

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Novos alvos terapêuticos no tratamento da  
doença de Parkinson**

**Mariana Lobo Pereira**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2020**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



# **Novos alvos terapêuticos no tratamento da doença de Parkinson**

**Mariana Lobo Pereira**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professora Auxiliar, Doutora Ana Paula Gameiro  
Francisco**

**2020**



## Resumo

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo. Caracteriza-se pela perda de função progressiva dos neurónios dopaminérgicos na porção compacta da substância negra e pela acumulação de inclusões proteicas denominadas corpos de Lewy e neurites de Lewy. Clinicamente, a doença caracteriza-se por quatro sintomas motores: bradicinesia, rigidez, tremor em repouso e instabilidade postural, associados a uma variedade de sintomas não motores que podem afetar vários sistemas orgânicos, podendo ir desde transtornos de humor até problemas de pele, como a dermatite seborreica e a hiperidrose.

As opções terapêuticas atualmente disponíveis incluem tratamento farmacológico, intervenções cirúrgicas, como a estimulação cerebral profunda, palidotomias e talamotomias ou terapêuticas não farmacológicas, como a fisioterapia. O controlo farmacológico dos sintomas motores é feito através da administração de quatro grupos de fármacos principais: levodopa ou agonistas da dopamina, inibidores da monoamina oxidase e da catecol O-metiltransferase, antagonistas não seletivos dos recetores muscarínicos de acetilcolina e antagonistas do recetor N-metil D-aspartato ativado pelo glutamato.

No entanto, todas estas opções fornecem tratamento direcionado ao controlo sintomático nos primeiros anos após o diagnóstico, tornando-se menos eficazes à medida que a doença avança. Não existem atualmente terapêuticas disponíveis que previnam o início ou abrandem a progressão da doença de Parkinson.

Esta monografia foca-se em potenciais novos alvos terapêuticos, nomeadamente a  $\alpha$ -sinucleína, a LRRK2, a PINK1 e a *parkin*, que, por terem um papel chave na sua fisiopatologia, oferecem a perspetiva do desenvolvimento de novos medicamentos que possam modificar o avanço natural da doença. Estas proteínas têm sido associadas tanto à doença de Parkinson genética quanto à sua forma não genética. Serão abordadas neste trabalho as várias estratégias terapêuticas, atualmente em estudo, que têm como alvo alguma destas quatro proteínas, incluindo alguns compostos já em fase de ensaios clínicos.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson; tratamento; alfa-sinucleína; LRRK2; *parkin*.

## Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in the world. It is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons function in the *substantia nigra pars compacta* and by the accumulation of protein inclusions called Lewy's bodies and Lewy's neurites. Clinically, the disease is characterized by four motor symptoms: bradykinesia, stiffness, tremor at rest and postural instability, associated with a variety of non-motor symptoms that can affect various organ systems, ranging from mood disorders to skin problems, such as seborrheic dermatitis and hyperhidrosis.

The current available therapeutic options include pharmacological treatment, surgical interventions, such as deep brain stimulation, pallidotomies and thalamotomies, or non-pharmacological therapies, such as physiotherapy. The pharmacological management of motor symptoms is done through the administration of four main groups of drugs: levodopa or dopamine agonists, monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase inhibitors, non-selective muscarinic acetylcholine receptor antagonists and N-methyl-D-aspartate receptor of glutamate antagonists.

However, all of these options provide treatment only for symptomatic control and are only effective in the first few years after diagnosis, becoming less effective as the disease progresses. There are currently no therapies available to prevent the onset or slow the progression of Parkinson's disease.

This monography focuses on potential new therapeutic targets, namely  $\alpha$ -synuclein, LRRK2, PINK1 and *parkin*, which, by playing a key role in their pathophysiology, offer the prospect of developing new drugs that can modify the natural course of the disease. These proteins have been associated with both familial and sporadic forms of Parkinson's disease. This monography addresses the various therapeutic strategies currently under study that target any of these four proteins, and include some compounds already in clinical trials.

**Keywords:** Parkinson's disease; therapy; alpha-synuclein; LRRK2; *parkin*.

## **Agradecimentos**

Chegando à reta final do curso de Ciências Farmacêuticas, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam durante o meu percurso e que prestaram o seu contributo para que este trabalho pudesse ser realizado.

Quero deixar um especial agradecimento à professora Ana Paula Francisco pela sua disponibilidade e atenção, pela partilha de conhecimento, e pelas valiosas contribuições que dispensou ao longo de todo o trabalho.

À minha mãe, ao Sérgio e aos meus avós, por me apoiarem, por sempre me darem força para continuar e me incentivarem a dar o melhor de mim todos os dias. Obrigada por sempre me terem proporcionado o melhor, não só em todo o meu percurso académico, mas também a nível pessoal.

À Mariana, Maria e Carolina, por caminharem ao meu lado desde o primeiro dia de faculdade, sem vocês este curso não se fazia. Obrigada por me obrigarem a ir a todas as frequências, por nunca me deixarem desistir e por darem alegria aos meus dias.

Ao Leandro, por todo o amor, dedicação paciência e apoio. Obrigada por me fazeres lembrar todos os dias o porquê de estar aqui e de querer continuar. Obrigada acreditares em mim, mesmo quando eu tenho dúvidas.

Finalmente, às minhas melhores amigas, que estão comigo desde sempre. Cada uma da sua área, mas sempre prontas a ajudar-me, apoiar-me e incentivar-me. Obrigada por me relaxarem, por todas as gargalhadas, obrigada por ouvirem todos os meus desabafos e por me ajudarem a superar as minhas inseguranças.

Devo ainda agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso na vida académica e pessoal. Um sincero muito obrigada.

## Abreviaturas

<b>4E-BP</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i>
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato
<b>B2AR</b>	Agonistas do recetor adrenérgico $\beta$ 2
<b>BHE</b>	Barreira hemato-encefálica
<b>cAbl</b>	<i>Tyrosine kinase Abelson</i>
<b>CAP</b>	Sequência de reconhecimento específica na extremidade 5' do mRNA (guanosina modificada)
<b>COMT</b>	Catecol O-metiltransferase
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DUBs</b>	Desubiquitinases
<b>eIF4E</b>	Fator de iniciação da tradução 4E
<b>eIF4G1</b>	Fator de iniciação da tradução 4G1
<b>LAMP-2A</b>	<i>Lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
<b>LRRK2</b>	Leucine-rich repeat kinase 2
<b>MAO</b>	Monoamina oxidase
<b>MPC</b>	<i>Mitochondrial pyruvate carrier</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>NAC</b>	Componente não amiloide
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>PARL</b>	<i>Presenilins-associated rhomboid-like protein</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>shRNA</b>	<i>Short hairpin RNA</i>
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>SM</b>	Sintomas motores
<b>SNM</b>	Sintomas não motores
<b>SNpc</b>	Porção compacta da substância negra
<b>UPR</b>	<i>System of unfolded protein response</i>
<b>UPS</b>	Sistema ubiquitina-proteossoma



# Índice

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Materiais e métodos	3
4. Doença de Parkinson	3
4.1. Fisiopatologia da doença	3
4.2. Sinais e sintomas da doença	5
5. Terapêuticas atuais	6
5.1. Tratamento farmacológico dos sintomas motores	6
5.2. Tratamento farmacológico de sintomas não motores	9
5.3. Tratamento cirúrgico	9
5.4. Terapêutica não farmacológica	10
6. Novos alvos terapêuticos	11
6.1. $\alpha$ -sinucleína	
6.1.1. Caracterização da $\alpha$ -sinucleína	11
6.1.2. Papel da $\alpha$ -sinucleína na fisiopatologia da doença	13
6.1.3. Estratégias terapêuticas	15
6.1.3.1. Redução da transmissão entre células	15
6.1.3.2. Redução dos níveis de $\alpha$ -sinucleína	15
6.1.3.3. Inibição da agregação	16
6.1.3.4. Imunização	18
6.1.3.5. Aumento da <i>clearance</i>	19
6.2. <i>Leucine-rich repeat kinase 2</i> (LRRK2)	
6.2.1. Caracterização da LRRK2	21
6.2.2. Papel da LRRK2 na fisiopatologia da doença	22
6.2.3. Estratégias terapêuticas	24
6.2.3.1. Inibição da atividade cinase	24

6.2.3.2. Inibição da ligação ao GTP	27
6.2.3.3. Inibição da dimerização	27
6.2.3.4. Bloqueio dos domínios de interação com proteínas	27
6.2.3.5. mRNA	28
6.3. <i>Parkin</i> e PINK1	
6.3.1. Caracterização da <i>Parkin</i> e PINK1	29
6.3.2. Papel da <i>Parkin</i> e da PINK1 na fisiopatologia da doença	30
6.3.3. Estratégias terapêuticas	31
6.3.3.1. Ativação da PINK1	31
6.3.3.2. Ativação da <i>Parkin</i>	31
6.3.3.3. Inibição da USP30	32
7. Conclusão	33
8. Bibliografia	34

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Sintomas motores da DP e respetiva definição. _____	5
<b>Tabela 2</b> - Sintomas não motores da doença de Parkinson. _____	6
<b>Tabela 3</b> - Principais terapêuticas farmacológicas disponíveis para o tratamento da doença de Parkinson em Portugal, para além da levodopa. _____	8
<b>Tabela 4</b> - Efeitos neurotóxicos da acumulação de $\alpha$ -sinucleína. _____	13
<b>Tabela 5</b> – Anticorpos direcionados à $\alpha$ -sinucleína em fase de ensaio clínicos. _____	18
<b>Tabela 6</b> - Inibidores seletivos da atividade cinase da LRRK2. _____	24

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Estrutura da $\alpha$ -sinucleína, com identificação das mutações associadas à DP e dos locais de fosforilação. _____	11
<b>Figura 2</b> - Estruturas dos compostos baicaleína (A), delphinidina (B) e 576755 (C). _____	17
<b>Figura 3</b> - Estrutura do composto CLR01. _____	17
<b>Figura 4</b> - Estrutura do composto anle138b. _____	18
<b>Figura 5</b> - Estruturas dos compostos salidroside (A), T-006 (B) e PD163916 (C). _____	20
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da estrutura da proteína LRRK2 com identificação das mutações associadas à DP. _____	22
<b>Figura 7</b> – Estrutura do composto FX2149. _____	27
<b>Figura 8</b> - Estrutura da anisomicina. _____	28
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática da tradução eucariótica dependente e independente de CAP e locais de ação dos inibidores da síntese proteica, anisomicina e 4EGI-1. _____	29
<b>Figura 10</b> - Estrutura da <i>parkin</i> . _____	30
<b>Figura 11</b> - Mutações da <i>parkin</i> associadas à DP. _____	32
<b>Figura 12</b> – Estrutura do composto MF-094. R1 = grupo ciclohexil. _____	33

## 1. Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa complexa, cuja principal característica é a morte dos neurónios dopaminérgicos da porção compacta da substância negra (SNpc). Esta é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, a seguir à doença de Alzheimer com uma prevalência que aumenta com a idade, atingindo 1-3% em indivíduos com mais de 80 anos (1).

A DP pode apresentar-se de diferentes formas, combinando sintomas motores e não-motores. Os sintomas motores mais comuns são: tremor, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. Frequentemente, os sintomas motores são acompanhados de sintomas não motores, que são muito variados e podem afetar vários sistemas orgânicos (2,3). Os critérios de diagnóstico mais recentes, indicam novos sintomas-chave para o diagnóstico da doença, como o transtorno comportamental do sono REM, hiposmia e obstipação. Estes sintomas podem anteceder o início dos sintomas motores por vários anos, permitindo um diagnóstico mais precoce da DP (2).

Apesar do constante progresso no conhecimento da etiologia da DP, atualmente apenas estão disponíveis tratamentos sintomáticos. As abordagens mais frequentemente utilizadas incluem a administração de levodopa ou agonistas da dopamina. No entanto são também utilizados inibidores da monoamina oxidase (MAO) e da catecol O-metiltransferase (COMT), antagonistas não seletivos dos recetores muscarínicos de acetilcolina e antagonistas do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) ativado pelo glutamato. Para além destes, são utilizados fármacos para o controlo dos sintomas não motores (3).

Embora a fisiopatologia da doença não esteja ainda totalmente esclarecida, a morte de neurónios da via nigro-estriatal, com origem na SNpc tem sido apontado como principal responsável pela patologia. A morte destes neurónios pode ser causada por uma combinação de mecanismos, que incluem a disfunção mitocondrial, que resulta na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), a acumulação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, denominados corpos de Lewy e a ativação do sistema imunitário inato, com libertação de citocinas e ROS, resultando em inflamação e stress oxidativo (3).

