

Alexandra Peixoto Balester Pereira

Doença de Parkinson e disfunção mitocondrial: a via Nrf2/ARE como alvo terapêutico

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



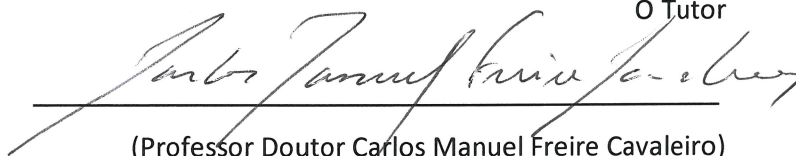
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Alexandra Peixoto Balester Pereira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009553, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de Julho de 2014.

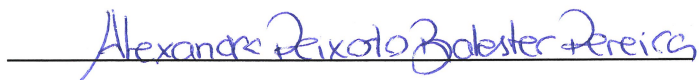
O Tutor



Handwritten signature of Carlos Manuel Freire Cavaleiro in black ink, written over a horizontal line.

(Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro)

A Aluna



Handwritten signature of Alexandra Peixoto Balester Pereira in blue ink, written over a horizontal line.

(Alexandra Peixoto Balester Pereira)

“Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena.”

Fernando Pessoa

Obrigada!

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Cavaleiro, pela ajuda, os conselhos e o incentivo ao longo destes meses de trabalho. Trabalhar com profissionais assim torna a árdua tarefa uma missão muito mais estimulante.

Aos meus amigos e colegas que me acompanharam durante todo este percurso, que me fizeram rir, chorar, errar e aprender...sem eles estes 5 anos não teriam qualquer sentido

Ao Fábio, que entrou comigo nesta aventura desde o início e que percorreu comigo todo este caminho de mãos dadas. Obrigada pelo amigo, pelo companheiro, pelo confidente, por tudo

E por último, mas, obviamente, não menos importante, obrigada pai...mãe...mana....Quaisquer palavras seriam injustas para descrever tamanho agradecimento, admiração e orgulho. Obrigada por me tornarem naquilo que hoje sou...
Obrigada apenas por tudo

A todos os que me acompanharam neste meu percurso, um sincero obrigada!

Índice

Acrónimos	i
Lista de Figuras.....	ii
Resumo.....	1
Abstract	1
1 Introdução:.....	2
2 Doença de Parkinson.....	3
2.1 Conceito	3
2.2 Quadro Clínico.....	3
2.3 Diagnóstico.....	4
2.4 Sintomatologia	5
2.4.1 Sintomas motores:	5
2.4.2 Sintomas não-motores:.....	6
2.5 Epidemiologia.....	7
2.6 Etiologia.....	7
2.7 Tratamento.....	8
3 Mitocôndria.....	9
3.1 Biogénese	10
3.2 Fusão e fissão	10
3.3 Dinâmica da membrana interna	10
3.4 Stresse oxidativo	11
4 Disfunção mitocondrial:	12
4.1 ...na forma idiopática da Doença de Parkinson:.....	12
4.2 ...na forma familiar da Doença de Parkinson:	13
5 Via Nrf2/ARE.....	15
5.1 Nrf2 (<i>nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related transcription factor</i>)	15
5.2 Regulação da activação do Nrf2.....	16
5.3 Genes regulados pela via Nrf2/ARE	17
6 A via Nrf2/ARE e a Doença de Parkinson	19
7 Activadores da via Nrf2/ARE	20
8 Conclusão	22
Bibliografia	23

Acrónimos

6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina

ARE - Antioxidante Response Element

bZip - *Basic leucine-Zipper*

DNAm - DNA mitocondrial

DP - Doença de Parkinson

HO-1 - Heme-Oxigenase-1

Keap1 - *Kelch-like ECH associated protein 1*

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LRRK-2 - *Leucine Rich Repeat Kinase*

MI - Membrana Interna

ME - Membrana Externa

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

Neh - Nrf2-ECH homology

NO - Óxido Nítrico

Nrf2 - *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor*,

PGC - PPAR- γ -co-activator

PINK1 - *(PTEN)- Induced Kinase 1*

RNS - *Reactive Nitrogen Species*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

sMaf - Small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Proteins

SNpc - Substância Nigra pars compacta

SOD - Enzima Superóxido Dismutase

Lista de Figuras

Figura 1: Domínios Funcionais do Nrf2. (Baird and Dinkova-Kostova, 2011)

Figura 2: Domínios Funcionais do Keap1. (Baird and Dinkova-Kostova, 2011)

Figura 3: Controlo redox dos genes da via Nrf2/ARE. (Chakrabarti *et al.*, 2011).

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas mais frequentes em todo o mundo. No entanto, há ainda muitas questões sem resposta sobre qual a sua verdadeira etiologia e quais os mecanismos patológicos subjacentes à doença. Sabe-se que a disfunção mitocondrial desempenha um papel fulcral na patogénese da DP. Esta disfunção leva à produção de espécies reactivas de oxigénio que provocam stress oxidativo e subsequentes danos nos lípidos, proteínas e DNA. Assim, um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio e os danos oxidativos são inerentes ao aparecimento e progressão da DP.

O factor de transcrição Nrf2 (*nuclear factor E2-related factor2*) tem sido estudado como uma opção para contrariar a disfunção mitocondrial e manter o balanço redox. Nrf2 activa o elemento de resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes alvo e são transcritos uma bateria de genes antioxidantes e anti-inflamatórios e vários factores de transcrição envolvidos na dinâmica da mitocôndria. É também demonstrado a neuroprotecção dos neurónios dopaminérgicos da substância nigra pela activação da via Nrf2/ARE.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is one of the most frequent neurodegenerative disorders in the world. However, there are still a lot of unanswered questions about its real etiology and what are the pathological mechanisms underlying disease. It's known that mitochondrial dysfunction play a cardinal role in the pathogenesis of PD. This dysfunction leads to production of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative stress and subsequent damages to lipids, proteins and DNA. Thus, the ROS production and oxidative damages are inherent in the onset and progression of PD.

