o tema SO e DP, na base de dados *PubMed* e em livros de referência da área da neurologia. A pesquisa bibliográfica foi realizada com os critérios de seleção linguísticos de português e inglês. Os critérios de seleção incluíram estudos originais em humanos. Os termos-chave utilizados foram “Parkinson’s disease” e “Oxidative Stress”. O mesmo processo foi empregue à pesquisa de estudos pré-clínicos. Não foi considerado critério de seleção temporal para esta pesquisa. O estudo teve início em janeiro de 2016 e a pesquisa bibliográfica foi realizada até janeiro de 2017.

Stress Oxidativo

Definição

O oxigênio é necessário para a sobrevivência e produção de energia nas células eucarióticas. É na mitocôndria que ocorre a respiração aeróbia que tem o oxigênio como aceitador de elétrons, e que num processo colateral conduz à geração do radical livre superóxido, que poderá posteriormente ser convertido noutras ROS. O metabolismo celular pode ainda produzir outros radicais livres a partir do azoto que se denominam espécies reativas de azoto (RNS).⁽⁹⁾ Existem sistemas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, cuja função é manter os níveis de ROS dentro de gamas seguras para as células.

O SO é então definido como uma condição em que há um desequilíbrio significativo entre a produção de ROS e o nível de antioxidantes, o que resulta em deterioração das células pelo excesso de ROS.^(5, 8, 9) Em concentrações fisiológicas, ROS e RNS têm funções de reguladores e são mediadores importantes. No entanto, perante o aumento descontrolado das suas concentrações, os radicais livres em excesso podem promover a peroxidação lipídica das membranas celulares; alterar proteínas estruturais e sinalizadoras, levando à agregação das mesmas e, ainda, oxidar o DNA/RNA interrompendo o processo de transcrição ou promovendo mutações genéticas. Existem também fatores exógenos que podem produzir dano oxidativo como a radiação (UV, raio-X, raio- γ), exposição a metais pesados ou poluentes atmosféricos.^(5, 9, 10) Este processo ocorre naturalmente em todas as células em condições fisiológicas, contudo, serão posteriormente descritas as condições que tornam este processo patológico.

Agentes oxidantes

Os agentes oxidantes mais frequentes são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS))

Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)

Radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais eletrões de valência livres/desemparelhados. Existem vários locais de produção de ROS e, por consequência, SO. O principal local de produção destas espécies é a mitocôndria, pois é nesta que ocorre o metabolismo aeróbico celular. Ao nível da cadeia transportadora de eletrões mitocondrial, a NADH-ubiquinona oxireductase (Complexo I) e a ubiquinol-citocromo c oxireductase (Complexo III) são responsáveis pela geração do radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Ver Figura 1.(9-11)

Existe ainda produção de ROS ao nível da membrana plasmática, citosol e retículo endoplasmático.

As moléculas reativas mais conhecidas são: o radical aniónico superóxido, o radical hidroxilo ($HO\cdot$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), como representado na Tabela 2.(5)

Espécies intermediárias reativas de azoto (RNS)

Estão incluídos neste grupo o óxido nítrico ($NO\cdot$), o anião nitroxilo (NO^-), o catião nitrosónio (NO^+) e o anião peroxinitrito ($ONOO^-$). Os seus intermediários estão envolvidos na regulação do mecanismo apoptótico e de necrose celular e daí a sua importância.(5, 9)

Tabela 2 - Principais espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)

ROS	RNS
Radical aniónico superóxido - $O_2^{\cdot-}$	Radical óxido nítrico - $NO\cdot$
Radical hidroxilo - $HO\cdot$	Radical dióxido de azoto - $NO_2\cdot$
Peróxido de hidrogénio - H_2O_2	Anião nitroxilo - NO^-
	Catião nitrosónio - NO^+
	Catião nitrilo - NO_2^+
	Anião peroxinitrito - $ONOO^-$

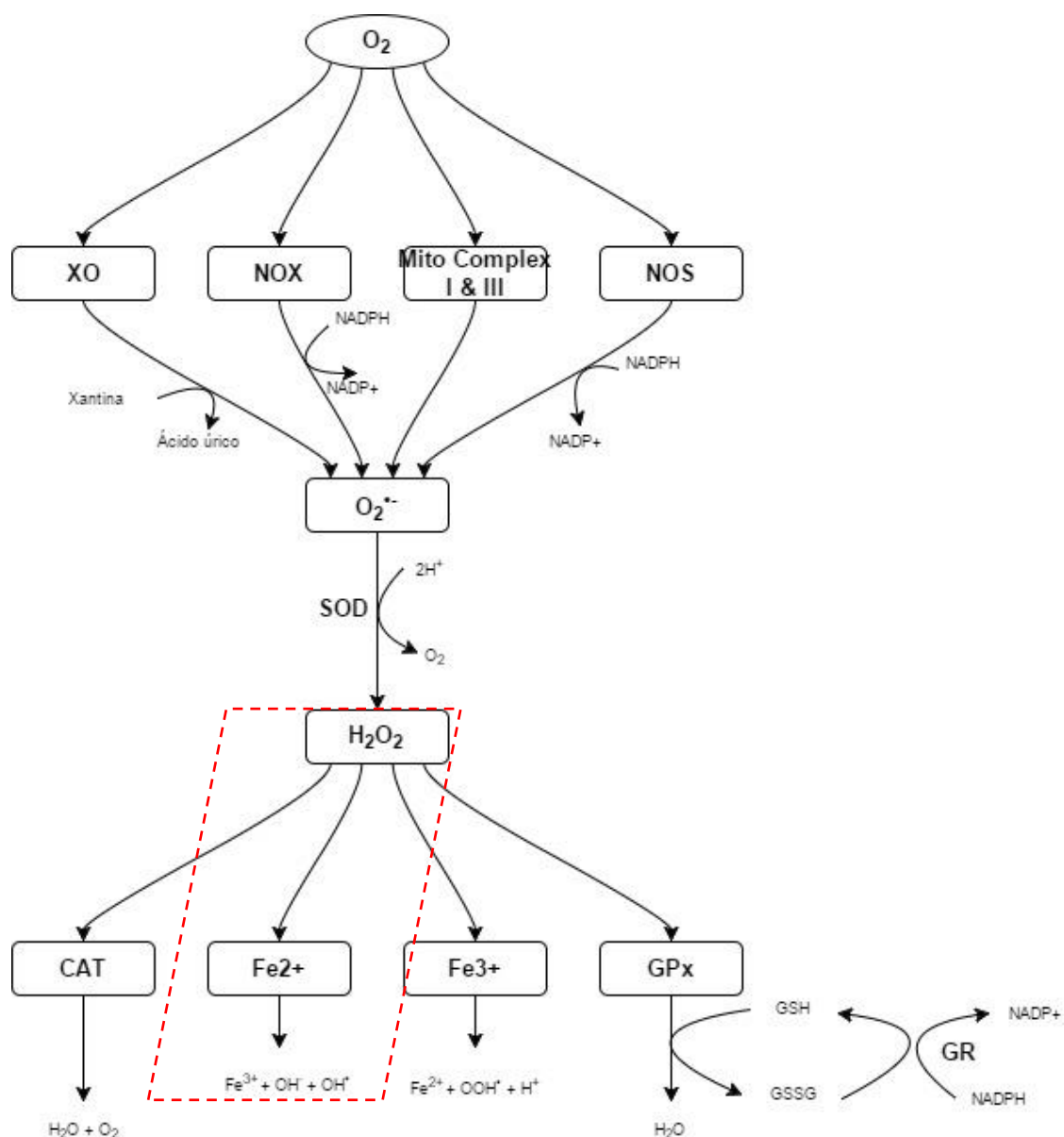


Figura 2 - Principais mecanismos de formação de ROS e posteriores modificações. Reacção de Fenton a tracejado. SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GPx - Glutaciona Peroxidase; GSH - Glutaciona; GR - Redutase da glutaciona - Adaptado de Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiology of disease*. 2015;84:4-21. Figure 2.

Agentes antioxidantes

Para contrabalançar a produção de ROS e manter o estado *redox* equilibrado, as células possuem antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

Os antioxidantes enzimáticos mais importantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a peroxidase da glutatona (GSH) e a GSH redutase (Tabela 3). Os não-enzimáticos incluem a GSH tioredoxina, vitaminas A, C e, flavenóides e proteínas, como por exemplo a albumina (Tabela 4).(5)

O ácido úrico, produto do metabolismo de purinas, é um antioxidante endógeno natural, que tem potencial para reduzir o SO. Contudo, num estudo aplicado a 30 doentes com DP, que mediu os níveis séricos de ácido úrico, apenas foi relatado que este se encontrava diminuído, quando comparado com controlos, mas sem relação significativa com parâmetros clínicos, como a escala UPDRS III ou a duração da doença. (12)

Tabela 3 - Principais agentes antioxidantes enzimáticos - Adaptado de Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Molecular neurobiology. 2015;53(6):4094-125. Table 1.