A  $\alpha$ -sinucleína, principal componente dos corpos de Lewy, é uma proteína com 14 kDa, codificada pelo gene *SNCA*, que está envolvida na regulação da ligação e fusão das vesículas sinápticas e na libertação de neurotransmissores (1). Vários estudos confirmam também o seu

envolvimento na síntese de neurotransmissores, homeostase do cálcio, função mitocondrial e regulação de genes (4). A  $\alpha$ -sinucleína tem sido associada tanto à forma hereditária da DP como à DP sem origem hereditária, uma vez que a sua agregação está associada a diversos processos neurotóxicos, tais como: desregulação autofágica, disfunção sináptica, disfunção mitocondrial, stress oxidativo e stress do retículo endoplasmático (RE). Para além de alterar os processos celulares, esta proteína é capaz de se disseminar pelas células vizinhas de uma forma priónica, formando mais agregados (1). Embora o papel que ela desempenha em cada um dos organelos celulares não seja totalmente claro, o seu *folding* proteico anormal, acumulação e agregação perturbam as funções fisiológicas destes organelos, culminando na morte celular, especialmente dos neurónios dopaminérgicos da substância negra (5). Dado o seu papel central na patologia e progressão da DP, esta proteína atende aos critérios para ser um alvo terapêutico promissor (6).

A maioria dos casos de DP não são hereditários, mas cerca de 5-10% são atribuídos a causas genéticas (7). Nas últimas duas décadas vários estudos genéticos apontam para o papel crucial de certos genes no desenvolvimento e progressão da doença de Parkinson, incluindo os genes *PARK2* e *PARK6*, que codificam as proteínas *parkin* e *PINK1*. Estas proteínas estão envolvidas em várias funções mitocondriais, incluindo o “controlo de qualidade” e também na regulação de processos de imunidade inata e adquirida (8). Numa mitocôndria funcional, a *PINK1* localiza-se na membrana externa, com uma pequena porção do seu N-terminal na membrana interna. Esta parte é clivada e fica na mitocôndria enquanto a *PINK1* é libertada e degradada (9). Quando as mitocôndrias se encontram danificadas, a membrana interna despolariza, a proteína *PINK1* não penetra a matriz mitocondrial, onde é normalmente degradada, o que faz com que se acumule na membrana externa, levando à ativação da *parkin* através de fosforilação. A *parkin* é uma ubiquitina ligase E-3 citosólica, que é responsável pela ubiquitinação de diversas proteínas, marcando-as para a mitofagia (10). Mutações nos genes que codificam ambas as proteínas causam um défice no recrutamento da *parkin* para as mitocôndrias danificadas, inibindo a mitofagia. Estas mutações são causas comuns de DP de início precoce (11).

Também mutações do gene *LRRK2* são uma das mais comuns causas de DP familiar. Este gene codifica a *LRRK2*, uma grande proteína, de 280kDa que contem vários domínios, incluindo um domínio GTPase e um domínio cinase. Esta proteína demonstrou ser responsável por catalisar a fosforilação de diversas proteínas pertencentes ao ciclo celular, autofagia, apoptose, tráfico vesicular e resposta imune. Apresenta atividade cinase aumentada nas formas

genéticas e não genéticas da DP, sugerindo que a sua inibição possa ser um alvo terapêutico para ambos os tipos de doença (9).

Para além da sua atividade cinase, vários outros mecanismos têm sido propostos para o seu mecanismo patológico na DP, incluindo a sua capacidade para atuar como proteína *scaffold*, no entanto não existe consenso sobre qual o seu papel específico na patogénese da doença. Mas a prevalência das mutações nesta proteína e a sua importância na DP tornam a LRRK2 um alvo terapêutico promissor. Existem já inibidores da sua atividade cinase, o mecanismo patológico mais amplamente estudado, em fase de ensaios clínicos (12,13).

## **2. Objetivos**

Esta monografia tem como principal objetivo a revisão bibliográfica da literatura, com enfoque na fisiopatologia da DP e nos seus potenciais novos alvos terapêuticos, nomeadamente as proteínas  $\alpha$ -sinucleína, *parkin*, PINK1 e LRRK2, que poderão dar origem a terapêuticas modeladoras da doença, inexistentes até à data.

## **3. Materiais e métodos**

A pesquisa para a realização desta monografia foi feita através da base de dados bibliográfica *PubMed*, com seleção de documentos recentes, com informação atualizada. As palavras-chave utilizadas foram: “*Parkinson disease*”, “*pathophysiology*”, “ *$\alpha$ -synuclein*”, “*PINK1*”, “*parkin*”, entre outras. A pesquisa incluiu também a procura de artigos nas referências bibliográficas dos artigos analisados, assim como outra literatura pertinente no âmbito da temática abordada.

## **4. Doença de Parkinson**

### **4.1. Fisiopatologia da doença**

A maioria dos casos de DP ocorrem na ausência de qualquer ligação genética óbvia, no entanto em casos mais raros esta doença é hereditária. Sabendo que os fenótipos motores da DP genética e não genética são idênticos, entende-se que provavelmente ambas as formas da doença partilham os mesmos mecanismos fisiopatológicos (14).

A neuropatologia da DP é caracterizada por uma deterioração seletiva de neurónios dopaminérgicos e deposição de corpos de Lewy, preferencialmente na SNpc (15). Pensa-se que a maior suscetibilidade destes neurónios à deterioração se possa dever à conjugação de três das suas características: têm fluxos de cálcio aumentados, axónios longos não mielinizados com grandes necessidades energéticas e stress oxidativo aumentado (16).

Embora a fisiopatologia da morte neuronal não esteja totalmente esclarecida, alguns estudos propõem que este é um processo multifatorial que envolve eventos moleculares ao nível dos neurónios dopaminérgicos, não dopaminérgicos e células não neuronais (3). A deterioração neuronal resulta de uma combinação de mecanismos autónomos da célula, ou seja ocorrem dentro dos neurónios em degenerescência e mecanismos não autónomos da célula, que têm origem fora destes neurónios (14).

Os mecanismos autónomos da célula envolvem principalmente a disfunção mitocondrial que resulta no aumento da produção de ROS, associada ao envelhecimento e ao desenvolvimento de várias outras doenças neurodegenerativas (3). A disfunção mitocondrial tem sido associada a mutações em vários genes associados à produção das proteínas PINK1, *parkin*, LRRK-2 e  $\alpha$ -sinucleína. Todas elas têm um papel na homeostase e funcionamento da mitocôndria e uma mutação nos genes que codificam para estas proteínas poderá contribuir para a disfunção mitocondrial (16), através de mecanismos que serão abordados com maior detalhe mais à frente.

Como já foi referido, o aumento do fluxo de cálcio nestes neurónios é um fator de maior suscetibilidade. Isto deve-se ao facto destes neurónios utilizarem canais de cálcio do tipo L para regular a sua atividade pace-maker, o que está associado a uma maior condutância de cálcio, que por sua vez origina um aumento da produção intramitocondrial de ROS (14).

Os mecanismos não autónomos de células, não têm origem nos neurónios dopaminérgicos da SNpc, envolvem interações celulares e incluem, essencialmente, a progressão neuropatológica através da disseminação da  $\alpha$ -sinucleína e os processos neuroinflamatórios (14).

O modelo mais frequentemente citado para explicar a progressão neuropatológica dos corpos e neurites de Lewy na DP não genética é o modelo de Braak. Este modelo sugere que o início da doença é marcado por lesões, como corpos de Lewy e neurites de Lewy, na medula e no bulbo olfativo (estágios 1 e 2). Esta fase está associada aos sintomas prodrómicos da DP, como distúrbio do sono REM e diminuição do olfato. Nos estágios 3 e 4 as lesões começam a

aparecer na SNpc e outras estruturas do mesencéfalo, sendo esta fase marcada pelos sintomas típicos da DP, altura em que é normalmente realizado o seu diagnóstico. Por fim, nos estágios 5 e 6, há envolvimento grave do cérebro, incluindo das áreas neocorticais, com início de declínio cognitivo e alucinações (17,18).

Os processos inflamatórios são desencadeados pelas células da microglia ativadas. A sua ativação resulta na libertação de citocinas pró-inflamatórias e de ROS, resultando em inflamação e stress oxidativo dos neurónios da SNpc. Esta resposta inflamatória pode também ser ativada pelos agregados de  $\alpha$ -sinucleína captados pelos astrócitos, por outras proteínas associadas com a DP, como o LRRK2 e pela exposição a toxinas ambientais. Também as células T CD4+ parecem estar envolvidas no processo neurodegenerativo, uma vez que a sua remoção em modelos animais levou à diminuição da morte celular (3).

#### 4.2. Sinais e sintomas da doença

A apresentação clínica da DP baseia-se em sintomas motores (SM) e não motores (SNM), apresentados em detalhe na tabela 1 e 2, respetivamente.

Os sintomas motores afetam o movimento e a capacidade de desempenhar tarefas físicas e são, essencialmente, quatro: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (18).

Os SNM da DP afetam vários sistemas orgânicos e são muito variados, podendo ir desde transtornos de humor até problemas de pele, como a dermatite seborreica e a hiperidrose. SNM podem ocorrer em todos os estágios da DP, desde os estágios prodrómicos até à doença avançada e podem estar relacionados com diferentes subtipos da DP com implicações terapêuticas e prognósticas (19). O desenvolvimento de SNM é comumente gradual e pode ocorrer anos antes do início dos SM. Estes sintomas não são específicos da DP e, por isso os pacientes normalmente não os mencionam a menos que seja especificamente perguntado. Os SNM que mais habitualmente aparecem numa fase prodrómica são: distúrbio comportamental do sono REM, perda de olfato, obstipação, disfunção urinária, hipotensão ortostática, sonolência diurna excessiva e depressão, estando associados a um maior risco de um diagnóstico subsequente de DP (18).

**Tabela 1 - Sintomas motores da DP e respetiva definição. Adaptado de (18).**

Bradicinesia	Lentidão e movimentos progressivamente mais pequenos à medida que o indivíduo repete um movimento múltiplas vezes seguidas (ex: tocar repetidamente o dedo polegar e o indicador).
--------------	--



Rigidez	Resistência involuntária ao movimento de uma articulação pelo examinador.
Tremor em repouso	Um tremor de 4 a 6 Hz de um membro totalmente em repouso, que não está presente durante o movimento.
Instabilidade postural	Perda de equilíbrio que afeta a capacidade de uma pessoa de alterar ou manter uma postura, como caminhar ou ficar em pé (tipicamente um sintoma tardio da DP).

**Tabela 2 - Sintomas não motores da doença de Parkinson. Adaptado de (18) e (19).**

Perda de olfato	Perda total ou parcial da capacidade de sentir cheiro.
Distúrbios de sono	Distúrbio comportamental do sono REM, sonolência diurna, insónias.
Disfunção do sistema nervoso autónomo	Obstipação, atraso no esvaziamento gástrico, urgência e frequência urinárias, disfunção erétil, hipotensão ortostática, variabilidade da pressão arterial.
Distúrbios psiquiátricos	Depressão, ansiedade, apatia, psicose.
Declínio cognitivo	Declínio cognitivo leve ou demência, geralmente afetando inicialmente a atenção, funções executivas e perceção.
Outros	Fadiga, hipofonia, sialorreia, dificuldade em engolir, perda de peso, perturbações da visão, dor, alterações artríticas e posturais, dermatite seborreica, hiperidrose, risco aumentado de melanoma.

## 5. Terapêuticas atuais

### 5.1. Tratamento farmacológico dos sintomas motores

O principal avanço no tratamento da DP ocorreu quando se descobriu que a deficiência de dopamina era a principal responsável pelos sintomas motores da doença. Este facto desencadeou a substituição farmacológica da dopamina, que é a base das atuais terapêuticas farmacológicas (20).

A levodopa foi o primeiro fármaco utilizado eficazmente no tratamento dos sintomas da DP e continua a ser o mais eficaz no controlo sintomático da doença (21). A levodopa é o

aminoácido aromático precursor da dopamina que, ao contrário desta, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). A levodopa é convertida em dopamina, depois de atravessar a BHE, pela DOPA descarboxilase (20). As formulações orais de levodopa são comercializadas em combinação com inibidores da DOPA descarboxilase periférica, que não penetram a BHE, como a carbidopa e a benserazida, de forma a aumentar a biodisponibilidade no SNC e reduzir os efeitos adversos periféricos (20).

No entanto, o tratamento crónico com este fármaco está associado ao desenvolvimento a longo prazo de flutuações motoras e discinesias em quase todos os doentes tratados. As flutuações motoras referem-se à modificação da sintomatologia que os pacientes com DP tratados com levodopa sofrem ao longo do dia. No extremo, podem alternar entre períodos em que não respondem à medicação (períodos off) e períodos em que respondem à medicação (períodos on) mas apresentam discinesia incapacitante. Nesses casos, pode ser impossível encontrar uma dose de levodopa que controle eficazmente os sintomas, sem induzir discinesia. As restantes classes de fármacos, referidas mais à frente, podem ser utilizadas em conjunto com a levodopa, para diminuir os períodos off, no entanto em alguns pacientes continua a não ser suficiente para controlar a sintomatologia (22).