The transcription factor Nrf2 (*nuclear factor E2-related factor2*) has been studied as an option to counteract mitochondrial dysfunction and to maintain the redox balance. Nrf2 activates the antioxidant response element (ARE) in the promoter region of its target genes and a battery of antioxidants and anti-inflammatory genes and transcription factors involved in mitochondrial dynamic are transcribed.

It's also demonstrated the neuroprotection of nigral dopaminergic neurons by the activation of Nrf2/ARE pathway.

I Introdução:

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva e incurável que afecta sobretudo o movimento. É uma das doenças neurodegenerativas mais frequentes no mundo, seguida da doença de Alzheimer. Clinicamente, consiste num conjunto de défices motores que englobam bradicinesia, instabilidade postural, rigidez e tremor em repouso. Sintomas não motores são verificados na maioria dos doentes, que apresentam distúrbios cognitivos e executivos, bem como depressão.

A DP é caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc) no mesaencéfalo e pela presença de inclusões citoplasmáticas designadas de Corpos de Lewy, constituídos essencialmente por α -sinucleína. Estes estão associados aos sintomas não motores característicos da doença.

A morte dos neurónios dopaminérgicos da SNpc leva à deficiência do neurotransmissor dopamina no estriado e conseqüente desregulação dos circuitos dos núcleos da base, responsáveis pela função motora.

A etiologia da doença permanece ainda uma incógnita na maioria das situações. Pode ter origem em factores ambientais ou uma origem genética, por mutações nos principais genes envolvidos na DP. Sabe-se, no entanto, que a idade é o principal factor de risco associado. Este desconhecimento levou a uma procura de respostas.

O stresse oxidativo provocado pela disfunção mitocondrial, a agregação proteica aberrante e alterações nas vias autofágicas estão envolvidos na progressão da doença. A componente mitocondrial desempenha um papel fulcral no normal funcionamento neuronal e a sua desregulação leva ao aparecimento dos sintomas típicos.

O *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor (Nrf2)* tem sido estudado como uma opção para contrariar a neurodegeneração provocada pelo stress oxidativo. Localiza-se no núcleo e está ligado a um repressor. Após ser activado, liberta-se do seu repressor e transloca-se para o núcleo onde se liga ao ARE (*Antioxidante Response Element*) na região promotora dos genes alvo. O resultado é a expressão de genes citoprotectores incluindo anti-oxidantes, mediadores das respostas inflamatórias e factores de transcrição envolvidos na dinâmica da mitocôndria.

Assim, a activação da via Nrf2/ARE por indutores exógenos pode ser um futuro alvo terapêutico promissor que contraria a disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, a doença de Parkinson.

2 Doença de Parkinson

2.1 Conceito

A DP foi descrita pela primeira vez por James Parkinson numa monografia intitulada como “*An Essay on the Shaking Palsy*” em 1817. Nela o autor descreveu um conjunto de sintomas comuns a 6 pacientes - “*movimentos trémulos involuntários, com pouca força muscular e tendência para dobrar o tronco para a frente e passar de uma caminhada lenta para um passo mais acelerado*” - para os quais, à época, ainda não havia explicação. Mais tarde, Jean Martin Charcot (o “pai da neurologia”) identificou as características clínicas principais desse distúrbio e deu-lhe o nome de Doença de Parkinson, como reconhecimento da descrição feita pelo boticário londrino (Goetz, 2011).

2.2 Quadro Clínico

Actualmente é considerada como uma doença neurológica, progressiva e incurável,(Tufekci et al., 2011) cuja etiologia pode ser genética ou ambiental. A DP é uma doença que afecta essencialmente os circuitos dos núcleos da base e, por isso, a principal consequência é alteração nas funções motoras. São também afectadas as funções cognitivas e comportamentais.

Caracteriza-se fundamentalmente por degeneração dos neurónios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNc) no mesencéfalo, afectando um dos principais circuitos neuronais que passam pelos núcleos da base, o chamado nigroestriado.(Messing, 2007)

A dopamina, principal neurotransmissor afectado, é sintetizada pelos neurónios da substância *nigra pars compacta*, cujos axónios se projectam para o corpo estriado (caudado+putâmen). Este neurotransmissor tem um efeito naturalmente inibitório sobre os neurónios gabaérgicos do estriado, ou seja, a dopamina inibe o efeito do neurotransmissor ácido-gama-aminobutírico (GABA). A neurodegeneração dopaminérgica leva, por um lado a uma perda deste efeito inibitório, e por outro potencia o efeito dos neurónios colinérgicos (acetilcolina, ACh) sobre o GABA. O efeito final é um aumento da actividade gabaérgica e escassez de movimentos (Messing, 2007).

Além da neurodegeneração dopaminérgica, a DP caracteriza-se também pela presença de agregados proteicos conhecidos como Corpos de Lewy(Tufekci et al., 2011). Estes são inclusões intracitoplasmáticas presentes no SNC (tronco cerebral, núcleos da base, espinal-medula), que têm entre 5 a 25 μm de diâmetro, formados principalmente por agregados oligoméricos solúveis de uma proteína denominada como α -sinucleína. Além deste, os Corpos de Lewy contêm também parkina, ubiquitina, e neurofilamentos.