Agente	Mecanismo
Enzimáticos	
Superóxido Dismutases	Utilizam o O ₂ ^{•-} para formar H ₂ O ₂
Mn-SOD (citoplasma)	
Cu/Zn-SOD (mitocôndria)	
EC-SOD (extracelular)	
Catalases	Nos peroxissomas removem o H ₂ O ₂
Peroxiredoxinas	Reduzem o H ₂ O ₂ a água
Peroxidases da Glutaciona	Catalisam a reação de redução de H ₂ O ₂ a água
Redutases da Glutaciona	Catalisam a reação de redução da GSH
Redutases da tioredoxina	Reparação de dano oxidativo em proteínas
Metaloproteínas	
Metalotionina	Quelação fisiológica de metais (Zn, Cu, Se) e metais xenobióticos (Cd, Hg, Ag, As)
Albumina	Quelação de iões metálicos (Fe, Cu)
Ceruloplasmina	Quelação de iões metálicos (Cu)
Ferritina	Quelação de iões metálicos (Fe)
Transferrina	Quelação de iões metálicos (Fe)

Tabela 4 - Principais agentes antioxidantes não enzimáticos - Adaptado de 1. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. *Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Molecular neurobiology.* 2015;53(6):4094-125. Table 1

Não enzimáticos	
Vitamina C (ácido ascórbico)	Quelação de ROS
Vitamina E (α -tocoferol)	Quelação de ROS
Vitamina A	Quelação de ROS
Carotenóides	Quelação de ROS
Melatonina	Quelação de ROS
NADPH (Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina)	Coenzima utilizada em reações anabólicas
Adenosina	Ativador endógeno do sistema antioxidante celular
Ácido Úrico	Quelação de ROS
Ubiquinol (forma reduzida de CoQ10)	Quelação de ROS
Polifenóis	Quelação de ROS, quelação de metais, indução de enzimas antioxidantes
Ácidos fenólicos	
Flavenóides	
Estilbeno	
Glutationa reduzida	Quelação de ROS
Aminoácidos (cisteína, homocisteína, metionina, taurina)	Quelação de ROS
Ácido α -lipóico	Quelação de ROS
Licopeno	Quelação de ROS
S-adenosil-L-metionina	Quelação de ROS
Selénio	Quelação de ROS

Como mencionado, o SO resulta de um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, de tal forma que é possível identificar o SO tanto através da quantificação de agentes oxidantes (que se encontram aumentados) como de antioxidantes (que se encontram diminuídos). A presença de SO leva à produção de moléculas que podem ser utilizados como biomarcadores. De seguida, são apresentados alguns dos marcadores mais frequentemente implicados neste contexto.

Peroxidação lipídica

O ácido linoleico e o ácido araquidónico são ácidos gordos poli-insaturados que constituem a estrutura membranar dos neurónios e são alvos da oxidação. Caso o sistema antioxidante das células esteja comprometido, esta oxidação gera um ciclo de reações *redox* prejudiciais à célula que podem resultar na morte celular. A peroxidação lipídica tem assim a capacidade de alterar diretamente a estrutura membranar das células, comprometendo a sua função de barreira. Por outro lado, os produtos da peroxidação lipídica são citotóxicos e induzem um desequilíbrio *redox* nas células. Exemplos desses produtos de peroxidação são a acroleína, o 4-hidroxi-2-nonenal e o malonaldeído. A acumulação destes pode desencadear fenómenos prejudiciais à célula como alterações no sistema antioxidante, degradação proteica, interferência com a eliminação de organelos celulares (autofagia), disfunção mitocondrial ou mesmo ativação glial.(10)

8-Hidroxiuanosina

A 8-Hidroxiuanosina (8-OHG) é produzida a partir da oxidação da guanosina e é considerada um bom marcador de dano ao DNA e RNA, pelo radical hidroxilo. Foi avaliada em vários estudos e proposta como um marcador de SO sistemático e útil. Como o turnover do RNA é rápido, o nível de 8-OHG mostra o balanço oxidativo no momento do estudo.(13)

Outros marcadores estudados

Em 1999, Blandini *et al.* criaram um método simples e sensível para a quantificação de 2,3- e 2,5-dihidrobenzoato (DHB) em plaquetas humanas incubadas com salicilato de sódio, usando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de fase reversa com deteção eletroquímica. 2,3- e 2,5-DHB são produtos da reação do OH^{*} com o salicilato e, de tal forma, funcionam como marcadores da formação de ROS.(14) Para além destes, outros marcadores estudados são referidos posteriormente.

Marcadores imagiológicos

Em 2010, Ikawa *et al.*, avaliou o SO no núcleo estriado em doentes com Parkinson através da utilização de uma técnica específica de Tomografia por Emissão de Positrões (PET) com o objetivo de clarificar o papel do SO na patogénese da DP. [⁶²Cu]diacetil-bis(N⁴-metiltiosemicarbazona) é um radiofármaco que se acumula em regiões cerebrais na forma reduzida, através da redução do cobre (II) a cobre (I). Por outras palavras, este marcador, tem demonstrado a produção de SO em diferentes regiões cerebrais, na presença de lesão. Esta variante de PET permite visualizar o SO no cérebro de doentes com Parkinson, e permitiu concluir que o SO está associado à neurodegeneração no sistema nigrostriatal. (15)

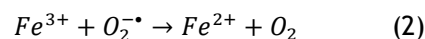
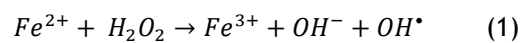
Stress Oxidativo e doenças Neurodegenerativas

A produção de SO ocorre em células de todos os tecidos, contudo, o cérebro é especialmente suscetível ao efeito nocivo do SO, devido à grande abundância de mitocôndrias, (que são o principal local de produção e ação de ROS/RNS), ao alto consumo de oxigénio, ao alto teor de ácidos gordos facilmente oxidáveis e à ação menos eficaz de enzimas antioxidantes e principalmente devido à incapacidade de replicação dos neurónios, que limita a substituição das células lesadas e regeneração do tecido nervoso.(5, 9)

O SO é um fator inerente ao processo de envelhecimento e encontra-se ainda mais elevado quando associado a doenças neurodegenerativas. Por este motivo tem sido considerado como um dos mecanismos responsáveis pela patogénese destes distúrbios. Deste modo, a produção excessiva de espécies reativas com poder oxidante e a atividade/produção insuficiente de antioxidantes tem sido implicada na patogénese de doenças neurodegenerativas, incluindo Esclerose Lateral Amiotrófica, DP, Doença de Alzheimer e Doença de Huntington.(5)

Stress oxidativo induzido por metais

Como já referido, o radical superóxido é uma das principais fontes de ROS. A partir deste podem ser produzidas outras moléculas secundárias com potencial oxidante, através de processos enzimáticos ou por reação com metais. O ferro livre pode em condições de SO ser utilizado nas reações de Fenton (1) e de Haber-Weiss (2), dando origem a um novo radical hidroxilo (HO[•]) altamente reativo.(11)



Ativação da microglia

As células da glia são um tipo de células de suporte ao funcionamento do Sistema Nervoso Central e incluem os astrócitos, oligodendrócitos e microglia. As células microgliais são mais pequenas e possuem características de macrófagos, sendo responsáveis pela remoção de células danificadas ou restos celulares. Na ausência de lesão, as células da microglia promovem a homeostasia do tecido. Contudo, há múltiplas situações que podem induzir a reatividade microglial. São exemplos a α -sinucleína (16), o envelhecimento, o trauma, toxinas, agentes inflamatórios e lesão neuronal. Quando reativa, a microglia aumenta a produção de fator de necrose tumoral *alfa*, interleucina-1-*beta*, interleucina-6, interferão-*gama*, aumenta a expressão da isoforma induzida da enzima sintase do óxido nítrico com consequente aumento da libertação de óxido nítrico, promove a fagocitose microglial e aumenta a produção de superóxido como mecanismo de defesa no processo inflamatório. Estes últimos, ao reagir, dão origem ao ONOO^- , um radical livre oxidante que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica - alterações promotoras de lesão neuronal. Este processo resulta num ciclo de *feedback* positivo que só termina quando o mecanismo é inibido ou o tecido morre. Deste modo, a ativação da microglia pode funcionar como uma consequência ou como uma causa de SO cerebral. (10, 11, 17)

Stress Oxidativo e Doença de Parkinson

Doença de Parkinson

Etiologia e Patofisiologia

A etiologia da DP não é completamente compreendida e não existe conhecimento exato acerca de todos os mecanismos presentes na doença. Não obstante, conhecem-se já alguns dos fatores implicados na morte celular como, por exemplo, as neurotoxinas ambientais, o SO, a disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade e fatores genéticos. (5, 18) Está bem estabelecido que a idade avançada e o sexo masculino tornam o indivíduo mais suscetível à DP. (2)

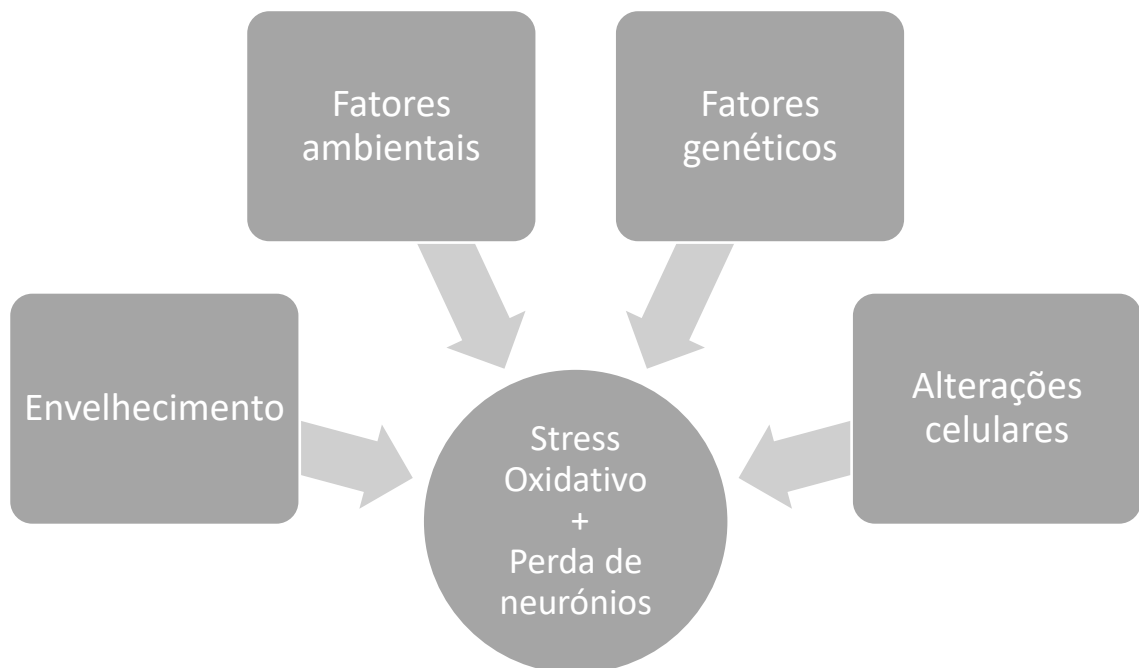


Figura 3 - Principais fatores responsáveis pela Neurodegeneração

Na patofisiologia da DP existem duas características que merecem distinção: a depleção seletiva da dopamina estriatal com degeneração de neurónios dopaminérgicos na SNc e a presença de LB, que são constituídos principalmente pela proteína α -sinucleína, nos neurónios da SN, embora a patologia não se restrinja a esta região.(19) A DP está relacionada com um excesso da produção de ROS resultantes de alterações no metabolismo das catecolaminas, de alterações na função da cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria, da deposição de ferro na SNc ou do aumento do processo neuroinflamatório associado à patologia. Este impacto, aliado à perda de função normal das células, que ocorre com o envelhecimento, torna os neurónios dopaminérgicos particularmente vulneráveis.(5)