Os medicamentos comercializados em Portugal com indicação no tratamento da doença de Parkinson agrupam-se em quatro principais classes (Tabela 3):

1. Dopaminomiméticos, com uma ação que mimetiza a ação dopamina, como a levodopa e os agonistas dopaminérgicos.
2. Inibidores enzimáticos, nomeadamente da MAO-B e da COMT, cujo mecanismo se baseia na diminuição da degradação das moléculas de dopamina, e levodopa.
3. Antagonistas da via do glutamato, antagonizam os recetores NMDA do glutamato;
4. Antagonistas da via da acetilcolina ou anticolinérgicos, que antagonizam o excesso relativo de acetilcolina nos doentes com DP (23). A acetilcolina está fortemente relacionada com a regulação dos movimentos, pensa-se que o desequilíbrio entre os níveis de acetilcolina e de dopamina possa ser responsável pelos sintomas motores da DP (3).

**Tabela 3 - Principais terapêuticas farmacológicas disponíveis para o tratamento da doença de Parkinson em Portugal, para além da levodopa. Adaptado de (21).**

Classe farmacológica		Fármacos disponíveis
Agonistas dopaminérgicos		Ropinirole libertação imediata (0,25 mg a 5 mg, TID) Ropinirole libertação prolongada (2 mg a 8 mg, QD) Pramipexole libertação imediata (0,088 mg a 0,7 mg, TID) Pramipexole libertação prolongada (0,26 mg a 3,15 mg, QD) Rotigotina (2, 4, 6, 8 mg/24h, adesivo transdérmico) Apomorfina (10 mg/mL, injeção subcutânea ou perfusão contínua)
Inibidores enzimáticos	Inibidores da MAO-B	Selegilina (5 mg, BID) Selegilina orodispersível (1,25 mg, QD) Rasagilina (1 mg, QD) Safinamida (50 a 100 mg, QD)
	Inibidores da COMT	Entacapone (200 mg, em associação com levodopa/carbidopa ou formulação isolada, TID a QID) Opicapone (50 mg, QD)
Antagonistas da via do glutamato		Amantadina (100 mg, BID a TID)
Antagonistas da via da acetilcolina		Trihexifenidilo (2 a 5 mg, TID a QID) Cloridrato de biperideno (2 a 4 mg, QD a QID)

LP: libertação prolongada; QD: uma toma/dia; BID: duas tomas/dia; TID: três tomas/dia; QID: quatro tomas/dia

## **5.2. Tratamento farmacológico de sintomas não motores**

Dos SNM mais comuns na DP destacam-se os transtornos de humor, como a depressão e a ansiedade. O seu diagnóstico pode ser difícil nestes doentes, dado que raramente são referidos pelos próprios e podem ser confundidos com outros sintomas da doença (por exemplo, expressão facial reduzida, lentidão, alterações no sono e apetite) (19). O tratamento farmacológico antidepressivo utilizado na DP inclui antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina, inibidores duplos da recaptção da serotonina e da noradrenalina, inibidores da monoamina-oxidase e agonistas da dopamina (24). No que diz respeito à ansiedade são utilizados inibidores seletivos da recaptção de serotonina, inibidores duplos da recaptção da serotonina e da noradrenalina, buspirona e benzodiazepínicos. Os benzodiazepínicos são usados criteriosamente devido aos potenciais efeitos secundários, particularmente nos doentes com DP (19).

A obstipação é um dos primeiros SNM a desenvolver-se, ainda durante a fase prodrómica, e também um dos mais comuns, manifestando-se em mais de 50% dos casos. Podem ser detectadas inclusões de  $\alpha$ -sinucleína em todo o trato gastrointestinal de pacientes com DP, até 20 anos antes do diagnóstico. Assim como em casos de obstipação com diferentes etiologias, o tratamento começa pelo aumento do aporte de fibras e líquidos. Em pacientes em que esta abordagem não é suficiente, o tratamento farmacológico pode ser feito com macrogol, lubiproston e nizatidina (25,26).

O declínio cognitivo e a demência são também SNM comuns nesta doença, manifestando-se através da perda de funções executivas, diminuição da atenção, da memória e da percepção. A Rivastigmina é o único tratamento farmacológico aprovado pela FDA, com evidência de nível A para esta situação (19).

A dor, embora muitas vezes não seja considerada um SNM da DP, afeta 68-95% dos pacientes com DP em todos os estágios. A dor, associada a esta doença, pode ser de vários tipos e ter diferentes etiologias. Uma vez que os estudos referentes ao tratamento da dor associada à DP são limitados, o tratamento deve ser baseado na etiologia da dor, sempre acompanhado pela otimização da medicação específica da doença (27).

## **5.3. Tratamento cirúrgico**

À medida que a doença progride, o tratamento farmacológico pode não ser suficiente para o controlo eficaz dos sintomas devido ao desenvolvimento de sintomas refratários aos

medicamentos, flutuações motoras e outros efeitos secundários da medicação que possam limitar a sua eficácia. Nesta situação, em pacientes cuidadosamente selecionados, o tratamento cirúrgico poderá melhorar significativamente a qualidade de vida (28).

Salvo algumas exceções, os pacientes com indicação para cirurgia são doentes com DP moderada a avançada caracterizada por sintomas responsivos à levodopa com flutuações motoras e/ou discinesia (28).

A principal contraindicação para cirurgia em pacientes com DP é a demência. No entanto, também a instabilidade postural proeminente, comum em estádios avançados da doença e quaisquer comorbilidades que possam aumentar o risco de hemorragia, o tempo de cicatrização ou a probabilidade de complicações cardiovasculares podem constituir contraindicações para este tipo de cirurgia (28).

A estimulação cerebral profunda, é o tratamento cirúrgico padrão para a DP. Esta cirurgia, comprovadamente melhora os sintomas motores e a qualidade de vida dos pacientes selecionados, comparativamente ao tratamento farmacológico isoladamente. Consiste na colocação cirúrgica precisa de elétrodos estimulantes, geralmente entre 1 e 2 mm de um alvo ideal na porção motora do núcleo subtalâmico ou globus pallidus pars interno (28).

Atualmente, as lesões cirúrgicas como palidotomias e talamotomias são também uma opção terapêutica. A talamotomia por radiocirurgia *Gamma knife* pode ser considerada para o controlo do tremor na DP (28). Esta técnica utiliza imagens pré-operatórias, obtidas por ressonância magnética e tomografia computadorizada para a elaboração de um plano cirúrgico, seguida pela aplicação de um feixe de radiação direcionada para o alvo (29). A ultrassonografia focalizada guiada por ressonância magnética é também um novo método que se mostrou promissor no tratamento dos sintomas motores. Este método baseia-se no direcionamento, através de imagens obtidas por ressonância magnética, de energia ultrassónica que é aumentada gradualmente até temperaturas de ablação no alvo. Este tipo de cirurgia apenas pode ser considerado para lesões unilaterais, uma vez que lesões bilaterais têm efeitos colaterais imprevisíveis (28).

#### **5.4. Terapêutica não farmacológica**

Vários exercícios físicos, como exercícios de equilíbrio, resistência e aeróbicos, caminhar na passarela, dança, entre outros, assim como fisioterapia demonstraram melhorar o equilíbrio, mobilidade e força muscular em doentes com DP (3).

## 6. Novos alvos terapêuticos

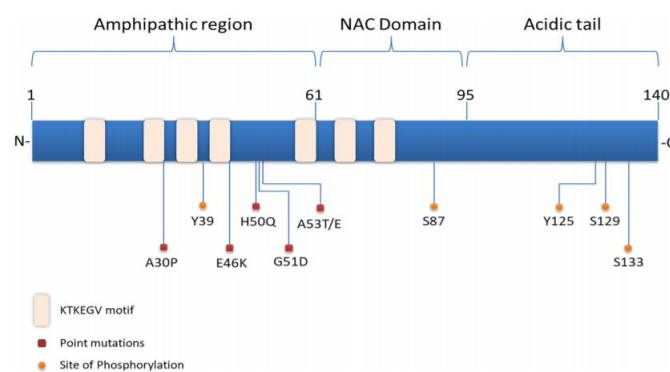
Todas as terapêuticas mencionadas até aqui fornecem tratamento paliativo direcionado ao controlo dos sintomas que podem melhorar substancialmente a qualidade de vida do doente com DP, no entanto nenhuma destas abordagens é modificadora do curso natural da doença (1).

De seguida, irei abordar potenciais novos alvos terapêuticos que, por terem um papel chave na fisiopatologia da DP, oferecem a perspetiva do desenvolvimento de novos medicamentos que possam atrasar ou mesmo interromper a progressão da doença, nomeadamente a  $\alpha$ -sinucleína, a LRRK2, a PINK1 e a *parkin*.

### 6.1. $\alpha$ -sinucleína

#### 6.1.1. Caracterização da $\alpha$ -sinucleína

A  $\alpha$ -sinucleína é uma das proteínas mais abundantes do sistema nervoso (4), é codificada pelo gene *SNCA* localizado no braço longo do cromossoma 4 nos humanos (30) e a principal de várias isoformas, como a  $\beta$  e a  $\gamma$ . A sua conformação nativa é alterada para formar oligómeros pré-fibrilares, seguindo-se a formação de agregados fibrilares. Estas são ricas em pontes beta com variadas conformações estruturais que iniciam a formação dos corpos de Lewy na DP (31). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína de 140 resíduos, que contém 3 domínios diferentes: região N-terminal (1-60), o componente não amiloide (NAC, 61-95) e a região C-terminal (96-140) (Figura 1) (32).



**Figura 1 – Estrutura da  $\alpha$ -sinucleína, com identificação das mutações associadas à DP e dos locais de fosforilação (33).**

A região N-terminal regula principalmente a formação de  $\alpha$ -hélices anfipáticas que permitem a ligação às membranas (32). Esta região contém sete repetições de 11 resíduos, muito bem conservadas, tanto entre as espécies quanto entre as três isoformas diferentes (34).

Em contraste com o domínio de ligação à membrana do terminal N, o terminal C da  $\alpha$ -sinucleína humana é polar, com uma proporção maior de resíduos carregados. Esse domínio sofre fosforilação em vários locais, sugerindo um mecanismo de regulação, mas a função do terminal C permanece incerta e é o domínio menos conservado entre as espécies. Bem como entre as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (34).

A região NAC, contém 17 resíduos hidrofóbicos de um total de 35, com alta propensão para a agregação. De facto, apesar da alta homologia de sequência entre a  $\alpha$ -sinucleína e a  $\beta$ -sinucleína, elas têm comportamentos de agregação diferentes. A  $\beta$ -sinucleína não contém uma parte da região NAC (resíduos 71-82) e quase não tem capacidade de agregação. Além disso, foi demonstrado que certas deleções ou substituições específicas, na região NAC, podem diminuir a velocidade do processo de formação de agregados ou mesmo inibi-lo (32).

A primeira mutação descoberta no gene *SNCA* que relacionou a  $\alpha$ -sinucleína com a DP foi uma alteração de um único par de bases na posição 209 de G para A, resultando numa substituição de alanina por treonina no aminoácido 53 (A53T). Desde esta descoberta várias outras mutações *missense* foram descobertas, tais como: A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A18T e A29S. Curiosamente, todas estas mutações são na região N-terminal da proteína. Também duplicações e triplicações deste gene assim como mutações na região do promotor podem estar relacionadas com o desenvolvimento da DP (30).

A  $\alpha$ -sinucleína dissemina-se entre as células de uma forma priónica. Um prion é uma proteína com *folding* anormal, que induz agregação ao interagir fisicamente com outras proteínas. Por esse processo, gera uma grande quantidade de proteínas *misfolded*, patológicas para o portador. Existe evidência de que a  $\alpha$ -sinucleína se propaga entre as várias regiões do cérebro e entre os diferentes órgãos. (35).

Esta proteína é expressa maioritariamente no tecido neuronal do sistema nervoso central e periférico. Apesar de alguma localização nuclear, a  $\alpha$ -sinucleína é principalmente uma proteína pré-sináptica (30). Esta proteína desempenha um papel importante na captação de vesículas sinápticas e na libertação de neurotransmissores, sendo que a manutenção de um equilíbrio nos níveis desta proteína garante a adequada formação do complexo SNARE, responsável pela endocitose e exocitose. (5).

### 6.1.2. Papel da $\alpha$ -sinucleína na fisiopatologia da doença

A deposição de  $\alpha$ -sinucleína nos corpos e neurites de Lewy é a marca patológica de uma série de distúrbios neurodegenerativos, incluindo a DP, demência por corpos de Lewy e atrofia multi-sistémica, coletivamente referidas como as  $\alpha$ -sinucleinopatias (36).

Esta deposição de formas patológicas de proteínas na células tem sido associada a variados efeitos neurotóxicos, como comprometimento da transmissão sináptica, disfunção mitocondrial, aumento do stress oxidativo e do stress do RE e disfunção das vias de depuração (6), descritos com mais pormenor na tabela 4.

Alguns estudos mais recentes sugerem que os corpos de Lewy podem não ser responsáveis pela patogénese da doença de Parkinson e que as espécies tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína são os oligómeros, precursores dos corpos de Lewy. Sugerindo que os corpos de Lewy se formam como um mecanismo de proteção, agindo como um reservatório para oligómeros tóxicos (37).