Estas agregações proteicas podem ser promovidas por mutações no gene da proteína α -sinucleína (formas autossómicas dominantes de Parkinson) ou por polimorfismo da mesma (forma idiopática). Podem ser tóxicas para a célula, quer por mecanismos intra ou extracelulares.

Ao nível citoplasmático, algumas espécies oligoméricas desta proteína suprimem o sistema de ubiquitinação, a via autofágica lisossomal e as chaperonas, levando à morte celular por desequilíbrio da homeostase proteica. A nível extracelular podem formar um poro na membrana celular, levando ao aumento do influxo de cálcio, com consequente activação de caspases e morte neuronal (Kalia *et al.*, 2014).

Apesar de serem frequentemente apontados como uma característica pré-sintomática de DP, os Corpos de Lewy, não são necessariamente um sinal de perda neuronal. Autópsias feitas a indivíduos de idade avançada, mostraram a presença de Corpos de Lewy sem características clínicas de DP ou outra doença neurodegenerativa. Isto significa que os Corpos de Lewy não são, por si só, indicativos da doença (Kalia *et al.*, 2014).

2.3 Diagnóstico

Devido à falta de biomarcadores e achados imagiológicos específicos da DP, o diagnóstico é baseado em critérios clínicos. Tremor em repouso, bradicinesia e rigidez muscular são, normalmente, os sintomas principais associados à DP. Aliado à observação desses sintomas exclui-se outros danos neurológicos e historial de fármacos, exposição a agentes tóxicos ou episódios anteriores que possam, eventualmente provocar os mesmos sintomas.

Inúmeros investigadores criaram escalas de avaliação das várias fases da doença, baseadas em sinais clínicos visíveis. A Escala Estágios de Incapacidade de Hoehn e Yahr foi o primeiro conjunto de critérios a ser estabelecido para comparar grupos de doentes e indicar o seu estado geral de forma rápida e prática. Permite avaliar a gravidade da doença e classifica o indivíduo quanto ao nível de incapacidade. Foi criada em 1967 com 6 níveis, sendo que o nível 0 exclui qualquer hipótese de DP e o nível 5 aplica-se a doentes acamados ou em cadeira de rodas. Foi revista mais tarde, acrescentado dois estádios intermédios à escala original (Jankovic, 2008).

Uma das escalas mais estabelecidas para avaliar a incapacidade e progressão da DP é a UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) criada pela MDS (*Movement Disorder Society*). Esta constrói-se baseada num inquérito preenchido pelo doente composto por 4 partes: I) Sintomas não motores na vida diária; II) Sintomas motores na vida diária; III) Exame motor e

IV) Complicações Motoras. Cada uma das perguntas tem quatro níveis de resposta, da menor à maior gravidade (Movement Society Disorder, 2008).

2.4 Sintomatologia

A desregulação dos circuitos dos núcleos da base, que regulam a iniciação, a amplitude e a velocidade dos movimentos, causam distúrbios dos mesmos e precipitam uma série de sintomas motores, como bradicinesia, rigidez muscular e tremor. Já os sintomas não motores, como manifestações cognitivas e psiquiátricas são, normalmente associados às deposições dos Corpos de Lewy.

2.4.1 Sintomas motores:

- **Bradicinesia:** caracteriza-se por uma acentuada lentidão dos movimentos e é um dos principais sintomas da DP. Está intimamente relacionada com uma disfunção ao nível dos gânglios basais e verifica-se por uma dificuldade em planear, iniciar e executar movimentos ou acções sequenciais ou simultâneas. A manifestação inicial começa em movimentos diários que requerem um controlo motor fino como abotoar uma camisa ou usar pequenos utensílios. Outras manifestações incluem a perda de movimentos espontâneos, de gesticulação, pestanejar menos frequente e a falta de coordenação do movimento dos braços com o andar. Apesar de não se saber exactamente qual a fisiopatologia da bradicinesia, sabe-se que é proporcional à perda de dopamina. Os doentes com bradicinesia são incapazes de estimular os músculos apropriados de forma iniciar e manter os movimentos (Jankovic, 2008).

- **Rigidez muscular:** aumento do tónus muscular em descanso, aumento da resistência ao estiramento. Estão envolvidos os músculos flexores e extensores, embora sejam os flexores os mais afectados numa fase inicial da doença. A rigidez pode estar associada a dor; a dor no ombro é uma manifestação inicial frequente da DP e que, normalmente, é subdiagnosticada como artrose ou bursite (Jankovic, 2008).

- **Tremor em repouso:** é um dos sintomas mais frequentes e facilmente reconhecidos na DP. É unilateral, com uma frequência de 4-6 Hz em descanso. Na fase inicial da doença, acontece apenas nas mãos, dando origem ao clássico tremor “*pill-rolling*”. Posteriormente pode estende-se para as pernas e lábios; os músculos axiais raramente são afectados. Por norma, o tremor em repouso desaparece durante uma acção e durante o sono (Jankovic, 2008).

2.4.2 Sintomas não-motores:

Por trás dos sintomas motores típicos que caracterizam a DP, existe um largo espectro de sintomas não-motores desde uma fase precoce da doença, até fases mais avançadas e que são, muitas vezes limitativos da sua qualidade de vida. Os sintomas motores desempenham um papel predominante e quase exclusivo na altura do diagnóstico e do tratamento, sendo a componente não motora desvalorizada e, muitas vezes, não tratada. Calcula-se que cerca de 98% dos doentes têm sintomas não-motores.

Dada a sua importância na qualidade de vida dos doentes, é importante reconhecer estes sinais na altura da entrevista ao doente através, por exemplo, de um questionário de sintomas não motores, internacionalmente reconhecido e validado (Maass and Reichmann, 2013).