No que diz respeito à função motora normal os circuitos dos núcleos da base são essenciais para o correto controlo do movimento. Uma série de circuitos neuronais ligam os núcleos da base às regiões corticais motoras correspondentes, de uma forma somatotópica. O

estriado é a maior região de entrada de informação, enquanto que, o segmento interno do globo pálido e a SN pars reticulata são as principais regiões de saída de informação. Ambas regiões estão conectadas pelas vias direta e indireta, as quais possuem efeitos recíprocos na atividade de saída de informação. Um decréscimo da atividade neuronal na região do segmento interno do globo pálido/SN pars reticulata parece ser um fator facilitador do movimento. Na DP, a perda de neurónios dopaminérgicos, associada à perda de tónus dopaminérgico, leva a um aumento da atividade neuronal no núcleo subtalâmico e segmento interno do globo pálido, inibição excessiva do tálamo, reduzida atividade do sistema motor cortical e ao aparecimento de características parkinsonianas - bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. Estas características major da DP manifestam-se quando se verifica uma perda de aproximadamente 30% do total de neurónios nigrais.(20) Para além das alterações motoras, a DP está também associada a alterações comportamentais, distúrbios do sono, depressão e défices cognitivos. (1, 19)

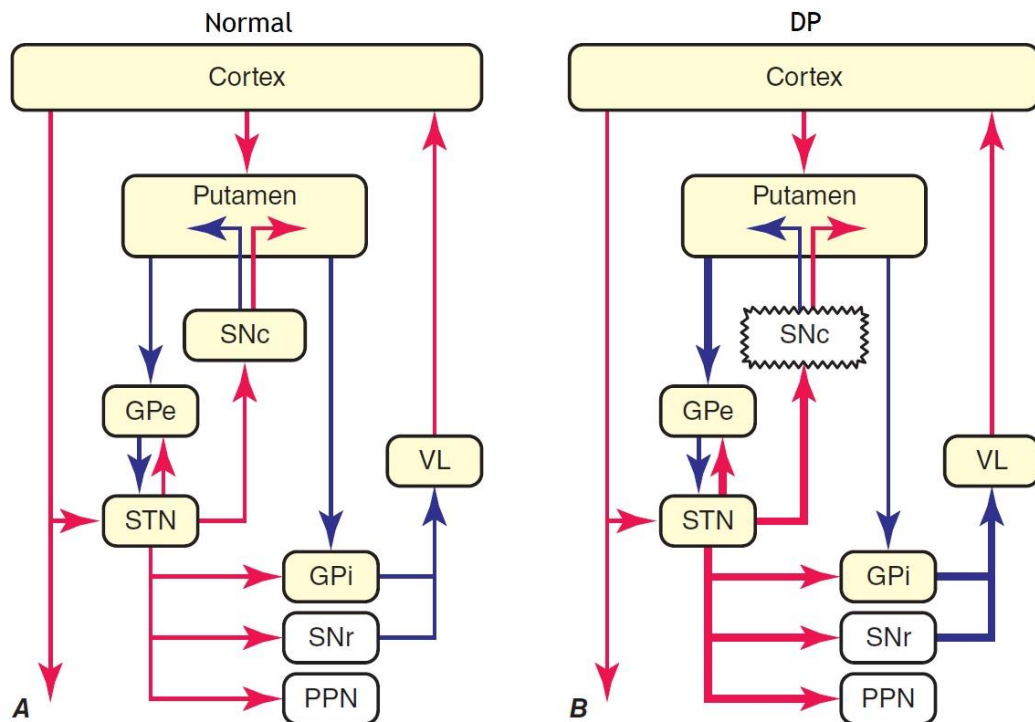


Figura 4 - Organização dos núcleos da base - Modelo clássico da organização dos núcleos da base no estado normal (A) e na Doença de Parkinson (DP) (B). As ligações inibitórias estão representadas pelas setas a azul e as excitatórias pelas setas a vermelho. GPe, segmento externo do globus pallidus; GPi, segmento interno do globus pallidus; PPN, núcleo pedúnculo-pontino; SNc, substantia nigra, pars compacta; SNr, substantia nigra, pars reticulata; STN, núcleo subtalâmico; VL, tálamo ventrolateral. Adaptado de C. Warren Olanow, Jose A. Obeso. *Parkinson's Disease and other Movement Disorders In: 19th ed. Dennis L. Kasper S. L. Hauser, J. L. Jameson, Anthony S. Fauci, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo, editors. New York: Mc Graw Hill Education; 2015. p. 2613*

Disfunções associadas ao Stress Oxidativo na Doença de Parkinson

Os fatores que condicionam o aparecimento da DP parecem todos atuar por intermédio do SO. Este pode ser originado pela disfunção mitocondrial ou ser causador da mesma culminando este processo em morte neuronal e, por sua vez, em DP. Descrevem-se, em seguida, algumas disfunções que correlacionam o SO com a DP, como a própria disfunção mitocondrial como potenciador do SO, as toxinas ambientais, a excitotoxicidade, o metabolismo da dopamina, a acumulação de ferro e de α -sinucleína e a genética familiar.

Disfunção mitocondrial

As mitocôndrias são organelos intracelulares produtores de adenosina trifosfato (ATP) pelo processo de respiração e fosforilação oxidativa. (11)

Vários estudos demonstraram que as mitocôndrias são a principal fonte de produção de energia das células, mas também de ROS como o radical superóxido. Para limitar os níveis deste radical livre a superóxido dismutase 2 (MnSOD) converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio o qual é, de seguida, processado pela enzima catalase. Contudo, na presença de iões metálicos como o Fe^{2+} , muito abundante na SN, o peróxido de hidrogénio pode ser convertido no radical hidroxilo, altamente reativo, que causa dano severo aos componentes celulares. (21, 22) Neste processo o complexo mitocondrial I é considerado a principal fonte de ROS. (21)

Assim, tudo isto sugere que a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, particularmente o Complexo I e o subsequente aumento da produção de ROS, que causa stress oxidativo, pode, direta ou indiretamente, contribuir para a patologia de DP esporádica.

Toxinas ambientais

A exposição a várias toxinas ambientais tem sido sugerida como fator de risco para o desenvolvimento da DP. Entre as toxinas incluem-se pesticidas como a rotenona ou o paraquat ou o produto secundário da síntese da droga de abuso MPPP, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

O MPTP tem efeitos neurotóxicos e foi descoberto quando um grupo de consumidores de heroína desenvolveram parkinsonismo agudo e irreversível após a utilização de drogas ilícitas por via intravenosa. Em estudos subsequentes chegou-se à conclusão que este composto atravessa a barreira hematoencefálica pelas suas características lipofílicas, sendo oxidado numa molécula tóxica, o 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP^+), através da MAO, nas células gliais. O MPP^+ é transportado para os neurónios dopaminérgicos pelo transportador da dopamina, acumulando-se na mitocôndria, onde inibe o complexo mitocondrial I da cadeia transportadora de eletrões, impedindo a produção de ATP e aumentando a produção de ROS.

A rotenona é um composto orgânico natural que é vulgarmente utilizado como pesticida em colheitas e no controlo de populações de peixes em viveiros. Este composto lipofílico é um inibidor específico do Complexo I, que atravessa a membrana hematoencefálica e é independente de qualquer recetor ou transportador. Provoca o aumento da produção de ROS e gera SO , aumentando também o risco de DP. A toxicidade da rotenona envolve dano oxidativo em proteínas, o aparecimento de sintomas motores relacionados com DP e inclusões tipo LB na SN e corpo estriado.

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) é um herbicida muito parecido estruturalmente ao MPTP, que aumenta a produção de ROS por diversos mecanismos, tendo sido vastamente estudado e associado à DP em humanos.(21)

Excitotoxicidade

O glutamato exerce um efeito tóxico sobre os neurónios dopaminérgicos da SN. As projeções glutamatérgicas para o núcleo subtalâmico tornam-se muito reativas na DP e o bloqueio farmacológico da neurotransmissão subtalâmica com antagonistas dos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA), nomeadamente a amantadina e a memantina, causa uma melhoria sintomática e ajuda a proteger os neurónios dopaminérgicos remanescentes da degeneração excitotóxica.(19) A excitotoxicidade, ou toxicidade glutamatérgica, é causada por um influxo excessivo de cálcio extracelular, em resultado da sobreativação dos recetores de glutamato do tipo NMDA. O aumento sustentado do cálcio citoplasmático ativa diversas enzimas dependentes do mesmo, como por exemplos as calpaínas, que promovem a degradação de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos, podendo gerar ROS e RNS. A ativação destas vias pode levar à apoptose e necrose celular com disfunção mitocondrial, perda de integridade membranar, alterações do citoesqueleto e formação de radicais livres derivados de NO^{\bullet} .(19, 23)

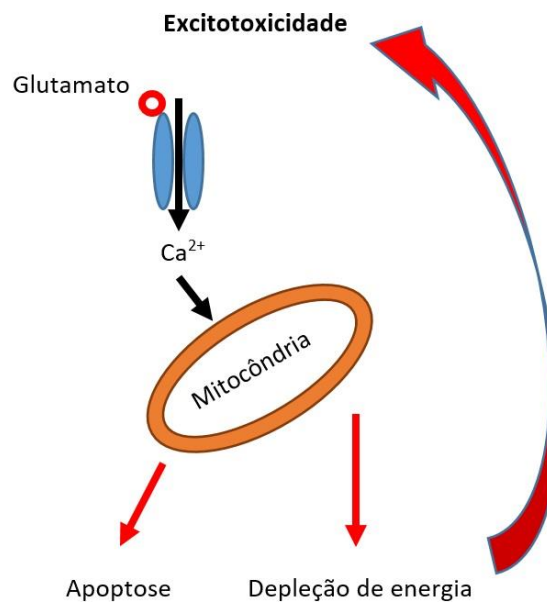


Figura 5 - Resumo esquemático do mecanismo de excitotoxicidade

Alterações do metabolismo energético na DP, resultantes da disfunção mitocondrial, podem alterar o potencial de repouso, aumentando a libertação de glutamato o que, por sua vez pode exacerbar ainda mais a ativação do recetor NMDA.