**Tabela 4 - Efeitos neurotóxicos da acumulação de  $\alpha$ -sinucleína.**

<b>Disfunção sináptica</b>	Os oligómeros de $\alpha$ -sinucleína ligam-se preferencialmente ao domínio N-terminal da sinaptobrevina-2, bloqueando a formação do complexo SNARE, e conseqüentemente a fusão da vesícula sináptica e a libertação de dopamina (38).
<b>Disfunção mitocondrial e stress oxidativo</b>	Embora os mecanismos moleculares deste fenómeno não sejam completamente compreendidos, pensa-se que os oligómeros de $\alpha$ -sinucleína possam aumentar a produção de ROS, através da sua interação com os elementos da cadeia transportadora de eletrões, gerando um mecanismo de <i>feedback</i> positivo em que a produção de espécies reativas de oxigénio e a agregação de $\alpha$ -sinucleína se exacerbam mutuamente (35). Os oligómeros de $\alpha$ -sinucleína podem também inibir a importação de proteínas essenciais ao funcionamento mitocondrial, através da ligação ao recetor TOM-20 (39).



	<p>Além disso, a <math>\alpha</math>-syn pode interferir na fusão e fissão da membrana mitocondrial, resultando em fragmentação das mitocôndrias, e pode inibir a mitofagia e a atividade do complexo I e interromper o potencial da membrana mitocondrial (1).</p>
<p><b>Stress do retículo endoplasmático</b></p>	<p>A principal função do RE é a síntese de lípidos e proteínas, assim como a maturação proteica, através do <i>foldings</i> e de modificações pós-traducionais. Além disso, o RE funciona como um reservatório intracelular de cálcio, que mantém um ambiente oxidativo e uma concentração adequada de cálcio livre. Para além disto, o RE também deteta quando a sua capacidade de <i>foldings</i> está afetada e há um aumento de proteínas <i>misfolded</i>, e ativa um sistema de reparação - <i>system of unfolded protein response (UPR)</i> (35).</p> <p>Quando se acumula no RE, a <math>\alpha</math>-sinucleína, por um lado interfere no <i>foldings</i> proteico, e por outro aumenta o fluxo de cálcio para o citosol, ativando um mecanismo de <i>feedback</i> positivo que aumenta a agregação de <math>\alpha</math>-sinucleína e a quantidade de ROS produzidas pela mitocôndria ao tentar repor os níveis de cálcio citosólico.</p> <p>Além disto, quando há ativação da UPR, provocada por stress no RE, há também um conseqüente aumento da produção de ROS (1).</p>
<p><b>Disfunção das vias de depuração</b></p>	<p>A sobreexpressão de <math>\alpha</math>-sinucleína interrompe a autofagia, processo envolvido na degradação de organelos danificados, microorganismos invasores e agregados proteicos. O comprometimento dos processos autofágicos resulta numa maior acumulação de <math>\alpha</math>-sinucleína e na sua propagação de forma priónica, potenciando ainda mais a sua toxicidade celular (1).</p>

### 6.1.3. Estratégias terapêuticas

#### 6.1.3.1. Redução da transmissão entre células

Uma das possíveis estratégias para diminuir a patogeneicidade da  $\alpha$ -sinucleína é restringir a sua propagação entre células. Um dos recetores mais relevantes para a transmissão célula-a-célula da  $\alpha$ -sinucleína é o LAG3, cujo bloqueio através de anticorpos (C9B7W e 410C9) demonstrou reduzir a toxicidade dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína (1,40).

Outro estudo de Holmes et al., 2013 propôs que os proteoglicanos de sulfato de heparano possam mediar a captação endocítica de agregados de  $\alpha$ -sinucleína pelo que a disrupção destes proteoglicanos poderá diminuir também a transmissão desta proteína entre células (1,41). Os proteoglicanos são glicoproteínas que contêm uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados, que se encontram na superfície celular e na matriz extracelular de todas as células animais. Os glicosaminoglicanos, em particular o sulfato de heparano, interagem com proteínas amiloides através da interação entre os grupos carregados negativamente das suas cadeias com os aminoácidos carregados positivamente na proteína amiloide. Estas glicoproteínas são responsáveis pela internalização de  $\alpha$ -sinucleína na forma de fibrilas amiloides em células neuronais (42).

#### 6.1.3.2. Redução dos níveis de $\alpha$ -sinucleína

Como já referido, a sobreexpressão desta proteína tem efeitos neurotóxicos, sendo que esta toxicidade pode ser proporcional aos seus níveis de sobreexpressão em pacientes com cópias adicionais deste gene. Por esse motivo, silenciar o gene *SNCA* ou normalizar os seus níveis de expressão tem sido uma estratégia muito explorada como uma possível abordagem terapêutica para a DP (6,43) .

No entanto, uma das limitações deste tipo de abordagem, é que devido à função fisiológica da  $\alpha$ -sinucleína na transmissão sináptica, a redução dos seus níveis poderá ter um impacto negativo, contribuindo, no limite, para a neurodegeneração. Sendo por isso essencial, a determinação do grau de redução necessário para que não haja efeitos adversos (1).

Como exemplo destes efeitos, num estudo realizado em macacos da espécie *Chlorocebus sabaues* , a redução dos níveis de  $\alpha$ -sinucleína, através da injeção de shRNA (*short hairpin RNA*) direcionado a esta proteína, reproduziu o padrão de degeneração neuronal observado na DP (44).

Para tentar contornar este desafio, vários estudos foram efetuados, obtendo-se resultados promissores quando se silencia apenas parcialmente o gene *SNCA*. Um grupo de investigadores

estabeleceram um novo procedimento, utilizando siRNA (*small interfering RNA*), denominado *expression-control RNAi*, que conferia um nível moderado de silenciamento, reduzindo a expressão de RNA para níveis fisiológicos. Este tipo de silenciamento foi eficiente a melhorar os sintomas motores num modelo de DP em *Drosophila* com o gene *SNCA* humano (45).

Outro estudo, com shRNA desenhado apenas para a parte do mRNA da alfa-sinucleína, que demonstrou mínima homologia com a  $\beta$  e a  $\gamma$ -sinucleína, conseguiu uma redução de 35% nos níveis de proteína e demonstrou resultados neuroprotetores num modelo de DP induzido por rotenona (46).

Uma abordagem alternativa a interferir com o processo de tradução, para reduzir os níveis de  $\alpha$ -sinucleína, é diminuir a transcrição do gene *SNCA*. Um estudo de 2017 descobriu que os agonistas do recetor adrenérgico  $\beta_2$  (B2AR), como o salbutamol, poderiam reduzir a expressão deste gene, modulando a sua transcrição através da alteração da atividade da histona desacetilase nas regiões promotoras e potenciadoras do *SNCA*, e descobriram que essas modificações tinham efeitos neuroprotetores em linhagens celulares derivadas de um paciente portador da triplicação do gene *SNCA* e em modelos de DP em roedores. Consistentemente com este resultado, a utilização de salbutamol como terapêutica habitual, foi associado a um menor risco de vir a desenvolver DP, tornando o recetor B2AR um potencial alvo terapêutico (47).

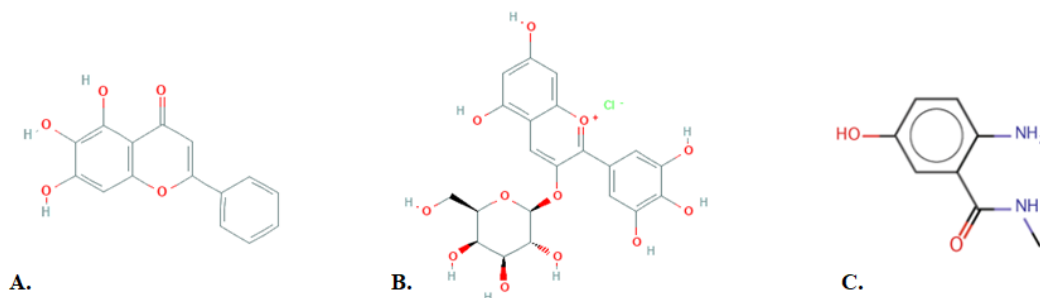
#### 6.1.3.3. Inibição da agregação

Dado que a toxicidade da  $\alpha$ -sinucleína está associada à sua agregação, a inibição deste fenómeno é também uma intervenção terapêutica possível (1).

Uma possível abordagem é a utilização de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins-HSP*) que atuam como chaperones moleculares, ajudando as novas cadeias polipeptídicas a fazerem o *folding* correto, contribuindo assim para prevenir fenómenos de agregação (1).

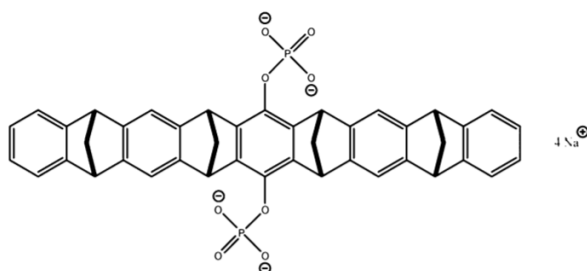
Outra possível abordagem é a utilização de pequenas moléculas, capazes de interagir com a  $\alpha$ -sinucleína, modificando a sua capacidade de se agregar, diminuindo a sua toxicidade. Várias pequenas moléculas foram descobertas ou desenvolvidas para interagirem diretamente com esta proteína, incluindo baicaleína, delfinidina, cloridrato de dopamina, galocatequina, metiltionínio, NPT100-18, NPT200-11 e composto 576755 (Figura 2). Estas moléculas

demonstraram fortes propriedades inibitórias da formação de oligômeros tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína (1,48,49).



**Figura 2 - Estruturas dos compostos baicaleína (A), delphinidina (B) e 576755 (49–51).**

Os *tweezers* moleculares são moléculas que inibem interações importantes, ligando-se a resíduos de aminoácidos com carga positiva e interrompendo as interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Um exemplo de *tweezer* molecular, é a molécula CLR01 (Figura 3), que demonstrou inibir o processo de agregação de  $\alpha$ -sinucleína através da ligação a resíduos de lisina (6).



**Figura 3 - Estrutura do composto CLR01 (52).**

O composto anle138b (Figura 4), atualmente na primeira fase de ensaios clínicos (Clinicaltrials.gov, NCT04208152), demonstrou inibir fortemente a formação de oligômeros patológicos de  $\alpha$ -sinucleína *in vivo* e *in vitro*, sem se ligar à sua forma monomérica. Este composto diminuiu a acumulação de oligômeros, a degeneração neuronal e a progressão da doença em três modelos de DP diferentes em ratos, com excelente biodisponibilidade e penetração da BHE e sem toxicidade detetável em doses terapêuticas (53).

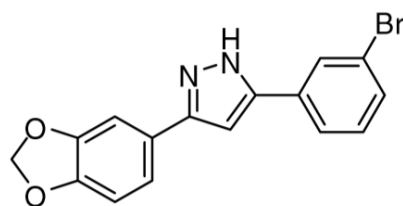


Figura 4 - Estrutura do composto anle138b (48).

#### 6.1.3.4. Imunização

Vários estudos demonstraram que a imunização, tanto ativa como passiva, contra a  $\alpha$ -sinucleína tem efeitos neuroprotetores em alguns modelos de DP (1).

A imunização passiva baseia-se na utilização de anticorpos direcionados a determinada região da proteína, com o objetivo de reduzir a sua acumulação e propagação. Vários anticorpos direcionados às regiões C-terminal e N-terminal da  $\alpha$ -sinucleína demonstraram diminuir a sua agregação, com efeitos neuroprotetores (6). Na tabela 5 encontram-se descritos os anticorpos em fase de ensaios clínicos.

**Tabela 5 – Anticorpos direcionados à  $\alpha$ -sinucleína em fase de ensaio clínicos.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fase de ensaios clínicos</b>	<b>NCT</b>
LU AF82422	Anticorpo IgG1 monoclonal humanizado direcionado à região C-terminal da $\alpha$ -sinucleína.	Fase 1	NCT03611569
MEDI1341	Anticorpo monoclonal direcionado à região C-terminal da $\alpha$ -sinucleína.	Fase 1	NCT04449484 NCT03272165
BIIb054	Anticorpo monoclonal humanizado, direcionado para a região N-terminal. Demonstrou ter grande especificidade para as formas patológicas de $\alpha$ -sinucleína e efeitos terapêuticos benéficos em 3 modelos de DP em rato. Na fase 1 de ensaios clínicos foi	Fase 2	NCT03318523 NCT0371657

	geralmente bem tolerado em doses até 90 mg / kg (54,55).		
PRX002	Anticorpo monoclonal IgG1 humanizado, direcionado à região C-terminal. Demonstrou ser seguro e bem tolerado em em todas as doses (56).	Fase 2	<i>NCT03100149</i>

NCT – Número identificador do ensaio clínico em [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

O grande peso molecular dos anticorpos pode ser um problema para a viabilidade do seu potencial terapêutico na DP uma vez que a BHE impede a sua passagem para o SNC. Portanto, uma interessante linha de pesquisa é a de anticorpos geneticamente manipulados, intracorporos ou nanocorporos, que expressam as regiões de especificidade dos anticorpos, separadas do anticorpo completo (1).