- **Disfunção executiva:** relaciona-se com a dificuldade no planeamento estratégico e resolução de problemas, dificuldades de concentração, e incapacidade de controlo de certos comportamentos (iniciar, executar, monitorizar ou suprimir uma sequência de acções). Estes sinais são visíveis durante a realização de testes de função executiva que avaliam a capacidade de planeamento e execução de determinadas acções ou a supressão de determinados comportamentos habituais face a uma situação específica, comparativamente a controlos (pessoas sem doença) (Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009).

- **Distúrbios do sono:** presentes em cerca de 60 a 90% dos doentes, os distúrbios do sono mais frequentes são insónias (inicial e tardia), síndrome das pernas inquietas, apneia do sono e nictúria. Podem surgir também pesadelos durante a fase REM do sono (Maass and Reichmann, 2013).

- **Distúrbios Psiquiátricos:** em pacientes não tratados, a depressão (37%), apatia (27%), distúrbios do sono (18%) e ansiedade (17%) são os sintomas neuropsiquiátricos mais comuns. A depressão ocorre em cerca de 40-50% dos doentes ao longo do curso da doença, mas é comumente subdiagnosticado. (Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009) Está associada a uma progressão rápida dos sintomas motores e aumento da mortalidade. Estão descritos alguns factores de risco para o desenvolvimento da depressão na DP como a gravidade dos distúrbios executivos, sexo feminino, primeiros sintomas e diagnóstico antes dos 40 anos. Os sintomas depressivos são reconhecidos durante todas as fases da doença (Goetz, 2011).

A apatia é falta de motivação e interesse nas actividades em geral. Pode coexistir com depressão ou demência ou ocorrer isoladamente como manifestação major. Ansiedade generalizada, ataques de pânico ou determinadas fobias são também frequentes; nervosismo,

irritabilidade, pensamentos catastróficos, palpitações e hiperventilação fazem parte do quadro psiquiátrico.

- **Outros:** hiposmia (perda de neurónios dopaminérgicos no bolbo olfativo) (Jankovic, 2008), discurso lento e monótono em fases mais tardias, ligeiro arrastar de pé (Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009), salivação excessiva (Goetz, 2011).

2.5 Epidemiologia

A DP é o distúrbio do movimento mais comum em todo o mundo e a segunda doença neurodegenerativa mais frequente a seguir à Doença da Alzheimer. É estimado que 6,3 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de DP. Na Europa os valores apontam para 1,2 milhões de pessoas. (European Parkinson's Disease Association, [s.d.]) A maioria das pessoas desenvolve a doença aos 60 anos de idade numa forma idiopática. No entanto, há uma pequena parte da população em que é diagnosticada a doença em idades mais precoces, normalmente por causas genéticas.

A distribuição global da doença não é uniforme. Isto pode ser explicado por fraco acesso aos cuidados de saúde (subdiagnóstico da doença), factores genéticos e ambientais e diferentes metodologias de estudo epidemiológico. Assim, o maior número de casos é reportado aos caucasianos na Europa e Norte da América; um número intermédio é observado na Ásia e a menor taxa é da raça negra. A DP acomete maioritariamente indivíduos do sexo masculino (World Health Organization, 2006).

O primeiro estudo nacional de avaliação da prevalência da doença foi realizado em 2013 pela Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson, em colaboração com o Ministério da Saúde. O questionário, aplicado a uma amostra de 5 042 indivíduos com 50 anos ou mais, revela que existem cerca de 13 mil pessoas com DP em Portugal (*Estudo inédito revela que existem 13 mil doentes de Parkinson em Portugal*, 2014).

2.6 Etiologia

A etiologia da Doença de Parkinson tem sido um dos principais focos da neurociência nas últimas décadas. Sabe-se hoje que, tanto factores genéticos, como ambientais, contribuem para os primeiros sinais da doença. No entanto, a idade é apontada como o principal factor de risco: a degeneração dos neurónios dopaminérgicos é acompanhada de processos celulares e bioquímicos mais lentos e, por isso, os mecanismos de reparação são cada vez menos eficazes com o passar da idade (Schapira and Jenner, 2011).

Factores que diminuem o risco de desenvolver a doença também podem ser boas “pistas” para concluir acerca da sua etiologia. Sabe-se, por exemplo, que fumadores e consumidores de café têm uma probabilidade significativamente menor de desenvolver DP relativamente aos não consumidores. O efeito neuroprotector não se deve à cafeína ou à nicotina por si só, mas a compostos do café e do tabaco, não se sabendo exactamente o mecanismo de acção (Trinh *et al.*, 2010).

Cerca de 90-95% dos casos diagnosticados com DP são idiopáticos(Hwang, 2013) e podem ser bastantes os factores de risco associados, desde o uso ocupacional de herbicidas (ex: paraquato) ou pesticidas (ex: rotenona) ao uso de solventes orgânicos, toxinas ou mesmo infecções virais ou bacterianas (Schapira and Jenner, 2011).

De entre as principais neurotoxinas mencionadas na patogenia da DP falamos da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). A MPTP é um subproduto da síntese de um derivado opióide sintético da meperidina. O uso ilícito de preparações opióides contaminadas por MPTP na década de 1980 causou vários casos de parkinsonismo (sintomas típicos da DP, mas sem diagnóstico confirmado)(Messing, 2007).

Os restantes 5-10% dos casos são chamados “formas familiares” de DP causadas por vários tipos de mutações em genes envolvidos na doença. (Hwang, 2013) Os principais genes envolvidos são LRRK-2 (*leucine rich repeat kinase*) e α -sinucleína, Parkin , *phosphatase and tension homologue (PTEN)- induced kinase 1 (PINK1)* e DJ1(Zuo and Motherwell, 2013).