A disfunção mitocondrial pode provocar excitotoxicidade e vice-versa. Ver figura 3.(19, 24)

Metabolismo da dopamina

O metabolismo da dopamina é um tema extremamente complexo e bem estudado. Apesar de não estar incluído nos objetivos da presente revisão, explicitam-se, de seguida, alguns conceitos acerca da sua degradação e oxidação, que ajudam a compreender o efeito deste processo na patologia da DP.

Após a excitação de neurónios dopaminérgicos, o conteúdo das vesículas sinápticas é libertado para a fenda sináptica para interagir com os recetores pós-sinápticos ou, novamente com os pré-sinápticos. A dopamina extracelular é removida da fenda sináptica, para cessar a sinalização, podendo ser reciclada (reabsorvida pelos neurónios dopaminérgicos) ou degradada pelas células gliais. Nestas células é prontamente degradada pela MAO e pela COMT e, após sucessivas reações, dá origem a um dos principais produtos da degradação da dopamina, o ácido homovanílico (ver figura 5).

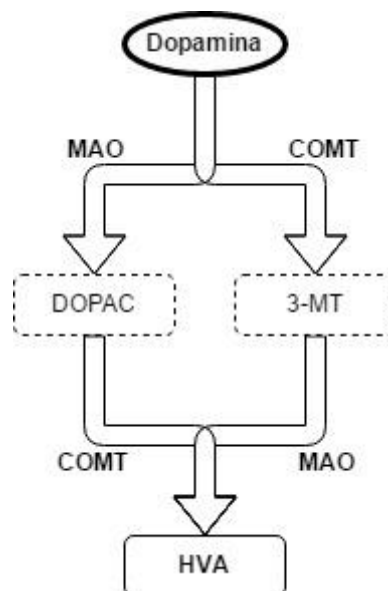


Figura 6 - Esquema simplificado do metabolismo da dopamina - MAO, monoamina oxidase; COMT, catecol-O-metiltransferase; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; 3-MT, 3-metoxitiramina; HVA, ácido homovanílico. Adaptado de Puttonen HA, Sundvik M, Rozov S, Chen YC, Panula P. Acute ethanol treatment upregulates Th1, Th2, and Hdc in larval zebrafish in stable networks. *Frontiers in neural circuits*. 2013; 7:102. Figure 8.

A oxidação do anel catecol da dopamina produz o radical livre superóxido e peróxido de hidrogénio que, como já referido, podem reagir com iões metálicos como o ferro.(19) A oxidação enzimática da dopamina, pela cicloxygenase e tirosinase, catalisada por metais (p.e. Fe^{3+}), ou até mesmo espontaneamente, resulta em ortoquinonas como a L-DOPA-quinona e a dopamina-quinona. O oxigénio é o aceitador de eletrões nestas reações, dando origem ao radical aniónico superóxido. Este dano oxidativo, compromete a função proteossómica,

nomeadamente a ubiquitinação e conseqüente degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteossoma. A oxidação da dopamina induz agregação proteica, stress do retículo endoplasmático e disfunção dos lisossomas, característicos da DP, e indutores de degeneração.(25)

Em condições de SO, a dopamina tem potencial para formar metabolitos reativos por processos enzimáticos e não-enzimáticos, que contribuem para o aumento do dano oxidativo e disfunção mitocondrial, acelerando a morte de células dopaminérgicas na DP.(25)

A perda seletiva de neurónios dopaminérgicos nigrais na DP sugere que a dopamina *per se* pode contribuir para o processo neurodegenerativo. Em comparação com outros neurónios catecolaminérgicos, esta perda está associada à presença de neuromelanina, uma vez que os neurónios que contêm este pigmento são mais afetados pela doença. A neuromelanina é produto da auto-oxidação da dopamina, num processo que também dá origem a novas ROS (ver figura 6).(19, 26)

A redução marcada dos níveis de dopamina estriatal é crucial para o desenvolvimento dos sintomas motores da doença, facto demonstrado pela resposta acentuada à terapêutica de substituição da dopamina com L-DOPA, um precursor desta.(26)

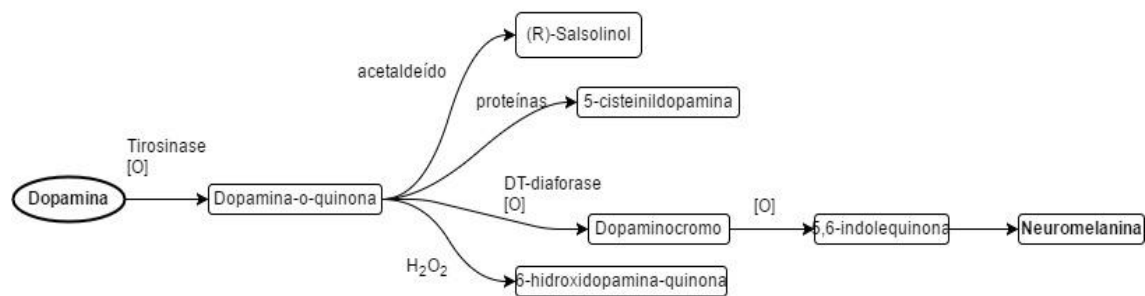


Figura 7 - Esquema simplificado da oxidação da dopamina - Adaptado de Johannes Meiser, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*. 2013;11(34) Figure 5.

Ferro e Stress oxidativo

Como referido, o ferro tem também sido implicado como um dos fatores que condiciona o desenvolvimento da doença. Análises *post mortem* de cérebros de doentes de Parkinson são indicativos desta relação.(27) A concentração de ferro na SN de ambos os hemisférios cerebrais, medida através do *phase shift value* (que reflete a concentração de ferro no tecido cerebral) em 30 doentes com DP, mostra que está significativamente aumentada, quando comparado com controlos sendo a concentração de ferro nas outras regiões cerebrais normal. (12)

Medeiros *et al.* propõem que o ferro integre o processo de SO na DP. Uma baixa concentração de ferro foi detetada no sangue de 40 doentes com Parkinson, quando comparados com um grupo de controlo. Este facto, bem como a sua acumulação na SN, foi considerado um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DP. A combinação de ROS e RNS e os níveis aumentados de ferro gera um ciclo de dano celular, neuroinflamação e produção desregulada de ROS/RNS, resultando em morte neuronal.(28)

O H_2O_2 , produzido pela mitocôndria, numa tentativa de remover o excesso de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pode, na presença de ferro, levar à produção de mais ROS, através das reações de Weiss e Fenton (ver “Stress oxidativo induzido por metais”), dando origem ao radical hidroxilo (HO^{\cdot}). (9, 22)

Stress oxidativo e DP familiar

Como já anteriormente explicado, a DP não é uma entidade clínica singular, mas um grupo heterogêneo de sinais e sintomas. Os casos hereditários de DP apresentam-se numa fase precoce da vida dos doentes. Alguns estudos demonstraram que os produtos de genes associados à DP têm efeitos importantes ao nível da função e morfologia mitocondrial (PINK1, DJ-1, LRRK2), degradação proteica (Parkin, UCHL-1), α -sinucleína (SNCA, α -SYN) e também em sistemas antioxidantes (DJ-1) (revisto em “Milestones in PD genetics”)(29-31).

Acumulação de α -sinucleína

A agregação proteica é um fenómeno molecular comum nas doenças neurodegenerativas. Os neurónios têm a capacidade de formar inclusões proteicas, compostas por fibrilas proteicas insolúveis, como resposta à agregação proteica anormal. Os agregados de α -sinucleína constituem o componente principal dos LB, que integram o diagnóstico de DP. (32) A α -sinucleína tem sido implicada na patogénese da DP, não só pela existência de formas familiares de instalação precoce, causadas por mutações no gene que a codifica (SNCA), mas também pela associação existente com a DP esporádica. (33, 34)

A doença de LB, tal como a DP, é uma α -sinucleinopatia. Este termo tem sido sujeito a alterações ao longo do tempo, no entanto, não consta nos objetivos desta dissertação, não sendo por isso abordado. (35)

Foi proposta a hipótese de que na DP os agregados de α -sinucleína surjam primordialmente no sistema nervoso autónomo, sistema olfativo e núcleo motor dorsal do nervo vago, no tronco cerebral inferior, distribuindo-se depois de maneira sequencial e previsível para o tronco cerebral superior e hemisférios cerebrais. Contudo, nem todos os doentes apresentam esta sequência de eventos durante o curso da doença. (32) Embora se observe uma grande perda de neurónios dopaminérgicos, a DP não causa perda substancial de tecido cerebral, uma vez que esta apenas afeta certas populações neuronais, incluindo a SN. (19) Como anteriormente descrito, o diagnóstico é geralmente estabelecido quando surgem os sintomas motores. Heiko Braak *et al.* criaram uma teoria para a progressão da DP com base na “transmissão” célula-a-célula dos LB e identificaram uma possível relação entre a quantidade de depósitos de α -sinucleína e o estadió da doença.