Em relação à imunização ativa, em 2005 foi feito o primeiro estudo, em ratos, que demonstrou que os anticorpos produzidos, após imunização eram capazes de diminuir a acumulação de  $\alpha$ -sinucleína nos neurónios e a neurodegeneração (57).

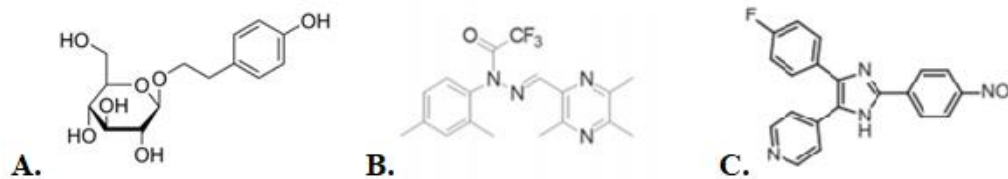
Outros estudos tentaram imunizações ativas usando pequenos fragmentos peptídicos sintéticos de  $\alpha$ -sinucleína, denominados *affitopes*, que são capazes de provocar uma resposta dos linfócitos B sem ativar os linfócitos T. Os *affitopes* PD01 e PD03 demonstraram ser seguros e bem tolerados em ensaios clínicos de fase 1 (1,6).

#### 6.1.3.5. Aumento da clearance

A *clearance* de  $\alpha$ -sinucleína é feita através de duas vias celulares: o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) e a via autofágica lisossomal. A via UPS é responsável pela degradação de proteínas de vida curta, danificadas ou com um *foldings* incorreto. Envolve a etapa de ubiquitinação seguida de uma proteólise. A via autofágica lisossomal é responsável pela eliminação de agregados proteicos ou organelos danificados e inclui a autofagia não seletiva e a autofagia mediada por chaperones (6).

A inibição do sistema UPS mostrou aumentar a quantidade de agregados  $\alpha$ -sinucleína positivos para ubiquitina, confirmando a importância da deficiência deste sistema na acumulação de  $\alpha$ -sinucleína. Vários compostos demonstraram ter atividade neuroprotetora, ao aumentar a *clearance* de  $\alpha$ -sinucleína através deste sistema, entre eles um extrato de planta de

*Rhodiola rosea* L. chamado Salidroside, o composto T-006 e o composto PD163916, cujas estruturas se encontram representadas na figura 5 (6).



**Figura 5 - Estruturas dos compostos salidroside (A), T-006 (B) e PD163916 (C) (58–60).**

A autofagia mediada por chaperone envolve a translocação dos substratos diretamente do citosol para o lisossoma, através da ligação de uma proteína de translocação, a HSC70, ao seu recetor LAMP-2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*) na membrana do lisossoma. Um requisito essencial para que uma proteína seja substrato deste tipo de degradação é a presença de uma sequência de cinco aminoácidos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (motivo KFERQ), que é o caso da  $\alpha$ -sinucleína. Ao contrário do chaperone HSC70, que muitas vezes está em excesso no citosol, os níveis de LAMP-2A na membrana lisossomal são limitantes para este tipo de autofagia (61). Várias estratégias demonstraram já resultados positivos na diminuição dos níveis  $\alpha$ -sinucleína, nomeadamente a sobreexpressão do recetor LAMP-2A em neurónios de rato, a utilização de derivados do ácido retinóico, que regulam positivamente a transcrição deste recetor e de *Geniposide*, um importante glicosídeo iridóide extraído do fruto da *Gardenia jasminoides*. Este último reverteu completamente os efeitos induzidos pelo miR-21 e diminuiu os níveis de  $\alpha$ -sinucleína num modelo de DP em ratos. O miR-21 é expresso em níveis significativamente mais altos em cérebros de pacientes com DP, sendo que esta sobreexpressão demonstrou regular negativamente os níveis do recetor LAMP-2A (6,62).

Na autofagia não seletiva ou macroautofagia, o autofagossoma forma-se ao redor do alvo e posteriormente funde-se com o lisossoma onde este é degradado. Esta via celular está associada à degradação de  $\alpha$ -sinucleína na sua forma normal, na sua forma mutada e também dos agregados desta proteína (6). O mTOR (*mammalian target of rapamycin*) regula negativamente a macroautofagia. A rapamicina e os seus análogos, ao inibirem este recetor, regulam positivamente este mecanismo de depuração. Esta classe de fármacos demonstrou ter efeitos neuroprotetores, no entanto têm utilidade limitada uma vez que carecem de especificidade, atuando noutras vias essenciais, nomeadamente na imunossupressão, não sendo

por isso candidatos viáveis para o tratamento da DP, onde o tratamento a longo prazo seria necessário (1).

A indução da macroautofagia através desta via também pode ser obtida através da ativação da proteína AMPK (Proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato), que inibe diretamente a mTOR. O resveratrol, um polifenol encontrado na uva e no vinho tinto, ativa esta proteína, e demonstrou aumentar a degradação de  $\alpha$ -sinucleína e atenuar a neurodegeneração e os sintomas motores num modelo de DP em rato (6).

Outra estratégia para atingir a inibição de mTOR é a utilização de um modulador do MPC, o transportador mitocondrial do piruvato, chamado MSDC-0160 para reduzir o transporte de piruvato para a mitocôndria. Este composto causa alterações no metabolismo mitocondrial que resultam na inibição do mTOR e aumento da autofagia, resultando em efeitos neuroprotetores em vários modelos de DP (63).

Por outro lado, a trealose é um dissacárido presente em muitos organismos que atua através de uma via independente de mTOR, melhorando o processo de autofagia por meio do aumento da biogênese lisossomal, levando também a uma *clearance* mais eficaz dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína (64).

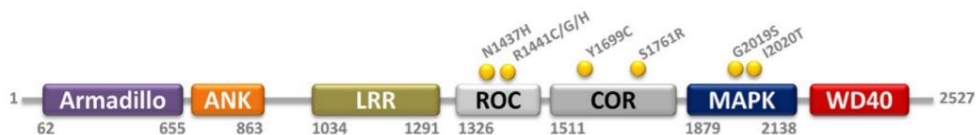
O nilotinib, um inibidor da tirosina cinase cAbl (*Tyrosine kinase Abelson*) de segunda geração aprovado pela FDA para o tratamento da leucemia mieloide crônica, também foi investigado como potencial intensificador da macroautofagia por meio de uma via independente de mTOR. Este fármaco demonstrou ser seguro e bem tolerado em doses de 150mg e 300mg e ser eficiente a melhorar o metabolismo dopaminérgico e reduzir os níveis de  $\alpha$ -sinucleína no fluido cefalorraquidiano com uma dose única de 200mg (6,65).

## **6.2. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)**

### **6.2.1. Caracterização da LRRK2**

LRRK2, também conhecido como Dardarina, é uma serina-treonina cinase de 280 kDa, que pertence à família de proteínas ROCO. As proteínas incluídas nesta família apresentam dois domínios enzimáticos distintos, mas funcionalmente relacionados: um domínio GTPase (ROC) e um domínio cinase dependente de ATP, que estão ligados por um domínio C-terminal da sequência Roc (COR). Além disso, LRRK2 apresenta vários domínios de interação com proteínas, tais como: a região de repetição armadillo (ARM), a região de repetição ankrin-like (ANK), a região de repetição rica em leucina (LRR) e o domínio C-terminal WD40 (Figura 6) (66).





**Figura 6 - Representação esquemática da estrutura da proteína LRRK2 com identificação das mutações associadas à DP (66).**

O domínio cinase tem capacidade de autofosforilação na Ser1292 e de fosforilar um conjunto de substratos, sendo as Rab GTPases os substratos mais relevantes. O segundo domínio enzimático tem atividade GTPase, sendo o ROC o domínio de ligação ao GTP, e o COR um regulador da atividade GTPase do ROC (67,68).

Estes dois domínios, embora independentes estão funcionalmente relacionados, uma vez que o domínio GTPase atua como regulador do domínio cinase. Além disso, a ligação ao GTP é importante para manter a estabilidade estrutural e garantir a dimerização correta da proteína (9).

As proteínas Rab, principais substratos da LRRK2, são reguladoras da formação e movimento das vesículas ao longo das redes de actina e tubulina, e da fusão de membranas, processos fulcrais para a autofagia e funcionamento do lisossoma. Além disso, algumas destas proteínas, como a Rab3A e Rab8A, substratos da LRRK2, promovem o tráfego vesicular do RE para o complexo de Golgi, atenuando a citotoxicidade associada aos agregados de  $\alpha$ -sinucleína (69).

A LRRK2 interage com as proteínas 14-3-3 através do domínio LRR. A família de proteínas 14-3-3 compreende 7 proteínas, importantes para diversos processos celulares. Várias mutações patogênicas reduzem a interação de LRRK2 com as proteínas 14-3-3, indicando a sua importância para a função e toxicidade da LRRK2 (13).

Esta proteína é expressa maioritariamente em células imunitárias do rim e dos pulmões e parece estar envolvida em vários processos celulares, incluindo ligação aos microtúbulos, tráfego vesicular, autofagia e mitofagia (12).

### 6.2.2. Papel da LRRK2 na fisiopatologia da doença

Existem, pelo menos, 9 mutações *missense* patogênicas do gene LRRK2, bem como outras mutações que parecem aumentar o risco de desenvolver DP. O aparecimento destas mutações varia muito entre as regiões do mundo, sendo que em algumas regiões, por exemplo

da África do norte, chegam a causar cerca de 40% dos casos de DP, representando a maior causa conhecida da doença (68).

Na DP, a maioria das mutações está presente no domínio cinase da proteína. A mutação mais comum causa uma substituição de glicina por serina na posição 2019 (G2019S), e causa um aumento da sua atividade cinase responsável pelo efeito patológico (9).

Para além da G2019S também outras variantes patogénicas têm atividade cinase aumentada e esta atividade também aparece aumentada em doentes com DP sem ligação genética, sugerindo que a inibição desta possa ser uma terapêutica para ambos os tipos de doença (12).

Por outro lado, estudos em linhas celular e modelos em roedores demonstraram que os níveis de proteína são mais importantes para a toxicidade neuronal que a atividade cinase. Isto pode ser explicado pelo facto da LRRK2 poder atuar como proteína *scaffold*, aumentando as interações entre outras proteínas. Uma vez que esta ação é uma função da estrutura da proteína e não da sua atividade cinase, seria de esperar que níveis mais elevados de proteína, levassem a mais interações proteicas. Três das proteínas que interagem com a LRRK2 são a *tau* e duas outras cinases: glicogénio sintase cinase -3 beta (GSK-3 $\beta$ ) e a cinase dependente de ciclina 5 (cdk5). Estas interações demonstraram aumentar fortemente a formação de *tau* fosforilado patogénico, que faz parte, em conjunto com a  $\alpha$ -sinucleína dos corpos de Lewy, podendo ser esta a causa do aumento da toxicidade (12).

A atividade da LRRK2 GTPase recebe menos atenção do que a do domínio cinase, mas o número de mutações patogénicas localizadas nos domínios Roc e COR indicam que a atividade da LRRK2 GTPase não será menos importante para a atividade desta proteína (68).

Embora o papel fisiológico desta proteína não esteja completamente esclarecido, vários estudos identificaram uma série de interações que podem ser responsáveis pelos efeitos patológicos das variantes patogénicas da LRRK2. Por exemplo, algumas mutações desta proteína podem induzir a apoptose neuronal, aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, regular positivamente a expressão de recetores apoptóticos e bloquear os mecanismos de resposta ao stress (67).

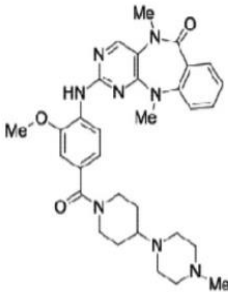
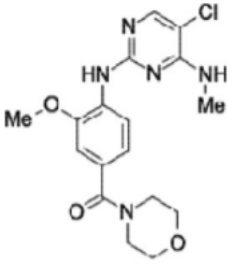
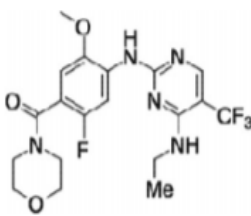
### 6.2.3. Estratégias terapêuticas

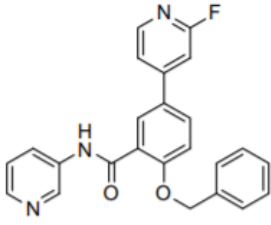
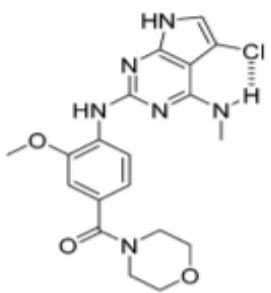
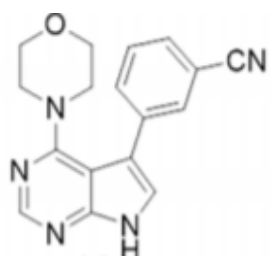
#### 6.2.3.1. Inibição da atividade cinase

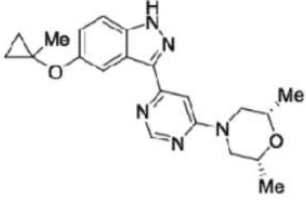
Com base nas evidências de que as mutações patogênicas mais comuns de LRRK2 aumentam a sua atividade cinase, a inibição desta atividade tornou-se numa das estratégias mais promissoras para o tratamento da DP.