Tanto nas formas idiopática como genética, o stresse oxidativo é um mecanismo comum subjacente, que leva à disfunção celular e neurodegeneração. Embora, o mecanismo preciso que gera o stresse oxidativo na DP seja desconhecido, a teoria mais aceite é de que a neurodegeneração resulta de um excesso de radicais livres devido à disfunção mitocondrial (Zuo and Motherwell, 2013).

2.7 Tratamento

A DP continua a ser uma doença progressiva incurável, mas os fármacos hoje disponíveis melhoram substancialmente a qualidade de vida e a capacidade funcional. O mecanismo de acção de grande parte da terapêutica farmacológica não é eliminar as causas da doença, mas atenuar os sintomas (Smith *et al.*, 2012).

Desde a descoberta de que o défice de dopamina nas vias nigro-estriada era a principal causa dos sintomas motores, a terapêutica focou-se em tentar corrigir esses níveis. A introdução de um precursor da dopamina, a levodopa (L-dopa) na década de 60 veio revolucionar o tratamento da doença. Durante cerca de 5 décadas, a L-dopa foi o

tratamento padrão privilegiado para alívio dos sintomas motores, no entanto, constatou-se que essa opção levava a complicações motoras como discinesias, após uso crônico. Estas complicações levaram ao uso de agonistas dos receptores da dopamina (ropinirole, rotigotina, pramipexole), que oferecem efeitos anti-parkinsonianos e não provocam discinesias a longo prazo. Daí serem usados em pessoas mais jovens com DP. Apesar de não provocar efeitos motores, acentuam distúrbios psiquiátricos, gastrointestinais e edema dos tornozelos. Os inibidores das enzimas metabolizadoras da dopamina, incluindo a Monoamina Oxidase (MAO) B e a dopa descarboxilase fazem também parte da terapêutica da DP. Os inibidores da MAO B (seligilina, rasagilina) aumentam os efeitos da dopamina endógena e exógena, enquanto os inibidores da dopa descarboxilase (benserazida, carbidopa) diminuem o metabolismo periférico da L-dopa e permitem a sua passagem pela BHE para ser metabolizada no cérebro. No entanto são menos eficazes que a L-dopa ou os agonistas da dopamina.

Paralelamente à terapêutica dos sintomas motores, é necessário aliar uma terapêutica para os sintomas não motores. O tratamento da depressão, alucinações e demência deve ser especialmente levado em conta dado o elevado número de doentes com este quadro (Smith *et al.*, 2012).

3 Mitocôndria

A mitocôndria é um organelo intracelular com cerca de 1-10 μm (Tufekci *et al.*, 2011) existente na maioria das células eucarióticas e que desempenha um papel imprescindível na homeostase celular. Está dividida em dois compartimentos bem definidos: a matriz, envolvida pela membrana interna (MI) e o espaço intermembranar, rodeado pela MI e pela membrana externa (ME). A mitocôndria contém o seu próprio genoma: duas a dez duplas cadeias de DNA com 16 569 pares de bases, comumente designado por DNA mitocondrial (DNAMt). O DNAMt codifica 22 moléculas de RNA de transferência (tRNAs), 2 moléculas de RNA ribossomal (rRNAs), a 16S e 12S, e 13 proteínas mitocondriais que participam nos complexos respiratórios I, III, IV e V. (Lin, Liou and Chen, 2009) Devido à limitada capacidade codificante do DNAMt, as restantes proteínas da mitocôndria, incluindo aquelas necessárias à sua replicação e síntese de novas proteínas mitocondriais, são codificadas por genes nucleares. (Chakrabarti *et al.*, 2011) As proteínas resultantes da expressão do DNAMt têm uma elevada taxa de mutações cuja reparação é progressivamente comprometida, com o envelhecimento (Lin *et al.*, 2009).

A dinâmica mitocondrial é um processo complexo que envolve a biogénese da mesma, fusão e fissão e uma degradação selectiva, que mantêm a célula viável e bioenergeticamente competente (Laar and Berman, 2010).

3.1 Biogénese

A biogénese da mitocôndria é um processo complexo que requer a multiplicação do DNAMt, proliferação e aumento da mesma. Envolve um rigoroso controlo entre factores genéticos da própria mitocôndria e do núcleo da célula. A família de co-activadores transcripcionais PGC (PPAR- γ -co-activator), nomeadamente o PGC-1 α , interage com factores de transcrição como o factor nuclear respiratório 1 (NRF1), o factor nuclear respiratório 2 (NRF2), ou factor de transcrição A (Tfam), activando-os. (Chakrabarti *et al.*, 2011) Os genes alvos codificam proteínas essenciais à replicação do DNAMt, transcrição e síntese dos componentes da cadeia respiratória (Lin *et al.*, 2009).

A biogénese mitocondrial é induzida quando há stresse oxidativo na célula.

3.2 Fusão e fissão

A fusão e fissão mitocondriais são dinâmicas importantes na manutenção da integridade da mitocôndria, no seu *turn over* e na estabilização e protecção do DNA mitocondrial. O primeiro passo é a fusão da ME, mediadas pelas mitofusinas I e II presentes na superfície da mitocôndria, seguido da fusão da MI, mediada pela OPAI (*optic atrophy protein 1*), que se encontra no seu interior.

Já a fissão é coordenada por duas proteínas: *dynamin-related protein 1* (Drp1) e a *Fission 1* (Fis1), que interagem entre si, formando uma estrutura em espiral que envolve e divide a mitocôndria (Lim *et al.*, 2012).