Foi assim criado um sistema de classificação que correlaciona a doença de LB e os sintomas clínicos, incluindo 6 estadios que representam as fases sintomáticas e pré-sintomáticas da doença (Tabela 5). (19)

Tabela 5 - Teoria da Progressão de Braak - Estádios de Braak

Estádio	Doença de Corpos de Lewy	Clínica
1	Doença de LB fora da SN; Sistema olfatório - défice olfativo e autonómico	Sem sintomas motores
2	Corpos e neurites de Lewy mais dispersos no bulbo raquidiano	
3	LB no tronco cerebral - depósitos de α -sinucleína no prosencéfalo basal e mais tarde SN	Primeiros sintomas de parkinsonismo
4	Perda celular evidente na SN, bem como vestígios de α -sinucleína no córtex cerebral	
5 e 6	Poucas células que contêm neuromelanina presentes na SN e α -sinucleína começa a invadir o neocórtex	Sintomas motores severos e disfunção cognitiva inicial.

Alguns estudos recentes demonstraram que agregados de α -sinucleína, com conformação incorreta, podem ser transferidos e difundidos através da sinapse, o que suporta esta teoria.

Apesar de tudo, há aspetos controversos identificados noutros estudos: alguns doentes não apresentam LB no bulbo raquidiano e os défices motores clínicos associados à DP parecem estar mais relacionados com a perda de células dopaminérgicas do que com o grau de patologia de Lewy. (19, 35)

Alterações de Stress Oxidativo no diagnóstico da Doença de Parkinson

Historicamente, o diagnóstico de DP baseava-se na presença de duas em três características parkinsonianas - tremor, rigidez e bradicinesia. Contudo, como já referimos, o diagnóstico estabelece-se quando o doente apresenta parkinsonismo associado a tremor de repouso, assimetria no comprometimento motor e uma resposta mantida e significativa a L-DOPA, de acordo com os *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Criteria* (ver anexo).(1, 36)

Em 2015, a *International Parkinson and Movement Disorder Society* estabeleceu um grupo de trabalho com o propósito de estabelecer novos critérios de diagnóstico para a doença e propôs que a DP precoce se dividisse em 3 estadios: DP pré-clínica, no início do processo de neurodegeneração, no entanto sem sinais ou sintomas clínicos presentes; DP prodrómica, que se instala quando existem sinais e/ou sintomas presentes mas estes são insuficientes para o diagnóstico da fase subsequente; DP clínica quando há critérios de diagnóstico suficientes. (37) Deste modo, é de maior interesse o estudo aprofundado dos sintomas não-motores que antecedem o diagnóstico clínico da DP, para que este seja estabelecido numa fase precoce da doença.

Estudos imagiológicos raramente são necessários mas podem ser usados para exclusão de outras patologias quando o diagnóstico é incerto, para identificar a depleção de dopamina nos neurónios nigroestriatais e também para estudos clínicos.(1)

Os testes genéticos podem também ser úteis para identificar indivíduos em risco de desenvolver a doença, mas não são utilizados na prática clínica.

Com a associação cada vez maior de sintomas pré-motores com a DP, ficou clara a necessidade de procurar marcadores sensíveis e específicos, para auxiliar o médico a estabelecer um diagnóstico correto na fase em que apenas estão presentes estes sintomas.

Num estudo realizado no âmbito de SO e a oxidação plasmática, avaliou-se a peroxidação lipídica plasmática através de espectrofluorometria em 52 doentes com Parkinson, medicados com L-DOPA. Concluiu-se que os níveis de peroxidação lipídica se encontram aumentados, sugerindo que os doentes se encontram numa forma de SO sistémico crónico, estando mais suscetíveis à peroxidação lipídica em comparação com controlos saudáveis. Os participantes deste estudo encontravam-se em diferentes estadios da doença, mas não foi provada uma relação entre a progressão da doença e a peroxidação lipídica.(38)

Um estudo clínico envolvendo 390 doentes de Parkinson analisou a relação entre a atividade da prolidase plasmática e marcadores de SO. A prolidase é uma exopeptidase citosólica que cliva imidopéptidos com prolinas ou hidroxiprolinas nos terminais carboxílicos derivados maioritariamente do metabolismo do colagénio. Proteínas ricas em prolina têm um papel essencial na mediação da apoptose e/ou servem como sinalizadoras deste mecanismo de morte celular. Os marcadores de SO utilizados foram o estado oxidante total, estado

antioxidante total (medidos espectrofotometricamente) e índice de SO (razão do primeiro sobre o segundo TOS/TAS). Os resultados obtidos mostram que os níveis de atividade da prolidase plasmática e estado antioxidante total se encontravam significativamente mais baixos nos doentes e que diminuem com a duração da doença. Por sua vez, os valores de estado oxidante total e de índice de stress oxidativo encontram-se elevados e aumentam com a duração da doença, em doentes de Parkinson, quando comparados com voluntários saudáveis. A atividade desta proteína poderá estar relacionada com a inflamação no processo de fibrose e com o SO. A diminuição da atividade da prolidase com a duração da DP, resulta num aumento da concentração de dipéptidos ricos em prolina, fenómeno que poderá levar ao aumento de sinalização apoptótica e, por fim, à perda de neurónios. Concluiu-se então que o conjunto destes fenómenos poderá ser responsável pela patogénese da DP.(2)

De modo a investigar o papel do SO e da oxidação do RNA na patogénese da DP, num estudo de Takashi *et al.* foi medida a concentração de 8-OHG no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de doentes com DP. Verificou-se que a concentração de 8-OHG no LCR de 24 doentes com DP (não tratados) triplicou, quando comparados com controlos. No entanto, o mesmo não se observou para os níveis séricos. Os níveis de 8-OHG correlacionaram-se negativamente com a duração da doença.(13)

Recentemente, em 2016, tentou-se estabelecer uma relação entre biomarcadores inflamatórios e de SO com sintomas não-motores, em doentes com DP e DP prodrómica. Define-se, neste caso, DP prodrómica como doentes que sofrem de distúrbio comportamental do sono REM idiopático. Mediu-se o score olfativo total, função autonómica, GSH reduzida, GSH, neopterinina (marcador inflamatório), malonaldeído, 8-OH₂-deoxiguanosina, 3-nitrotirosina (produto da oxidação do peroxinitrito), TNF- α e IL-1 β (produtos da ativação microglial) e UPDRS I e II. Bioquimicamente, apenas os níveis de GSH sérica foram associados com a DP. A anosmia funcional e a hipotensão ortostática foram as únicas características presentes em doentes com DP e DP prodrómica que se verificaram num reduzido número de controlos. O achado principal deste estudo foi que, em 15 doentes com DP idiopática e 11 com DP prodrómica, se registou uma redução da capacidade antioxidante sistémica quando comparado com controlos, e que esta se associa com disfunção olfativa e simpática.(39)

Formas de tratamento atuais

A L-DOPA tem sido a principal terapia para a DP, desde 1960. Geralmente é administrada em conjunto com um inibidor da descarboxilase (p.e. carbidopa, benserazida) para prevenir o seu metabolismo periférico, o que permite reduzir a dosagem administrada e, desta forma, limitar os efeitos secundários, como náuseas e vômitos. O tratamento com L-DOPA continua a ser o mais eficaz na melhoria dos sintomas da DP. Contudo, há limitações e efeitos secundários associados a esta terapêutica. Na fase aguda, os doentes podem sofrer náuseas, vômitos e hipotensão ortostática. A longo prazo, o tratamento com L-DOPA pode causar importantes complicações motoras que consistem em flutuações na resposta motora ao fármaco: períodos “on” - quando o fármaco faz efeito - e períodos “off” - quando os sintomas parkinsonianos voltam. Por vezes, podem ocorrer movimentos involuntários, conhecidos como discinesias.

Estão também disponíveis os agonistas dopaminérgicos que agem diretamente nos recetores da dopamina - não sofrem metabolismo oxidativo em metabolito ativo - ao contrário da L-DOPA. Os mais recentemente utilizados são os agonistas não ergotamínicos (p.e. pramipexol, ropinirol e rotigotina). Embora os seus efeitos não se comparem aos da L-DOPA, são utilizados em conjunto com esta para diminuir o efeito de *wearing off* (diminuição do período *on* e aumento do período *off* após a administração de L-DOPA, característico do uso prolongado da L-DOPA), sem induzir discinesia. Apresentam também alguns dos efeitos secundários semelhantes aos da L-DOPA. A pergolida faz parte do grupo dos agonistas dos recetores da dopamina e o mesilato de pergolida poderá ser uma boa opção de associação à L-DOPA, uma vez que, se verificaram níveis diminuídos de radicais livres no soro de 16 doentes com DP medicados com esta terapia combinada, quando comparados com outros 16 em monoterapia com L-DOPA. De realçar ainda que a terapia combinada aumentou a atividade da catalase sérica e evitou a depleção de GSH, em doentes com DP. Desta forma, este fármaco permite reduzir as complicações motoras associadas ao uso crónico da L-DOPA.(40)

Podem ainda ser utilizados no tratamento da DP os inibidores da MAO tipo B (MAO-B) que bloqueiam o metabolismo central da dopamina, aumentando a sua concentração ao nível da sinapse. Fazem parte deste grupo a selegilina e a rasegilina, que são relativamente seletivos. Podem ser administrados em monoterapia ou em conjunto com L-DOPA. A selegilina foi incluída e investigada no famoso trabalho “*Deprenyl and tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism*” - DATATOP - em 1991.(1, 41)

O tolcapone, o entacapone e o opicapone são inibidores da COMT e, quando combinados com L-DOPA, reduzem o período *off* e aumentam o período *on* da L-DOPA.