Os primeiros compostos que demonstraram inibir a atividade cinase da LRRK2, foram K252A, inibidor VI da JAK3, estaurosporina, Su-11248 e Ro-31-8220. No entanto, a sua falta de seletividade pode resultar em efeitos adversos e limitar suas aplicações clínicas. Por isso, foram desenvolvidos inibidores seletivos desta atividade, descritos na tabela 6 (13).

**Tabela 6 - Inibidores seletivos da atividade cinase da LRRK2.**

Inibidor	Estrutura	Descrição
LRRK2-IN-1	 <p>The chemical structure of LRRK2-IN-1 features a central pyrimidopyrimidinone ring system. It is substituted with a methyl group (Me) at the 2-position, a methylamino group (NHMe) at the 4-position, and a 4-methoxyphenyl group (Me-O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-) at the 6-position. The 6-position is also linked via a carbonyl group to a piperazine ring, which is further substituted with a methyl group (Me) on one of its nitrogen atoms.</p>	Foi o primeiro composto desenvolvido com seletividade para a LRRK2, suprime a sua atividade cinase através da desfosforilação das Ser910 e Ser935. No entanto, este composto não atravessa a BHE (13).
HG-10-102-01	 <p>The chemical structure of HG-10-102-01 consists of a pyrimidopyrimidinone core. It has a chlorine atom (Cl) at the 2-position, a methylamino group (NHMe) at the 4-position, and a 4-methoxyphenyl group (Me-O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-) at the 6-position. The 6-position is connected via a carbonyl group to a morpholine ring.</p>	Primeiro inibidor seletivo da LRRK2 capaz de inibir a fosforilação de Ser910 e Ser935 no cérebro de rato. A sua capacidade de inibir a LRRK2 <i>in vivo</i> , demonstra a sua capacidade de atravessar a BHE(13).
GNE-7915	 <p>The chemical structure of GNE-7915 features a pyrimidopyrimidinone core. It is substituted with a methoxy group (Me-O) at the 2-position, a methylamino group (NHMe) at the 4-position, and a 2-fluoro-4-methoxyphenyl group (F-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(Me-O)-) at the 6-position. The 6-position is linked via a carbonyl group to a morpholine ring.</p>	Inibidor seletivo da LRRK2, com capacidade de atravessar a BHE. Demonstrou aumentar a libertação de dopamina e a reciclagem de vesículas

		sinápticas em ensaios pré-clínicos (13,66).
GSK2578215A		Inibidor da LRRK2 altamente seletivo que possui boa permeabilidade da BHE. Inibe substancialmente a fosforilação de Ser910 e Ser935 da LRRK2 <i>wild-type</i> e da mutação G2019S (70).
JH-II-127		Foi desenhado a partir do composto GNE-7915 para aumentar a afinidade para a LRRK2. Inibe substancialmente a fosforilação das Ser910 e Ser935 do LRRK2 e da mutação G2019S a uma concentração de 0,1-0,3 $\mu$ M em diversos tipos de células e é capaz de inibir fosforilação de Ser935 em cérebro de rato após administração oral de uma dose de 30mg/kg (71).
PF-06447475		Inibidor altamente seletivo da LRRK2, que penetra a BHE. PF-06447475 bloqueia a fosforilação da Ser935 e reverte a sinalização apoptótica em modelos celulares de DP induzidos pela rotenona (13,72)

MLi-2		Inibidor potente e seletivo da LRRK2 com atividade no SNC (13).
DNL210	Estrutura não revelada	Inibidor seletivo da LRRK2, completou em dezembro de 2019, os ensaios clínicos de fase Ib (NCT: 03710707), em indivíduos com DP, com e sem mutação LRRK2. Demonstrou inibir a atividade cinase em mais de 90% e atingir concentrações significativas no líquido cefalorraquidiano (13,73).
DNL151	Estrutura não revelada	Inibidor seletivo da LRRK2, atualmente em fase de recrutamento para ensaio clínico de fase 1b (NCT04056689). Os dados já divulgados sugerem uma perspectiva promissora para este composto (73).

A fosforilação da Ser910 e da Ser935 serve como medidor da potência de inibição da atividade cinase da LRRK2 uma vez que a fosforilação destes aminoácidos depende desta atividade (71).

Vários estudos em modelos de roedores com deficiência em LRRK2 e primatas não humanos tratados com inibidores de LRRK2 revelaram potenciais preocupações com a toxicidade no pulmão e no rim, resultante da perda da atividade cinase da LRRK2 que poderá estar associada a alterações na autofagia e no funcionamento de lisossoma. Por esse motivo, a função pulmonar e renal deverá ser altamente monitorizada nos ensaios clínicos destes compostos (69).

### 6.2.3.2. Inibição da ligação ao GTP

O domínio GTPase (ROCCor) da LRRK2 contém os aminoácidos 1335 a 1878, representando cerca de 7% da proteína. As mutações neste domínio podem alterar a atividade GTPase ou a ligação ao GTP (74).

A mutação K1347A, localizada no domínio ROC, inibe a ligação da LRRK2 ao GTP e diminui a sua atividade cinase, sugerindo que o domínio GTPase é um possível alvo para intervenção terapêutica (74).

O composto FX2149 (Figura 7) reduziu a ligação de LRRK2 ao GTP e a suas atividades cinase, diminuindo significativamente a degeneração neuronal induzida por mutações patogénicas da proteína em culturas celulares (74).

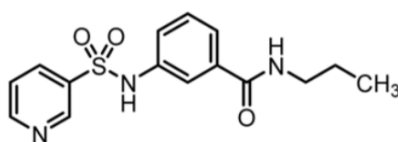


Figura 7 – Estrutura do composto FX2149 (74).

### 6.2.3.3. Inibição da dimerização

A LRRK2 existe nas células na sua forma monomérica e dimérica, sendo que as duas espécies têm diferentes propriedades e localizações. A forma dimérica encontra-se maioritariamente nas membranas intracelulares e tem atividade cinase aumentada, enquanto a forma monomérica é predominantemente citosólica, com menor atividade cinase (68).

Por esse motivo, uma forma de inibir seletivamente a atividade cinase da LRRK2 é inibir a sua dimerização, através da utilização de pequenos péptidos que interfiram com o *fold*ing proteico ou a formação de dímeros. Esta estratégia já foi utilizada anteriormente com sucesso, para inibir o *fold*ing da protease HIV-1, para o tratamento da SIDA (67).

### 6.2.3.4. Bloqueio dos domínios de interação com proteínas

Como referido anteriormente, a LRRK2 tem alguns domínios de interação com proteínas sem atividade catalítica. A deleção da região N-terminal do domínio LRR e do WD40 diminuiu a toxicidade neuronal de certas mutações patogénicas da LRRK2, incluindo da G2019S, demonstrando que estes domínios podem ter impacto na citotoxicidade associada a atividade cinase da LRRK2.

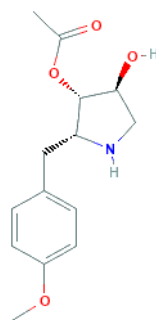
Neste sentido, uma possível estratégia seria utilizar péptidos que bloqueiem a interação entre estes domínios e outras proteínas (67).

#### 6.2.3.5. mRNA

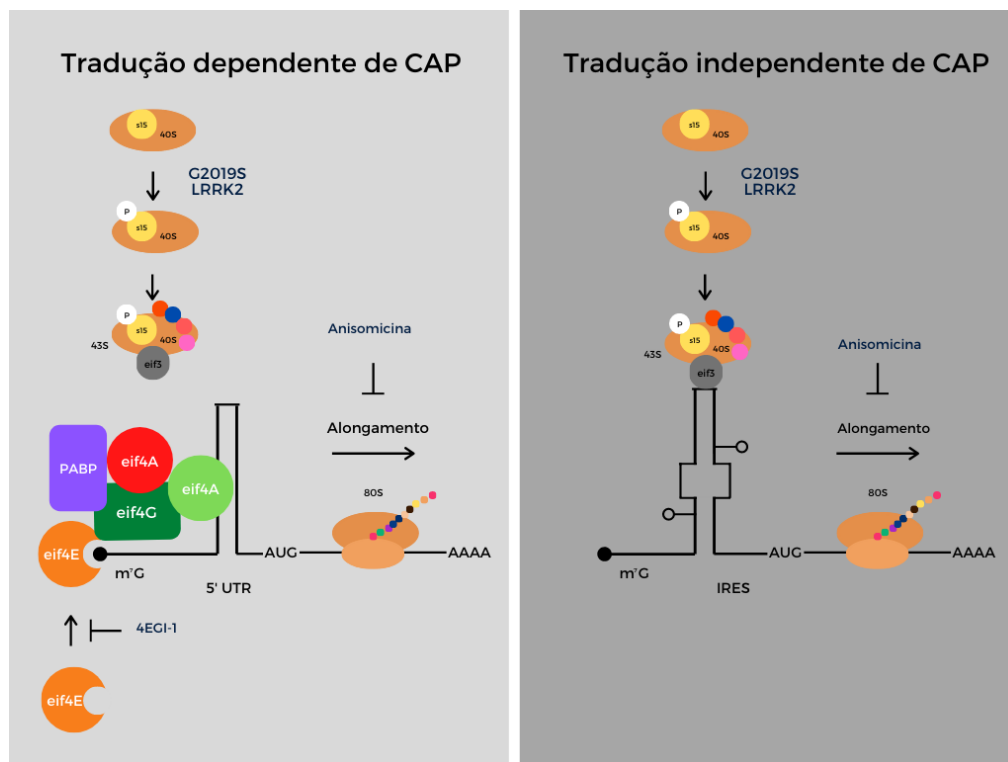
A LRRK2 interfere na tradução de mRNA dependente de CAP através da fosforilação da proteína 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*). Esta proteína limita a capacidade do fator de iniciação da tradução eucariótico 4E (eIF4E) de se ligar ao fator de iniciação eucariótica 4G1 (eIF4G1), impedindo a formação do complexo eIF4G1-eIF4E, necessário à iniciação da tradução. A ligação da 4E-BP ao eIF4E é regulada por fosforilação. A hipofosforilação de 4E-BP aumenta a sua afinidade para o eIF4E, enquanto a hiperfosforilação de 4E-BP leva à sua dissociação de eIF4E, regulando positivamente a tradução. Por isso, a hiperfosforilação do 4E-BP pelas formas patogênicas de LRRK2, leva a um aumento da tradução (9).

Um possível método para normalizar a desregulação da tradução causada pela hiperfosforilação 4E-BP é evitar a formação do complexo 4E-BP-eIF4E de modo que a tradução não possa ser iniciada. O 4EGI-1 é um inibidor da síntese proteica, que interfere com a ligação do 4E-BP ao eIF4E, que demonstrou recuperar parcialmente os sintomas motores e a perda de neurónios dopaminérgicos em modelos de DP em moscas (75).

Para além disto, a LRRK2 é também responsável pela fosforilação da proteína s15, localizada na subunidade 40S do ribossoma, levando a um aumento na tradução de mRNA, tanto dependente como independente de CAP. A fosforilação da s15 encontra-se aumentada nas mutações G2019S e I2020T, sendo que pode ser inibida pela anisomicina (Figura 8) durante a etapa de alongamento. A administração de anisomicina demonstrou impedir a neurodegeneração em modelos de DP, em moscas com a mutação G2019S (75).



**Figura 8 - Estrutura da anisomicina (76).**



**Figura 9 - Representação esquemática da tradução eucariótica dependente e independente de CAP e locais de ação dos inibidores da síntese proteica, anisomicina e 4EGI-1. Adaptado de (75).**

### 6.3. *Parkin* e PINK1

Mutações dos genes que codificam para as proteínas PINK1 e *parkin* são a causa reconhecidas de aproximadamente 13% da DP autossômica recessiva com início dos sintomas antes dos 45 anos de idade. Estudos genéticos e bioquímicos revelaram que as proteínas PINK1 e *parkin* funcionam em conjunto no “controle de qualidade” mitocondrial, na regulação de processos de imunidade inata e adquirida e noutras funções mitocondriais (8).

Normalmente, a DP autossômica recessiva ligada a mutações na *parkin* e PINK1 tem um início precoce da doença, progressão mais lenta e uma resposta notável à levodopa. Patologicamente, essas formas de DP são caracterizadas pela perda de células no SN com resultados contraditórios sobre a presença de corpos de Lewy (77).