É nos neurónios que a fusão e a fissão desempenham uma importância particular, dado serem células com elevada necessidade de energia. Esta dinâmica mitocondrial permite gerar mitocôndrias bioenergeticamente mais activas e eliminar regiões ou a própria mitocôndria não funcional (Laar and Berman, 2010).

3.3 Dinâmica da membrana interna

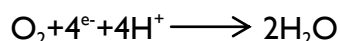
A mitocôndria desempenha um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol e nucleótidos. No entanto, a sua principal função é o metabolismo energético, nomeadamente a β -oxidação de ácidos gordos, ciclo de

Krebs e produção de ATP, através da cadeia respiratória (Ferreira, Aguiar and Vilarinho, 2008).

Os componentes da cadeia respiratória, localizados na MI da mitocôndria, dividem-se em quatro complexos: o complexo I (NADH-ubiquinona oxiredutase), o complexo II (succinato-ubiquinona oxiredutase) o complexo III (ubiquinol-citocromo C oxiredutase) e o complexo IV (citocromo C oxiredutase). Estes complexos, na presença de mais dois transportadores de electrões (ubiquinona e citocromo C) oxidam o NADH e FADH₂, provenientes de outras vias aeróbias, e transportam os electrões para o aceitador final, o oxigénio. Durante o transporte de electrões ao longo dos vários transportadores, libertam-se iões H⁺ para o espaço intermembranar, criando um potencial electroquímico de membrana e que vai ser utilizado na síntese de ATP a partir de ADP e Pi. Este processo de fosforilação do ADP dá-se no complexo V ou ATP sintase e forma o sistema de fosforilação oxidativa (Ferreira *et al.*, 2008).

3.4 Stresse oxidativo

Durante a fosforilação oxidativa, os electrões são transferidos para o oxigénio molecular, considerado o aceitador final de electrões. Graças ao seu potencial oxidante (+800 mV) é reduzido a água através de etapas subsequentes de redução por um electrão, num total de quatro etapas. Esta reacção de redução a H₂O tem lugar no complexo IV, por meio de citocromo oxidases (Grivennikova and Vinogradov, 2013).

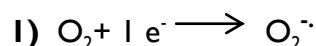


Cerca de 90% do oxigénio consumido é totalmente reduzido a água, no entanto, uma pequena parte é reduzida apenas parcialmente, e produz aquilo a que se chamam espécies reactivas de oxigénio (ROS's). (Grivennikova and Vinogradov, 2013) As ROS's são moléculas altamente reactivas com electrões desemparelhados. As células produzem pequenas quantidades de ROS de forma a controlar os processos fisiológicos normais incluindo respostas do sistema imunitário, estimulação de factores de crescimento e respostas anti-inflamatórias (Kumar, Lim, *et al.*, 2012).

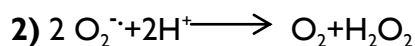
O problema surge quando a quantidade de ROS's produzida é superior à quantidade de antioxidantes endógenos. Neste caso gera-se o chamado stresse oxidativo. As ROS podem ter várias origens, mas a mitocôndria é sem dúvida, a maior fonte de produção intracelular (Kumar, Lim, *et al.*, 2012).

Os principais ROS produzidos na mitocôndria são radical anião superóxido (O₂⁻·), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radical hidroxilo (OH·). São gerados por redução do

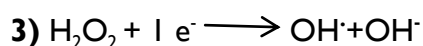
oxigénio molecular por um, dois ou três electrões, respectivamente, ou por reacções sucessivas a partir de um dos ROS :



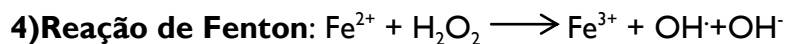
O radical anião superóxido é considerado o ROS “primário”, por resultar da redução do O_2 por um único electrão;



A reacção seguinte dá origem ao H_2O_2 por acção da enzima superóxido dismutase (SOD). A pH não fisiológico é reduzido de forma não enzimática, por acção de metais de transição;



A redução por um electrão do H_2O_2 forma o radical hidroxilo (Chinta and Andersen, 2009);



Na presença de metais reduzidos, como o Fe^{2+} , o H_2O_2 pode ser reduzido a radicais hidroxilo, numa reacção conhecida como Reacção de Fenton (Chinta and Andersen, 2009). O radical hidroxilo é a espécie de oxigénio mais reactiva, mas pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 participarem na sua formação, também estes são chamados de espécies reactivas de oxigénio (Grivennikova and Vinogradov, 2013).

Além dos ROS, também as espécies reactivas de nitrogénio (RNS), incluindo o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($\text{NO}_3^{\cdot-}$) contribuem para a geração de radicais livres.

As ROS reagem de forma não específica com ácidos nucleicos, proteínas e membranas lipídicas. Nas membranas causam peroxidação lipídica, levando à alteração da permeabilidade das mesmas; causam alterações proteicas com oxidação dos grupos tiol e formação de grupos carbonilo com consequente activação/desactivação de sistemas enzimáticos; mutações no DNA com alteração da expressão genética. Todas estas alterações causam danos celulares que contribuem para a patogénese da DP. (Kumar, Lim, et al., 2012).

4 Disfunção mitocondrial:

4.1 ...na forma idiopática da Doença de Parkinson:

Tal como já referido, a maioria dos casos de DP não têm uma causa completamente esclarecida (forma idiopática). Acredita-se que seja provocado por causas multifactoriais, com combinação de factores ambientais e genéticos. Várias são as toxinas, cuja exposição pode levar ao desenvolvimento de DP.

Na década de 1980, toxicodependentes nos Estados Unidos desenvolveram sintomas semelhantes aos da DP após uso intravenoso de MPTP, um subproduto gerado acidentalmente durante a síntese de meperidina.