Para além destes, podem também ser utilizados, na prática clínica, os antagonistas dos recetores NMDA, nomeadamente a amantadina e a memantina, que tem o potencial para reduzir as complicações associadas ao uso crónico da L-DOPA, melhorando o efeito de *wearing off* e discinesias. A utilização destes fármacos tem sido limitada, pelos seus efeitos secundários, principalmente sonolência.(42)

Existem alguns novos compostos, investigados recentemente, que foram estudados pela sua capacidade de atenuar os efeitos adversos do tratamento dopaminérgico.

A carnosina, um dipéptido com capacidade de ligar ROS, assim como aldeídos insaturados formados a partir de peroxidação dos ácidos gordos das membranas celulares, demonstrou um efeito benéfico quando administrada em associação com tratamento dopaminérgico. Melhorou o *score* na escala *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) em 36 doentes com DP, os sintomas neurológicos, e restaurou os níveis de SOD, que se encontram habitualmente diminuídos nesta patologia. O efeito neuroprotetor da carnosina melhora a eficácia do tratamento dopaminérgico e diminui os seus possíveis efeitos tóxicos.(43)

Existem ainda outros tipos de terapêuticas não farmacológicas possíveis para a DP que não são abordadas nesta dissertação.(1)

O aparecimento das complicações motoras induzidas pelo tratamento com L-DOPA levou a um maior número de investigações para avaliar o efeito da mesma em relação ao SO e para maior conhecimento dos seus efeitos na DP.

Impacto do tratamento com L-DOPA no SO

Blandini *et al.* investigaram alguns marcadores periféricos de SO em doentes com DP, tendo em conta a influência da terapêutica com L-DOPA. Foram medidos os níveis de 2,3- e 2,5-DHB, Cu/Zn SOD, MnSOD, L-DOPA, 3-O-metildopa e dopamina em plaquetas incubadas em salicilato de sódio e também os níveis de L-DOPA, 3-O-metildopa e dopamina no plasma.(14) Os resultados sugerem que há um aumento na formação de OH^{*} em plaquetas de doentes com DP tratados com L-DOPA. Nestes doentes os níveis de 2,3-DHB (marcador da formação de ROS) estão correlacionados com a gravidade da doença. Os sintomas motores, avaliados pela UPDRS, mostraram-se diretamente relacionados com os níveis plasmáticos e plaquetários de L-DOPA: quanto maior a dose de L-DOPA, maior o *score* na escala UPDRS. Concluiu-se ainda que a L-DOPA aumenta a formação de radicais livres, embora não seja possível através deste estudo compreender se este efeito é citotóxico.(14, 44)

Em 2004, Fahn *et al.* tentaram determinar, sem sucesso, o efeito a longo prazo da L-DOPA na progressão da doença em doentes com DP recente. Contudo, tiveram a oportunidade de observar que a L-DOPA atrasa, a curto prazo, a progressão da DP (avaliado pela escala UPDRS, mesmo 2 semanas após interrupção do tratamento). Contudo estudos por B CIT-tomografia por emissão de fotão único mostram uma redução da expressão dos transportadores membranares de dopamina que parece indicar uma aceleração na perda dos terminais dopaminérgicos.(45)

Ainda relativamente ao efeito do tratamento com L-DOPA, Blandini *et al.* investigaram os mecanismos reguladores da apoptose, em 72 indivíduos com DP - 13 sem tratamento, 21 com L-DOPA e 38 com L-DOPA associada a um agonista dopaminérgico - através da medição da concentração da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (proteínas desta família têm um papel importante nos mecanismos anti-apoptóticos pela inibição da libertação intracelular do

citocromo c), da atividade da enzima pró-apoptótica caspase-3 e da concentração de Cu/Zn SOD, nos linfócitos. Como mencionado, a apoptose está envolvida no processo neurodegenerativo e neste estudo averiguou-se se estas modificações poderiam ser encontradas em marcadores periféricos, fora do sistema nervoso central, e qual o efeito do tratamento farmacológico dopaminérgico nesses mecanismos. Foi relatada uma atividade aumentada de caspase-3 que participa no final do processo apoptótico em linfócitos de doentes com DP (tratados e não tratados), quando comparados com controlos, sendo o grupo de doentes tratados com L-DOPA quem possui os níveis mais altos. Por outro lado, a concentração de Bcl-2 nos linfócitos de doentes com DP, tratados com L-DOPA e agonistas dopaminérgicos, encontrava-se diminuída, quando comparada com os restantes doentes não tratados e com controlos. Os doentes tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo da concentração de Cu/Zn SOD, quando comparados com os restantes grupos, incluindo controlos. Estes últimos 3 grupos apresentaram uma concentração de Cu/Zn SOD semelhante. Em conjunto estes dados sugerem um estado pró-apoptótico em doentes com DP, independente do tratamento farmacológico, com aumento da atividade da caspase-3 em todos os grupos de doentes com DP e que o tratamento com agonistas dopaminérgicos tem um papel fundamental na modulação de alguns mecanismos reguladores da apoptose. (46)

Propostas de abordagens terapêuticas baseadas no controlo do SO

Com a evidência crescente de que o SO está cada vez mais implicado na etiopatogenia da DP, vários estudos clínicos centraram-se em encontrar métodos para atrasar a progressão da doença, através da administração de compostos antioxidantes e neuroprotetores que restaurem o balanço oxidativo. Novos trabalhos de investigação tentam avaliar o efeito das novas drogas, quer nos sintomas clínicos apresentados pelos doentes com Parkinson, quer nos níveis de marcadores de SO.

Coenzima Q10

A coenzima Q10 (CoQ10), também conhecida como ubiquinona, tem sido alvo de grande número de estudos, tanto pré-clínicos, como clínicos. É um antioxidante que aumenta a atividade do Complexo I e II da cadeia transportadora de eletrões e tem sido proposta como um agente neuroprotetor contra a DP. (47) Foram medidos, em células de doentes com DP, alguns antioxidantes como GSH, CoQ10, selénio, vitamina E e ácido α -lipóico. Todos os níveis se apresentaram inalterados com exceção da CoQ10, cujo défice foi significativo em doentes com DP, o que sugere uma maior probabilidade de desenvolver alterações funcionais. Desta forma, pensa-se que a CoQ10 tem potencial como biomarcador periférico do estado antioxidante na DP. (48)

Shults *et al.* começaram por avaliar a segurança e a tolerância à CoQ10 e se esta poderia atrasar o declínio funcional na DP. Num período de 16 meses, a CoQ10 foi bem tolerada

e segura em 80 doentes com DP, com dosagens entre 300mg/dia e 1200mg/dia, sendo que a maior dosagem mostrou melhoria significativa no declínio funcional da DP, avaliado pela escala total UPDRS.(49) A suplementação com 360mg/dia de CoQ10 durante 4 semanas não demonstrou melhoria nos sintomas motores de 28 doentes com DP, em tratamento e estáveis, quando comparados com controlos.(50) De uma forma semelhante, a CoQ10 administrada em nanopartículas, numa dosagem de 300mg/dia, durante 3 meses, também não melhorou os sintomas da DP em fase intermédia (escala Hoehn and Yahr 2-3), embora tenha aumentado os níveis de CoQ10 plasmática para níveis semelhantes aos obtidos com formulações padrão de 1200mg.(51) Um estudo recente obteve resultados consistentes com o suprarreferido, utilizando 300mg/dia de ubiquinol-10 (a forma reduzida de CoQ10) durante 2 anos. Neste estudo os doentes em estadios precoces de DP diminuíram os sintomas motores, tanto na fase *on*, como na fase *off* de doentes com *wearing off*.(52)

Em 16 doentes com DP foi avaliado o efeito da administração de CoQ10, em alta dosagem (até 2400mg/dia) e, apesar da moderada melhoria nos sintomas clínicos avaliados pela escala UPDRS, a administração de uma alta dosagem de CoQ10 mostrou um possível efeito pró-oxidante. Os níveis de tocoferol plasmático, *all trans*-retinol e ácido úrico permaneceram inalterados após a suplementação com este antioxidante, sugerindo que a CoQ10 não altera as defesas antioxidantes a nível sistémico.(53)

Numa meta-análise de 2016, foram analisados 5 estudos controlados e aleatórios. Esta análise mostrou que a CoQ10 não evita a progressão da DP, nem produz benefício sintomático nos doentes. Nenhum *score*, medido nas escalas UPDRS (I,II e III) e *Schwab and England*, foi significativamente diferente entre o grupo de doentes tratados com CoQ10 e o grupo com placebo.(47)

Hidrogénio molecular

O hidrogénio molecular (H₂) revelou características antioxidantes e, depois de demonstrado que a ingestão de água com hidrogénio molecular dissolvido (água-H₂) reduz o SO e melhora as características da DP, em modelos animais, Yoritaka *et al.* investigaram os efeitos de água-H₂ em doentes com Parkinson, medicados com L-DOPA. Em 6 de 9 doentes estudados, ocorreu uma melhoria de 5 pontos na escala UPDRS ao longo de 48 semanas, durante as quais os doentes beberam 1 litro de água-H₂ por dia.(54) A água-H₂ não provocou qualquer efeito adverso e foi bem tolerada por todos os participantes do estudo. Apesar de se ter avaliado também a escala Hoehn and Yahr, no início do estudo e 48 semanas depois, esta não mostrou alterações significativas.(54) Após a confirmação destes dados numa pequena amostra, os mesmos autores iniciaram um novo projeto, ainda em desenvolvimento, com 178 doentes com DP, para confirmar se o H₂ pode realmente melhorar os sintomas da DP.(55)

Pioglitazona

A pioglitazona é um agente hipoglicemiante oral que ativa o metabolismo energético mitocondrial e as defesas antioxidantes, por aumentar a atividade da PGC-1 α , um co-ativador que regula a expressão de genes necessários à biogénese mitocondrial, para além de promover múltiplas vias antioxidantes. A pioglitazona foi estudada por Simon *et al.* com o intuito de conhecer o seu efeito na progressão da DP, através da toma de uma dose diária, durante 44 semanas. Foram também medidos alguns biomarcadores plasmáticos importantes, que participam nos mecanismos de neuroproteção, em 210 doentes com DP e em tratamento com inibidores da MAO-B, nomeadamente a selegilina e a rasagilina. Através dos resultados, não se registaram associações significativas entre os marcadores avaliados - expressão de PGC-1 α , IL-6 plasmática e 8-OHG - e a progressão da doença. Quanto ao impacto da pioglitazona nos marcadores referidos, também não se verificaram alterações significativas nos seus níveis, concluindo que a pioglitazona não altera a evolução da doença, não altera os níveis de biomarcadores no sangue e, estes últimos não se demonstraram úteis na monitorização da DP.(56)

Inibidores da mieloperoxidase

Jucaite *et al.* administraram AZD3241 - um inibidor seletivo e irreversível da mieloperoxidase (MPO) - em 18 doentes com Parkinson para verificar o seu efeito na reatividade microglial. Utilizando a técnica PET, concluiu-se que o AZD3241 poderá ter influência na neuroinflamação, através da atenuação da reatividade microglial. Embora bem tolerada e segura, futuramente será pertinente a investigação aprofundada nesta área, com amostras maiores e outros inibidores da MPO.