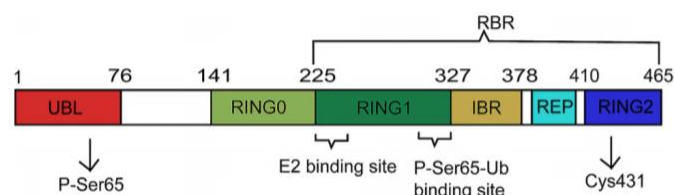
#### 6.3.1. Caracterização da *Parkin* e PINK1

O *PARK2*, que codifica a proteína *parkin*, foi o primeiro gene associado à DP autossômica recessiva. A *parkin* é uma proteína com 465 aminoácidos, que contém um domínio ubiquitina (Ubl) no terminal N e quatro domínios *RING-like* (RING0, RING1, IBR e RING2)



(Figura 10). Tem um domínio de ligação, com 60 aminoácidos a seguir ao domínio Ubl e uma região conservada chamada REP entre os domínios IBR e RING2. RING1, IBR e RING2 em conjunto formam o módulo RING-in-between-RING (RBR). Há um sítio de ligação E2 e a Cys431 situado nos domínios RING1 e RING2, respetivamente, que desempenham papéis essenciais na sua ativação (78,79).

Esta proteína é uma ubiquitina ligase E3, o que significa que catalisa a transferência de ubiquitina, uma pequena proteína de 76 aminoácidos de uma enzima E2 de conjugação para o substrato. Substratos ubiquitinados, sofrem depois diferentes destinos consoante o local e o tipo de ubiquitinação (78).



**Figura 10 - Estrutura da parkin (79).**

O gene PARK6, que codifica a proteína PINK1 está também associado a formas autossómicas recessivas da DP. A PINK1 é uma proteína de 581 aminoácidos, com um domínio N-terminal de direcionamento mitocondrial, uma hélice transmembranar, um domínio cinase e um domínio C-terminal de função desconhecida. Esta proteína tem um papel essencial na manutenção da morfologia e homeostase mitocondrial e é necessário para o recrutamento da *parkin* para a mitocôndria (78).

Um crescente número de estudos evidenciam o papel crucial da *parkin* e da PINK1 no funcionamento mitocondrial. Os primeiros estudos feitos neste sentido, foram numa espécie de *Drosophila*, e demonstraram que a perda de *parkin* ou de PINK1 causa diversas anormalidades mitocondriais, e resulta numa esperança de vida reduzida e na degeneração de certos músculos e neurónios dopaminérgicos (79–81).

### 6.3.2. Papel da Parkin e da PINK1 na fisiopatologia da doença

A teoria aceite atualmente sugere que em mitocôndrias funcionais, a PINK1 é importada para as mitocôndrias e subsequentemente degradada pela protease PARL (*presenilins-associated rhomboid-like protein*). No entanto, em resposta a danos na mitocôndria e à sua despolarização, a PINK1 deixa de ser clivada pela PARL e acumula-se na membrana

mitocondrial externa onde fosforila a ubiquitina na Ser65. A ubiquitina fosforilada, por sua vez, recruta a *parkin* para a membrana externa da mitocôndria, onde esta é fosforilada pela PINK1, levando a sua ativação total. Seguidamente, a *parkin* ubiquitina-se a ela própria e a várias outras proteínas mitocondriais. Este procedimento marca a mitocôndria danificada para a degradação pelo lisossoma, processo denominado de mitofagia (8,77).

Mutações associadas à DP na PINK1 e na *parkin* diminuem este processo, resultando na acumulação de mitocôndrias danificadas e morte celular. Por outro lado, o aumento da expressão dessas proteínas é neuroprotetor em vários modelos pré-clínicos de DP (8).

### 6.3.3. Estratégias terapêuticas

#### 6.3.3.1. Ativação da PINK1

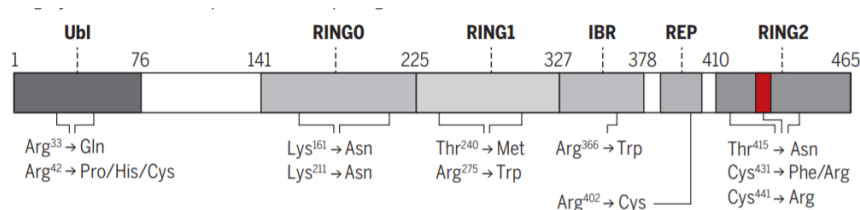
Quando há despolarização da membrana externa mitocondrial, o primeiro passo para a ativação da PINK1 é a sua autofosforilação. Pelo menos três locais de autofosforilação foram confirmados para a PINK1, Thr257, Ser228 e Ser402, sendo que os dois últimos influenciam a subsequente fosforilação da ubiquitina e ativação da *parkin* (77).

Uma possível estratégia para a ativação da PINK1 seria aumentar a sua autofosforilação através da utilização de moduladores alostéricos, no entanto a PINK1 não possui ainda sítios de ligação alostéricos conhecidos (77,82).

Uma segunda abordagem para aumentar a atividade da PINK1 *in vitro* é utilizando um neo-substrato, análogo do ATP, trifosfato de cinetina (KTP). A PINK1 aceita este substrato com maior eficiência catalítica do que o seu substrato endógeno, ATP, resultando em aumentos biologicamente significativos na atividade de PINK1, com consequente aumento do recrutamento da *parkin* e níveis mais baixos de apoptose (82).

#### 6.3.3.2. Ativação da Parkin

Foram identificadas mais de cem mutações diferentes da *parkin* associadas à DP. Estas mutações são distribuídas em todos os cinco domínios e também nas interfaces entre eles e em regiões de ligação, levando sempre à perda de função. Sugerindo que a integridade estrutural de todos os domínios é importante na patogênese da DP (Figura 11) (83).



**Figura 11 - Mutações da parkin associadas à DP (77).**

Sob condições normais, a *parkin* adota conformações de autoinibição através de três mecanismos diferentes: o anel RING0 oclui parcialmente a Cys431 catalítica, a região REP juntamente com o domínio Ubl bloqueiam o sitio de ligação da E2 no RING1 ou a distância entre a Cys431 no RING2 e o sitio de ligação E2 é superior à necessária para permitir a transferência da ubiquitina (77).

Existem dois modelos para explicar como se processa a transferência de ubiquitina entre a *parkin* fosforilada na sua conformação autoinibida e a enzima de conjugação E2. O modelo 1 defende que se dão mudanças conformacionais da *parkin* que permitem a exposição da Cys431 e a ligação da ubiquitina ao sitio de ligação E2. O modelo 2 envolve a cooperação da *parkin* fosforilada com um complexo *parkin*-E2-ubiquitina para que se dê esta transferência (83).

Perceber melhor o mecanismo de ativação da *parkin* é essencial para desenvolver moléculas que interrompam os mecanismos autoinibitórios e estimulem a sua atividade catalítica (77).

#### 6.3.3.3. Inibição da USP30

As desubiquitinases (DUBs) revertem as modificações efetuadas pela *parkin* nas proteínas mitocondriais, sendo por isso importantes reguladores da mitofagia. A USP30 (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 30*) é entre as DUBs a mais conhecida, uma vez que está ligada à membrana externa mitocondrial e partilha com a *parkin* a preferência por cadeias ligadas à Lys6 (84). Estudos realizados em *Drosophila*, revelaram que o silenciamento da USP30 aumenta os níveis de dopamina e melhora a função motora e a sobrevivência. Por esse motivo, a inibição desta enzima tem sido também proposta como opção terapêutica para restabelecer o equilíbrio entre a ubiquitinação e a desubiquitinação mitocondrial na DP (85).

O composto MF-094 (Figura 12) é um exemplo de um inibidor potente e seletivo da USP30 e demonstrou aumentar a ubiquitinação de proteínas e aumentar o processo de mitofagia (86).

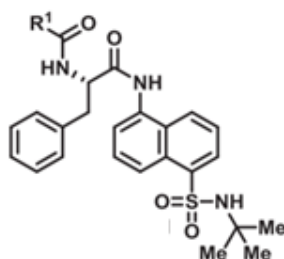


Figura 12 – Estrutura do composto MF-094. R1 = grupo ciclohexil (86).

## 7. Conclusão

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, com uma prevalência de cerca de 7 a 10 milhões de pessoas à escala mundial. Esta doença afeta significativamente a qualidade de vida dos doentes e das pessoas que os rodeiam, e a sua prevalência tende a aumentar, em concordância com o aumento da esperança média de vida. Apesar dos constantes avanços científicos ao nível do conhecimento desta complexa doença, não existem ainda opções terapêuticas capazes de impedir o seu aparecimento ou abrandar a sua progressão e os fármacos disponíveis no mercado tornam-se ineficazes à medida que a doença progride.

Ao longo dos últimos anos, têm sido feitos grandes avanços no conhecimento da fisiopatologia desta doença e na descoberta de novas moléculas aptas para modelar o curso natural da doença de Parkinson. A  $\alpha$ -sinucleína, a LRRK2, a *parkin* e a PINK1, abordadas nesta monografia, são proteínas de grande interesse neste âmbito devido à sua relevância na fisiopatologia desta doença e, também, graças à diversidade de estratégias terapêuticas que têm sido estudadas, tendo como alvo estas proteínas.

A  $\alpha$ -sinucleína é a proteína mais bem estudada, das três aqui abordadas. A sua toxicidade é resultado da sua acumulação e agregação pelo que as abordagens terapêuticas para esta proteína incluem reduzir a sua transmissão entre células, os seus níveis de expressão ou a sua agregação. A imunização, tanto ativa como passiva, tem sido também bastante investigada como forma de diminuir a agregação e propagação desta proteína.

Os mecanismos de patogenicidade da LRRK2 na DP não se encontram ainda completamente desvendados, no entanto a sua atividade cinase está aumentada em várias

mutações desta proteína e em formas não genéticas da DP, pelo que a inibição desta atividade se torna uma das estratégias mais promissoras para o tratamento da DP. Foram desenvolvidos vários inibidores da atividade cinase da LRRK2, cada um com melhor potência, seletividade e penetrabilidade cerebral, do que aquele que o antecedeu, estando alguns em fase de ensaios clínicos.

A *parkin* e a PINK1 estão associadas a formas autossômicas recessivas da DP. Mutações nos genes que codificam estas proteínas diminuem o processo de mitofagia, resultando na morte celular. As estratégias terapêuticas atualmente em estudo para reverter o efeito destas mutações incluem aumentar a ativação da PINK1 e da *parkin* e inibir a atividade das DUBs, que são importantes enzimas para a regulação da mitofagia.

Atualmente são imensas as moléculas a serem investigadas, com resultados promissores na inibição da neurodegeneração e melhorias significativas dos sintomas motores associados à DP, incluindo vários compostos já em fase de ensaios clínicos, como o anle138b, os anticorpos LU AF82422, MEDI1341, Biib054 e PRX002, direcionados à  $\alpha$ -sinucleína e os inibidores da atividade cinase da LRRK2, DNL210 e DNL151. O número de compostos em fase de ensaios clínicos irá, naturalmente, aumentar nos próximos anos como resultado das múltiplas linhas de investigação em curso.

Em suma, apesar de ainda ser necessária uma vasta investigação para compreender por completo os mecanismos fisiopatológicos da DP, o futuro do tratamento desta doença nunca foi tão promissor como nos dias de hoje.

## 8. Bibliografia

1. Fields CR, Bengoa-Vergniory N, Wade-Martins R. Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2019;12(December):1–14.
2. Hayes MW, Fung VSC, Kimber TE, O'Sullivan JD. Updates and advances in the treatment of Parkinson disease. *Med J Aust*. 2019;211(6):277–83.
3. Cheong SL, Federico S, Spalluto G, Klotz KN, Pastorin G. The current status of pharmacotherapy for the treatment of Parkinson's disease: transition from single-target to multitarget therapy. *Drug Discov Today*. 2019;24(9):1769–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.003>
4. Perez RG. Editorial: The Protein Alpha-Synuclein: Its Normal Role (in Neurons) and Its Role in Disease. *Front Neurosci*. 2020;14(February):1–3.