Graças à sua lipofilia, o MPTP atravessa a barreira hemato-encefálica e é oxidado à sua forma tóxica, o MPP⁺ (ião 1-metil-4-fenilpiridínio) pela monoamina oxidase, tipo B (MAO-B). Rapidamente se acumula na mitocôndria dos neurónios dopaminérgicos, via transportadores da dopamina, inibindo o complexo I da cadeia respiratória. Como consequência, a produção de ATP fica diminuída, enquanto aumenta a produção de ROS e RNS. Em última análise, activa os membros da família Bcl-2, p53 e caspases, levando à morte neuronal. O seu mecanismo molecular levou a comunidade científica a questionar o papel do complexo I da cadeia respiratória em doentes com DP (Winklhofer and Haass, 2010).

O paraquato é um herbicida que, tal como o MPP⁺, inibe o complexo I da cadeia respiratória, mas que não entra nos neurónios através de transportadores da dopamina, nem se liga aos seus receptores. Não se sabe ainda exactamente qual o mecanismo pelo qual se acumula nos neurónios da substância *nigra* SN. A sua capacidade de induzir a produção de ROS é cerca de 10 vezes superior ao do MPP⁺.

A rotenona é outro inibidor do complexo I da mitocôndria: *in vitro* inibe a oxidação do piruvato e outros substratos fisiológicos, com consequente decréscimo da síntese de ATP na mitocôndria. Modelos animais administrados com rotenona, mostraram características bioquímicas e comportamentais semelhantes a humanos com DP: morte irreversível de neurónios dopaminérgicos e formação de inclusões citoplasmáticas semelhantes aos Corpos de Lewy (ao contrário da toxicidade induzida por MPP⁺, em que não se encontram Corpos de Lewy).

Os três compostos levam à disfunção mitocondrial e consequente morte dos neurónios por 1) inibição do complexo I, 2) défice bioenergético, 3) diminuição de ATP e 4) morte celular (Winklhofer and Haass, 2010).

4.2 ...na forma familiar da Doença de Parkinson:

Nos últimos anos, têm sido reconhecidas algumas formas raras da DP, cuja etiologia se relaciona com mutações genéticas. Esta “forma familiar” de DP constitui apenas 10% do total de casos da Parkinson e a identificação dos genes mutados tem constituído o maior impulso na descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos na patogénese da doença. A mutação desses genes, cujas proteínas são importantes na dinâmica da mitocôndria, como a sua biogénese, fissão e fusão, causa défices que levam à diminuição da produção de ATP e, em

última instância, à morte celular. Seguem-se, sumariamente, os 5 genes associados à DP que têm sido sugeridos como tendo um papel directo ou indirecto na disfunção mitocondrial na patogénese da doença:

- **α -sinucleína:** é uma proteína solúvel, expressa predominantemente no SNC, ao nível dos terminais pré-sinápticos. Mutações *missense* no gene da α -sinucleína (SNCA) afectam a sua conformação nativa e estão na origem de formas raras autossómicas dominantes de DP. É o principal constituinte dos Corpos de Lewy na forma de agregados fibrilares e está presente noutras doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer. Esta proteína é tida como um componente major na patogénese da doença. O mecanismo pela qual α -sinucleína induz neurodegeneração pode envolver várias vias incluindo a própria agregação e a sua ligação a proteínas chaperonas (envolvidas na regulação do crescimento celular e no normal desenvolvimento neuronal), inibindo-as. Sabe-se também que a sua sobre-expressão aumenta a sensibilidade dos neurónios ao stresse oxidativo e a toxinas como o MPTP (Recchia *et al.*, 2004).

- **Parkin:** o gene que codifica a parkin foi identificado em 1998 como gene que causa a forma autossómica recessiva da DP. Parkin funciona como E3 ubiquitina liagase :contem um domínio designado *ubiquitin-like* (UBL) que se liga ao proteossoma 26S, catalisando a ubiquitinação de proteínas danificadas. Assim, mutações na Parkin levam a alterações na resposta ao *stress* proteico, com consequente acumulação dos seus substractos e morte dos neurónios na SNpc. Tem impacto na função da mitocôndria: modelos de *Drosophila* com o gene de parkin mutado mostraram um tempo de vida mais curto e apoptoses excessivas (Mandemakers, Morais and Strooper, De, 2007).

- **PINK-1 (*PTEN-induced putative kinase-1*):** o gene que codifica esta proteína está ligado à forma autossómica recessiva da DP. PINK-1 é uma proteína cinase, pouco solúvel, com tendência para agregar, o que explica a sua presença em cerca de 10% dos Corpos de Lewy (29). Pode ser encontrada tanto na MI como na ME da mitocôndria ou até no citoplasma. Neurónios dopaminérgicos de modelos de ratos *knock-out* da proteína, apresentaram sensibilidade aumentada ao uso de MPTP; outros modelos com a função da proteína diminuída demonstraram danos na mitocôndria: alteração da sua morfologia e dinâmica, diminuição do potencial de membrana e alterações na cadeia respiratória. Os mecanismos de protecção da integridade da mitocôndria mediados pela PINK1 ainda não são completamente esclarecidos. Sabe-se que outros genes como DJ-1 e Parkin actuam em paralelo com PINK-1 para conferir protecção à célula (Exner *et al.*, 2012).