MitoQ

Na tentativa de desenvolver um novo fármaco que altere o curso da doença, Snow *et al.* exploraram a administração de mesilato de mitoquinona (MitoQ) em 130 doentes com Parkinson não tratados com fármacos dopaminérgicos. MitoQ é uma fórmula composta pela mitoquinona - um antioxidante que tem como alvo a mitocôndria - e o trifenílfosfónio, um catião lipofílico que está covalentemente ligado à ubiquinona e que permite que o MitoQ permeie membranas, acumulando-se no interior da mitocôndria. No final do estudo, para avaliar a possível melhoria sintomática, foi aplicada a escala UPDRS aos doentes e comparou-se com os *scores* obtidos no início do estudo, concluindo-se que o MitoQ não atrasou a progressão da DP, tendo em conta o grupo de placebos.(57)

Deferiprona

A deferiprona (DFP) é um quelante de ferro que, para além de atravessar membranas celulares, tem como alvo as mitocôndrias de células com excesso de ferro livre, que constituem os organelos mais afetados pela acumulação de ferro e conseqüente dano oxidativo mediado pelo mesmo. Pelas suas inúmeras qualidades, foi selecionada para ser estudada como uma nova abordagem terapêutica para a DP - para além de conferir uma proteção contra o SO, o ferro que é removido pela DFP pode ser doado à transferrina insaturada, evitando perdas corporais (ao contrário de outros quelantes). O estudo em questão envolveu 3 partes distintas: os efeitos farmacológicos da DFP em modelos animais de DP; efeitos farmacológicos da DFP em modelos celulares e efeitos clínicos da DFP em doentes de Parkinson. Relativamente ao estudo clínico em doentes com DP, avaliaram-se dois parâmetros essenciais: a capacidade neuromoduladora da DFP para atuar em áreas cerebrais afetadas pela acumulação do ferro (como por exemplo a SN) e a capacidade desta em retardar a progressão da patologia, pelo efeito inibitório que exerce na COMT. Os participantes com DP encontravam-se numa fase precoce da doença (nos primeiros 3 anos após ter sido estabelecido o diagnóstico) e cumpriam uma terapêutica com um agonista dopaminérgico ou uma baixa dose de L-DOPA. Foi utilizado um paradigma experimental em que um grupo iniciou o tratamento com DFP com 300mg, duas vezes ao dia, sendo a dosagem gradualmente aumentada durante 18 meses até uma dose máxima de 30mg/kg/dia (grupo precoce); o segundo grupo iniciou placebo nos primeiros 6 meses e DFP após esse período até concluir os 18 meses (grupo diferido). No final deste período, continuaram a ser seguidos durante mais 6 meses para descontinuação da terapia. Na avaliação inicial, os depósitos de ferro acumulados na SN dos doentes, medidos por ressonância magnética, encontravam-se em maior número do que em controlos. Após 6 meses de tratamento, registou-se um decréscimo significativo destes aglomerados no grupo precoce, quando comparado com o grupo diferido. Este decréscimo manteve-se até aos 12 meses de tratamento. Bioquimicamente, o tratamento com o quelante não interferiu com os níveis de ferro, cobre ou zinco, quer no plasma, quer no LCR. Ocorreu uma diminuição da oxidação enzimática e não enzimática da dopamina, pela inibição da COMT e pela ligação da DFP ao ferro livre, respetivamente. A atividade da SOD e da GSH peroxidase no LCR aumentou em doentes tratados com DFP. Apenas 3 casos de efeitos adversos ocorreram durante os primeiros 12 meses do tratamento com o mesmo. Registou-se uma melhoria significativa, com uma diminuição do *score* UPDRS durante os primeiros 6 meses, no grupo precoce, quando comparado com o grupo diferido; adicionalmente, foi observado um benefício significativo, com conseqüente melhoria nos sintomas motores, avaliados pela escala UPDRS, desde o início do estudo até ao final de 18 meses, no grupo precoce, relativamente ao outro grupo; por fim, observou-se uma persistência na melhoria dos sintomas motores, durante os últimos 6 meses de tratamento, comparando a escala UPDRS em ambos os grupos. Deste modo, a DFP preenche critérios para ser considerada um agente que altera a progressão da doença.(58)

Conclusões e perspectivas futuras

Nem todos os elementos que causam SO na DP são conhecidos. Revisões anteriores descrevem que o metabolismo da dopamina, a neuroinflamação e a disfunção mitocondrial integram a etiologia da doença.(59) Na presente dissertação identificaram-se fatores adicionais que interagem entre si e que podem contribuir para a patologia.

A perda da homeostase da dopamina (19, 25, 26), a exposição a toxinas ambientais (21), a presença de ROS e a excitotoxicidade (23, 24) são exemplos de fatores que comprometem a função mitocondrial (22), especialmente pela inibição do complexo mitocondrial I e II. A alteração da função da mitocôndria leva a uma depleção da energia celular, bem como à formação de novas ROS, culminando com a morte celular. A concentração de ferro está significativamente aumentada na SN de doentes com DP.(12) O ferro que existe na forma livre, em condições de SO pode reagir e formar novas ROS.(11) A combinação de ROS e os níveis aumentados de ferro, gera um ciclo de dano celular, neuroinflamação e produção desregulada de ROS, resultando em morte neuronal.(28) A redução marcada de neurónios dopaminérgicos, potenciada por todos os anteriores e, conseqüente depleção da dopamina estriatal, é crucial para o desenvolvimento dos sintomas motores da doença (ver figura 4).(19, 26)

A atividade da prolidase encontra-se diminuída em doentes com DP e esta correlaciona-se negativamente com a duração da doença. A diminuição da sua ação pode também estar relacionada com o processo patológico da DP.(2) Estas conclusões foram retiradas do único estudo encontrado, que correlaciona o papel desta exopeptidase com o SO e, desta forma, será necessário o estudo mais aprofundado da substância neste contexto, para melhor compreender o seu mecanismo de ação e efeitos na DP.

O SO parece ser o fator comum em todas as formas de DP, esporádica ou familiar. No caso da DP familiar, existem mutações genéticas conhecidas que têm efeitos importantes na função e morfologia mitocondrial, na degradação proteica, na agregação da α -sinucleína e também em sistemas oxidantes.(29-31) A acumulação de α -sinucleína, como componente principal dos LB, parece ser outro processo pela qual se processa a morte celular na patologia. Embora a sua função fisiológica não seja completamente compreendida (34), sabe-se que esta poderá ser responsável pela degeneração de neurónios associada aos sintomas não motores presentes na DP.(33)

Como referido, o SO resulta de um desequilíbrio significativo entre a produção de oxidantes e o nível de antioxidantes, conduzindo à deterioração das células pelo excesso de ROS. Até à data, nenhum dos biomarcadores estudados se demonstrou útil na monitorização ou diagnóstico de DP (7) mas, estudos mais recentes mediram os níveis de produtos das reações da peroxidação lipídica e da oxidação de bases azotadas em fluídos biológicos, procurando relacioná-los com o SO. Os níveis de peróxidos lipídicos encontram-se aumentados em doentes com Parkinson(38) e a concentração de 8-OHG, no LCR de doentes com DP, é três vezes maior

do que a de controlos saudáveis. Os níveis deste produto da oxidação da guanosina, correlacionam-se negativamente com a duração da doença. (13) Tal fenómeno requer confirmação através de estudos com amostras maiores, para poder ser utilizado como um marcador fidedigno. Por outro lado, a relação entre biomarcadores inflamatórios e de SO com sintomas não motores na DP, não foi ainda estabelecida. (39)

Em relação ao tratamento atual de DP, para além da utilização da L-DOPA como fármaco mais eficaz na melhoria dos sintomas motores, são utilizados agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B, inibidores da COMT e também antagonistas dos recetores NMDA, que reduzem as complicações associadas ao uso crónico da L-DOPA.(1, 40-42) Nesta dissertação, dois dos estudos analisados demonstraram que a administração crónica de L-DOPA tem um efeito nefasto nos doentes com DP. Por um lado provoca um aumento da formação de radicais livres (44) e, por outro, acelera o processo de perda da dopamina nigrostriatal nos terminais nervosos. (45) Embora sejam poucos os estudos que demonstraram este efeito prejudicial da L-DOPA, surge a crescente preocupação de que o efeito do tratamento atual da DP se torne iatrogénico.