5. Brás IC, Xylaki M, Outeiro TF. Mechanisms of alpha-synuclein toxicity: An update and outlook. *Prog Brain Res.* 2020;252:91–129.
6. Teil M, Arotcarena ML, Faggiani E, Laferriere F, Bezard E, Dehay B. Targeting  $\alpha$ -synuclein for PD Therapeutics: A Pursuit on All Fronts. *Biomolecules.* 2020;10(3):1–54.
7. Burbulla LF, Krainc D. The role of dopamine in the pathogenesis of GBA1-linked Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2019;132(July):104545. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104545>
8. Padmanabhan S, Polinski NK, Menalled LB, Baptista MAS, Fiske BK. The michael J. Fox foundation for parkinson's research strategy to advance therapeutic development of PINK1 and parkin. *Biomolecules.* 2019;9(8).
9. Correddu D, Leung IKH. Targeting mRNA translation in Parkinson's disease. *Drug Discov Today.* 2019;24(6):1295–303. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.04.003>
10. Gureev AP, Popov VN. Nrf2/ARE Pathway as a Therapeutic Target for the Treatment of Parkinson Diseases. *Neurochem Res.* 2019;44(10):2273–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-018-02711-2>
11. Zeng XS, Geng WS, Jia JJ, Chen L, Zhang PP. Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(APR):1–16.
12. Guttuso T, Andrzejewski KL, Lichter DG, Andersen JK. Targeting kinases in Parkinson's disease: A mechanism shared by LRRK2, neurotrophins, exenatide, urate, nilotinib and lithium. *J Neurol Sci.* 2019;402(May):121–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.016>
13. Chen J, Chen Y, Pu J. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 in Parkinson's Disease: Updated from Pathogenesis to Potential Therapeutic Target. *Eur Neurol.* 2018;79(5–6):256–65.
14. Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(1):24–30.
15. Cacabelos R. Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3).
16. Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and

- mitophagy in Parkinson's: From familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(4):200–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.02.003>
17. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2):197–211.
  18. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(6):548–60.
  19. Goldman JG, Guerra CM. Treatment of Nonmotor Symptoms Associated with Parkinson Disease. *Neurol Clin.* 2020;38(2):269–92.
  20. Poewe W, Mahlknecht P. Pharmacologic Treatment of Motor Symptoms Associated with Parkinson Disease. *Neurol Clin.* 2020;38(2):255–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2019.12.002>
  21. Cabreira V, Massano J. Parkinson's disease: Clinical review and update. *Acta Med Port.* 2019;32(10):661–70.
  22. Olanow CW, Stocchi F. Levodopa: A new look at an old friend. *Mov Disord.* 2018;33(6):859–66.
  23. Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson. Manual Para Pessoas Com Parkinson. Msd. 2014. 6, 7, 8 p. Available from: [http://msd.pt/wp-content/uploads/2015/10/Parkinson-Manual\\_XXXX\\_v7\\_pt.pdf](http://msd.pt/wp-content/uploads/2015/10/Parkinson-Manual_XXXX_v7_pt.pdf)
  24. Zhuo C, Xue R, Luo L, Ji F, Tian H, Qu H, et al. Efficacy of antidepressive medication for depression in Parkinson disease: A network meta-analysis. *Med (United States).* 2017;96(22).
  25. Knudsen K, Krogh K, Østergaard K, Borghammer P. Constipation in parkinson's disease: Subjective symptoms, objective markers, and new perspectives. *Mov Disord.* 2017;32(1):94–105.
  26. Mukherjee A, Biswas A, Das SK. Gut dysfunction in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(25):5742–52.
  27. Buhmann C, Kassubek J, Jost WH. Management of Pain in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2020;
  28. Mitchell KT, Ostrem JL. Surgical Treatment of Parkinson Disease. *Neurol Clin.*

- 2020;38(2):293–307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2020.01.001>
29. Ohye C, Higuchi Y, Shibasaki T, Hashimoto T, Koyama T, Hirai T, et al. Gamma knife thalamotomy for Parkinson disease and essential tremor: A prospective multicenter study. *Clin Neurosurg*. 2012;70(3):526–35.
  30. Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016;137(3):331–59.
  31. Kumar D, Kumar P. A $\beta$ , Tau, and  $\alpha$ -Synuclein aggregation and integrated role of PARK2 in the regulation and clearance of toxic peptides. *Neuropeptides*. 2019;78(September):101971. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101971>
  32. Martial B, Raïche-Marcoux G, Lefèvre T, Audet P, Voyer N, Auger M. The Structure of a Parkinson's Disease-Involved  $\alpha$ -Synuclein Peptide is Modulated by Membrane Composition and Physical State. *J Phys Chem B*. 2020;
  33. Fouka M, Mavroeidi P, Tsaka G, Xilouri M. In Search of Effective Treatments Targeting  $\alpha$ -Synuclein Toxicity in Synucleinopathies: Pros and Cons. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(September):1–32.
  34. Bendor J, Logan T, Edwards RH. The Function of  $\alpha$  -Synuclein. 2014;79(6).
  35. Bernal-conde LD, Ramos-acevedo R, Reyes-hernández MA, Balbuena-olvera AJ, Morales-moreno ID, Argüero-sánchez R, et al. Alpha-Synuclein Physiology and Pathology : A Perspective on Cellular Structures and Organelles. 2020;13(January):1–22.
  36. Cox D, Selig E, Griffin MDW, Carver JA, Ecroyd H. Small Heat-shock Proteins Prevent  $\alpha$ -synuclein aggregation via transient interactions and their efficacy is affected by the rate of aggregation. *J Biol Chem*. 2016;291(43):22618–29.
  37. Bengoa-Vergniory N, Roberts RF, Wade-Martins R, Alegre-Abarrategui J. Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathol*. 2017;134(6):819–38.
  38. Choi BK, Choi MG, Kim JY, Yang Y, Lai Y, Kweon DH, et al. Large  $\alpha$ -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):4087–92.



39. Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, et al.  $\alpha$ -synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(342):1–15.
40. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam TI, Yin X, Xiong Y, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* (80-). 2016;353(6307).
41. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(33).
42. Ihse E, Yamakado H, Van Wijk XM, Lawrence R, Esko JD, Masliah E. Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08720-5>
43. Rodrigues TB, Ballesteros P. *Journal of Neuroscience Research* 85:3244–3253 (2007). *J Neurosci Res*. 2007;3253(April):3244–53.
44. Collier TJ, Eugene Redmond D, Steece-Collier K, Lipton JW, Manfredsson FP. Is alpha-synuclein loss-of-function a contributor to parkinsonian pathology? Evidence from non-human primates. *Front Neurosci*. 2016;10(JAN):1–7.
45. Takahashi M, Suzuki M, Fukuoka M, Fujikake N, Watanabe S, Murata M, et al. Normalization of overexpressed  $\alpha$ -synuclein causing Parkinson's disease by a moderate gene silencing with RNA interference. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015;4(5):e241.
46. Zharikov AD, Cannon JR, Tapias V, Bai Q, Horowitz MP, Shah V, et al. ShRNA targeting  $\alpha$ -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. *J Clin Invest*. 2015;125(7):2721–35.
47. Mittal S, Bjørnevik K, Im DS, Flierl A, Dong X, Locascio JJ, et al.  $\beta$ 2-Adrenoreceptor is a regulator of the  $\alpha$ -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science* (80-). 2017;357(6354):891–8.
48. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, et al. Small molecule inhibitors of  $\alpha$ -synuclein filament assembly. *Biochemistry*. 2006;45(19):6085–94.
49. Tóth G, Neumann T, Berthet A, Masliah E, Spencer B, Tao J, et al. Novel Small

- Molecules Targeting the Intrinsically Disordered Structural Ensemble of  $\alpha$ -Synuclein Protect Against Diverse  $\alpha$ -Synuclein Mediated Dysfunctions. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.
50. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5281605, Baicalein. Retrieved October 27, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Baicalein>.
  51. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 176440, Delphinidin 3-galactoside. Retrieved October 27, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Delphinidin-3-galactoside>.
  52. Sinha S, Du Z, Maiti P, Klärner FG, Schrader T, Wang C, et al. Comparison of three amyloid assembly inhibitors: The sugar scyllo- inositol, the polyphenol epigallocatechin gallate, and the molecular tweezer CLR01. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(6):451–8.
  53. Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, Schmidt F, et al. Anle138b: A novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2013;125(6):795–813.
  54. Brys M, Fanning L, Hung S, Ellenbogen A, Penner N, Yang M, et al. Randomized phase I clinical trial of anti- $\alpha$ -synuclein antibody BIIB054. *Mov Disord*. 2019;34(8):1154–63.
  55. Weihofen A, Liu YT, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA, et al. Development of an aggregate-selective, human-derived  $\alpha$ -synuclein antibody BIIB054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiol Dis*. 2019;124:276–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.016>
  56. Jankovic J, Goodman I, Safirstein B, Marmon TK, Schenk DB, Koller M, et al. Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- $\alpha$ -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients with Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2018;75(10):1206–14.
  57. Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, et al. Effects of  $\alpha$ -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*. 2005;46(6):857–68.
  58. Li T, Feng Y, Yang R, Wu L, Li R, Huang L, et al. Salidroside promotes the pathological  $\alpha$ -synuclein clearance through ubiquitin-proteasome system in SH-SY5Y

- cells. *Front Pharmacol.* 2018;9(APR):1–12.
59. Zhou H, Shao M, Guo B, Li C, Lu Y, Yang X, et al. Tetramethylpyrazine Analogue T-006 Promotes the Clearance of Alpha-synuclein by Enhancing Proteasome Activity in Parkinson's Disease Models. *Neurotherapeutics.* 2019;16(4):1225–36.
  60. Leestemaker Y, de Jong A, Witting KF, Penning R, Schuurman K, Rodenko B, et al. Proteasome Activation by Small Molecules. *Cell Chem Biol.* 2017;24(6):725-736.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.010>
  61. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):142–50.
  62. Su C, Yang X, Lou J. Geniposide reduces  $\alpha$ -synuclein by blocking microRNA-21/lysosome-associated membrane protein 2A interaction in Parkinson disease models. *Brain Res.* 2016;1644:98–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.011>
  63. Ghosh A, Tyson T, George S, Hildebrandt EN, Steiner JA, Madaj Z, et al. Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8(368).
  64. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5641–52.
  65. Pagan FL, Hebron ML, Wilmarth B, Torres-Yaghi Y, Lawler A, Mundel EE, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose Nilotinib in individuals with Parkinson's disease. *Pharmacol Res Perspect.* 2019;7(2):1–12.
  66. Christensen K V., Smith GP, Williamson DS. Development of LRRK2 Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease. 1st ed. Vol. 56, *Progress in Medicinal Chemistry.* Elsevier B.V.; 2017. 37–80 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmch.2016.11.002>
  67. Rudenko IN, Chia R, Cookson MR. Is inhibition of kinase activity the only therapeutic strategy for LRRK2-associated Parkinson's disease? *BMC Med.* 2012;10:1–8.
  68. Berwick DC, Heaton GR, Azegagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: Research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener.*

- 2019;14(1):1–22.
69. Alessi DR, Sammler E. LRRK2 kinase in Parkinson's disease. *Science* (80- ). 2018;360(6384):36–7.
  70. Reith AD, Bamborough P, Jandu K, Andreotti D, Mensah L, Dossang P, et al. GSK2578215A; A potent and highly selective 2-arylmethoxy-5-substituted- N-arylbenzamide LRRK2 kinase inhibitor. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2012;22(17):5625–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.104>
  71. Hatcher JM, Zhang J, Choi HG, Ito G, Alessi DR, Gray NS. Discovery of a pyrrolopyrimidine (JH-II-127), a highly potent, selective, and brain penetrant LRRK2 inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2015;6(5):584–9.
  72. Henderson JL, Kormos BL, Hayward MM, Coffman KJ, Jasti J, Kurumbail RG, et al. Discovery and preclinical profiling of 3-[4-(morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzotrile (PF-06447475), a highly potent, selective, brain penetrant, and in vivo active LRRK2 kinase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 Jan 8;58(1):419–32.
  73. Ding X, Ren F. Leucine-rich repeat kinase 2 inhibitors: a patent review (2014–present). Vol. 30, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor & Francis; 2020. 275–286 p. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1729354>
  74. Li T, He X, Thomas JM, Yang D, Zhong S, Xue F, et al. A novel GTP-binding inhibitor, FX2149, attenuates LRRK2 toxicity in Parkinson's disease models. *PLoS One*. 2015;10(3):1–15.
  75. Martin I, Abalde-Atristain L, Kim JW, Dawson TM, Dawson VL. Abberant protein synthesis in G2019S LRRK2 drosophila parkinson disease-related phenotypes. *Fly* (Austin). 2014;8(3):165–9.
  76. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 253602, Anisomycin. Retrieved October 16, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anisomycin>.
  77. Miller S, Muqit MMK. Therapeutic approaches to enhance PINK1/Parkin mediated mitophagy for the treatment of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2019;705(December 2018):7–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.029>
  78. Trempe JF, Fon EA. Structure and function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the three

- musketees of neuroprotection. *Front Neurol.* 2013;4 APR(April):1–12.
79. Wang X Le, Feng ST, Wang ZZ, Yuan YH, Chen NH, Zhang Y. Parkin, an E3 Ubiquitin Ligase, Plays an Essential Role in Mitochondrial Quality Control in Parkinson's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00914-2>
  80. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(28):10793–8.
  81. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4078–83.
  82. Hertz NT, Berthet A, Sos ML, Thorn KS, Burlingame AL, Nakamura K, et al. A neo-substrate that amplifies catalytic activity of parkinson's-disease- related kinase PINK1. *Cell.* 2013;154(4):737–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.030>
  83. Doyle K. Parkin function in Parkinson disease. *Clin Chem.* 2018;64(11):1676.
  84. Gersch M, Gladkova C, Schubert AF, Michel MA, Maslen S, Komander D. Mechanism and regulation of the Lys6-selective deubiquitinase USP30. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(11):920–30.
  85. Bingol B, Tea JS, Phu L, Reichelt M, Bakalarski CE, Song Q, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature.* 2014;510(7505):370–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13418>
  86. Kluge AF, Lagu BR, Maiti P, Jaleel M, Webb M, Malhotra J, et al. Novel highly selective inhibitors of ubiquitin specific protease 30 (USP30) accelerate mitophagy. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2018;28(15):2655–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.013>