Adicionalmente, é necessário encontrar uma terapêutica que tenha a capacidade de cessar a progressão/alterar o curso da DP. De entre as substâncias estudadas mais promissoras, destacam-se o H₂ e a DFP. A primeira, embora abordada num estudo com uma amostra pequena, revelou-se uma estratégia simples e eficaz no combate aos sintomas característicos da patologia, diminuindo o *score* dos doentes na escala UPDRS.(54) Um estudo com uma maior amostra e com mais parâmetros avaliados é necessário para demonstrar o potencial da água com H₂. O estudo da DFP foi meticulosamente estruturado e este quelante demonstrou alterar a progressão da doença, tanto pela diminuição do *score* UPDRS, como no restabelecimento dos níveis de antioxidantes (por exemplo a SOD e a GSH peroxidase no LCR). Para além disso, a sua administração mostrou-se segura e bem tolerada na maioria dos 40 doentes, tratados com agonista dopaminérgico ou L-DOPA, que integraram o estudo.(58) Este foi o primeiro estudo centrado no tratamento que tentou limitar a progressão da DP através da redução da concentração de ferro no cérebro, e não pela reposição da dopamina. No futuro será interessante aplicar o estudo a doentes não tratados, para tentar esclarecer melhor o mecanismo de atuação da DFP.

Por outro lado e, apesar de haver um maior número de estudos acerca da CoQ10 como possível tratamento da patologia, esta não evita a progressão da DP, nem produz um benefício sintomático nos doentes.(47) De igual modo, a pioglitazona e MitoQ não apresentam potencial enquanto novas terapêuticas para curar a DP. (56, 57) Não existem ainda estudos válidos e suficientes para avaliar os efeitos dos inibidores da MPO também nesta área. (60)

Em conclusão, a dissertação presente demonstra que existe, de facto, uma relação comprovada entre SO e DP, por diversos mecanismos não completamente descritos. Presentemente, surgem novas abordagens promissoras para o eficaz diagnóstico, monitorização e tratamento da patologia, que ainda se encontram em processo de investigação e confirmação de resultados propostos.

Bibliografia

1. C. Warren Olanow AHVS, Jose A. Obeso. Parkinson's Disease and Other Movement Disorders. In: Dennis L. Kasper SLH, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo, editor. Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. New York: McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC; 2015. p. 2609 - 19.
2. Verma AK, Raj J, Sharma V, Singh TB, Srivastava S, Srivastava R. Plasma Prolidase Activity and Oxidative Stress in Patients with Parkinson's Disease. *Parkinson's disease*. 2015;2015:598028.
3. Ferreira JJ, Goncalves N, Valadas A, Januario C, Silva MR, Nogueira L, et al. Prevalence of Parkinson's disease: a population-based study in Portugal. *European journal of neurology*. 2017;24(5):748-50.
4. STATISTICS ON PARKINSON'S - PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION (PDF) 2016 [cited 2016 11 Setembro 2016]. Available from: http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics.
5. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*. 2015;53(6):4094-125.
6. Wu YL, W.; Jankovic, J. Preclinical Biomarkers of Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 2011;68(1).
7. Gonçalves RPV. Identificação de biomarcadores em fluidos biológicos para o diagnóstico precoce da Doença de Parkinson: Realidade ou Utopia? [Review]: Universidade da Beira Interior; 2014.
8. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012:428010.
9. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(12):24438-75.
10. Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiology of disease*. 2015;84:4-21.
11. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010;345(1-2):91-104.
12. Tae-Hyoung Kim J-HL. Serum Uric Acid and Nigral Iron Deposition in Parkinson's Disease: A Pilot Study. *PloS one*. 2014;9(11):5.
13. Abe T, Isobe C, Murata T, Sato C, Tohgi H. Alteration of 8-hydroxyguanosine concentrations in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2003;336(2):105-8.
14. Martignoni E, Blandini F. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA. *Free radical biology & medicine*. 1999;27(3/4):428-37.
15. Ikawa M, Okazawa H, Kudo T, Kuriyama M, Fujibayashi Y, Yoneda M. Evaluation of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using [62Cu]ATSM PET. *Nuclear medicine and biology*. 2011;38(7):945-51.
16. Zhang QS, Heng Y, Yuan YH, Chen NH. Pathological alpha-synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology letters*. 2017;265:30-7.
17. Purves D AG, Fitzpatrick D, et al. *Neuroglial Cells*. 2nd ed. Sunderland (MA)2001.
18. Caviness JN. Pathophysiology of Parkinson's disease behavior - a view from the network. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2014;20:S39-S43.
19. Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease--resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(9):1791-806.
20. Grosch J, Winkler J, Kohl Z. Early Degeneration of Both Dopaminergic and Serotonergic Axons - A Common Mechanism in Parkinson's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:293.
21. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 2013;106-107:17-32.
22. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*. 2015;24(4):325-40.
23. Greenamyre JT. Glutamatergic influences on the basal ganglia. *Clinical Neuropharmacology*. 2001;24(2):65-70.

24. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology & medicine*. 2013;62:132-44.
25. Johannes Meiser, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*. 2013;11(34).
26. Jason Y. Chang L-ZL. Catecholamines inhibit microglial nitric oxide production. *Brain Research Bulletin*. 2000;52(6):525-30.
27. Graham JM, Paley MNJ, Grünewald RA, Hoggard N, Griffiths PD. Brain iron deposition in Parkinson's disease imaged using the PRIME magnetic resonance sequence. *Brain : a journal of neurology*. 2000(123):2423-31.
28. Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, Bochi GV, Baldissarelli J, Kegler A, et al. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers. *PLoS one*. 2016;11(1):e0146129.
29. Licker V, Cote M, Lobrinus JA, Rodrigo N, Kovari E, Hochstrasser DF, et al. Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease. *Journal of proteomics*. 2012;75(15):4656-67.
30. Deas E, Cremades N, Angelova PR, Ludtmann MH, Yao Z, Chen S, et al. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2016;24(7):376-91.
31. Gasser T, Hardy J, Mizuno Y. Milestones in PD genetics. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(6):1042-8.
32. Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2016;137(3):331-59.
33. Stewart T, Liu C, Gingham C, Cain KC, Auinger P, Cholerton B, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein predicts cognitive decline in Parkinson disease progression in the DATATOP cohort. *The American journal of pathology*. 2014;184(4):966-75.
34. Kalia LV, Kalia SK. alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology*. 2015;28(4):375-81.
35. Kosaka K. Latest concept of Lewy body disease. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2014;68(6):391-4.
36. Massano J. Doença de Parkinson. *Acta Médica Portuguesa*. 2011;24(4):827-34.
37. Kalia LV, Lang AE. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nature Reviews Neurology*. 2016;12(2):65-6.
38. Agil A, Duran R, Barrero F, Morales B, Arauzo M, Alba F, et al. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *Journal of the neurological sciences*. 2006;240(1-2):31-6.
39. Campolo J, De Maria R, Cozzi L, Parolini M, Bernardi S, Proserpio P, et al. Antioxidant and inflammatory biomarkers for the identification of prodromal Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2016;370:167-72.
40. Chalimoniuk M, A. S, Strosznajder JB. Pergolide mesylate, a dopaminergic receptor agonist, applied with L-DOPA enhances serum antioxidant enzyme activity in Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol*. 2004;27(5):223-9.
41. LeWitt PA, Group TPS. Deprenyl's effect at slowing progression of parkinsonian disability: the DATATOP study. The Parkinson Study Group. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1991;84(136):79-86.
42. Hallett PJ, Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2004;102(2):155-74.
43. Boldyrev A, Fedorova T, Stepanova M, Dobrotvorskaya I, Kozlova E, Boldanova N, et al. Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation research*. 2008;11(4):821-7.
44. Blandini F, Martignoni E, Ricotti R, di Jeso F, Nappi G. Determination of hydroxyl free radical formation in human platelets using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 1999(732):213-20.
45. Fahn S, Oakes D, Shoulson I. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*. 2004(351):2498-508.
46. Blandini F, Cosentino M, Mangiagalli A, Marino F, Samuele A, Rasini E, et al. Modifications of apoptosis-related protein levels in lymphocytes of patients with Parkinson's disease. The effect of dopaminergic treatment. *Journal of neural transmission*. 2004;111(8):1017-30.

47. Negida A, Menshawy A, Elfoul GEAY, Hani Y, Hegaz Y, ghonimy SE, et al. Coenzyme Q10 for Patients with Parkinson's Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *CNS & Neurological Disorders*. 2016;Drug Targets(15):45-53.
48. Mischley LK, Allen J, Bradley R. Coenzyme Q10 deficiency in patients with Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2012;318(1-2):72-5.
49. Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal F, Haas R, Plumb S, et al. Effects of coenzyme q10 in early Parkinson Disease. *Archives of neurology*. 2002;59:1541-50.
50. Müller T, Büttner T, Gholipour A-F, Kuhn W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2003;341(3):201-4.
51. Storch A, Jost WH, Vieregge P, Spiegel J, Greulich W, Durner J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Archives of neurology*. 2007;64(7):938-44.
52. Yoritaka A, Kawajiri S, Yamamoto Y, Nakahara T, Ando M, Hashimoto K, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015;21(8):911-6.
53. Seet RC, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chow AW, Chong WL, et al. Does high-dose coenzyme Q10 improve oxidative damage and clinical outcomes in Parkinson's disease? *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(2):211-7.
54. Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N. Pilot study of H(2) therapy in Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2013;28(6):836-9.
55. Yoritaka A, Abe T, Ohtsuka C, Maeda T, Hirayama M, Watanabe H, et al. A randomized double-blind multi-center trial of hydrogen water for Parkinson's disease: protocol and baseline characteristics. *BMC neurology*. 2016;16:66.
56. Simon DK, Simuni T, Elm J, Clark-Matott J, Graebner AK, Baker L, et al. Peripheral Biomarkers of Parkinson's Disease Progression and Pioglitazone Effects. *Journal of Parkinson's disease*. 2015;5(4):731-6.
57. Snow BJ, Rolfe FL, Lockhart MM, Frampton CM, O'Sullivan JD, Fung V, et al. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2010;25(11):1670-4.
58. 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. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(2):195-210.
59. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*. 2015;9:91.
60. Jucaite A, Svenningsson P, Rinne JO, Cselenyi Z, Varnas K, Johnstrom P, et al. Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: a PET study in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2015;138(Pt 9):2687-700.