- **DJ-1:** é uma proteína homodimérica localizada no espaço intermembranar e na matriz da mitocôndria. Uma mutação no gene desta proteína (PARK7) causa uma forma rara autossómica recessiva de DP. A sobre-expressão desta proteína protege as células da morte celular induzida pelo stress oxidativo, actuando como uma espécie de sensor redox. Sabe-se que actua por inibição da ligação do Nrf2 ao seu inibidor, Keap1, e consequente ubiquitinação. Esta proteína está constitutivamente presente no líquido cefalorraquidiano (LCR) e pode ser utilizado como um potencial biomarcador da doença; vários grupos de pesquisa mediram os níveis desta proteína, em combinação com α -sinucleína no LCR e detectaram padrões específicos em doentes com PD. Estas medições mostraram-se altamente sensíveis na diferenciação de outras doenças neurodegenerativas (Clements *et al.*, 2006).

- **LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2):** mutações no gene LRRK2 são a causa mais comum de DP familiar; são associadas a formas autossómica dominantes, de início tardio. É uma proteína constituída 5 domínios que funcionam conjuntamente para regular múltiplas vias de sinalização importantes para o normal funcionamento neuronal. LRRK2 é o único gene relacionado com a DP que, devido a uma mutação *missense*, G2019S, determina não apenas a forma familiar mas também a forma idiopática de DP (cerca de 3% dos casos). Por ser o gene mais envolvido na forma familiar de doença, uma vez que a maioria das formas familiares de DP resulta de uma mutação neste gene, LRRK2 tem surgido como um alvo terapêutico no combate à doença (Gandhi, Chen and Wilson-Delfosse, 2009).

5 Via Nrf2/ARE

5.1 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related transcription factor)

Para manter o balanço redox fisiológico, as células estão equipadas com mecanismos de regulação endógenos, que são estimulados em casos de stress oxidativo e levam à produção de enzimas de regulação. A activação do factor de transcrição Nrf2, é um desses mecanismos e responde aos ROS por activação da transcrição de enzimas de metabolização de fase II. Ao ser activado, liberta-se do seu repressor e sofre translocação para o núcleo, onde se liga ao ARE na região promotora dos genes alvo.

O Nrf2 é um factor de transcrição bZip (*basic leuzine-zipper*) e pertence à família de proteínas reguladoras *Cap'n'Collar*; foi descrito pela primeira vez por Moi *et al.* em 1994 (Moi *et al.*, 1994).

Este factor de transcrição é constituído por 605 aminoácidos e está dividido em 6 domínios funcionais, Neh 1-6 (*Nrf2-ECH homology*):

- Neh 2 é o domínio N-terminal de regulação negativa ao qual se liga o Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein 1*), uma proteína do citoplasma que em condições de não-stress promove a sua ubiquitinação.
- Neh 4 e Neh 5, são domínios de activação transcripcional que se ligam a um outro co-activador, o CBP, levando à transactivação dos genes alvo. (Zhang, 2006).
- Neh6, na parte central da molécula, regula também o *turn over* do Nrf2 em situações de stresse celular, de uma forma independente do Keap1 (McMahon *et al.*, 2004).
- Neh1 compreende três regiões distintas, a região CNC, homóloga entre todos os membros da família NF-E2, a região de ligação ao DNA (bZip), que promove a ligação no núcleo a factores de transcrição da mesma família, as sMaf (*small musculoaponeurotic fibrossarcoma proteins*) e a região de heterodimerização do Nrf2. (Moi *et al.*, 1994).
- Neh3, na região C-terminal. Modula a transactivação dos genes derivados de ARE, em paralelo com os domínios Neh4 e Neh5. É um domínio de interacção proteína-proteína, uma vez que a este se ligam o coactivador CHD6, que potencia a actividade deste domínio (Nioi *et al.*, 2005).

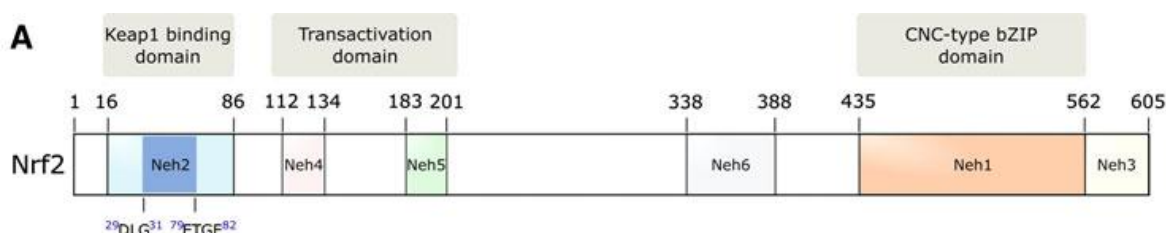


Figura 1: Domínios Funcionais do Nrf2. (Baird and Dinkova-Kostova, 2011) O Nrf2 é composto pelos domínios Neh2 (ligação ao Keap1), Neh4 e Neh5 (activação transcripcional), Neh6 (controlo do Nrf2 independente do Keap1), Neh1 (domínio de ligação bZip ao DNA e de heterodimerização) e Neh3 (ligação ao coactivador CHD6).

5.2 Regulação da activação do Nrf2

Várias são as conclusões de que a actividade basal do Nrf2, bem como a magnitude da sua activação em resposta ao stresse, é estritamente controlada. A questão que tem sido estudada é como é que o Nrf2 é activado e se desloca para o núcleo para se ligar ao ARE.

O modelo mais aceite para a regulação da via Nrf2/ARE é o modelo de estabilização do factor de transcrição, proposto por Baird e Dinkova-Kostova (2011). Este modelo sugere que, em condições homeostáticas, o Nrf2 está ligado ao Keap no citoplasma; o complexo Keap1-Nrf2 serve de substrato à Culina 3 (Cul 3-based E3 ligase), que utiliza o Nrf2 para ubiquitinação e degradação no protossoma 26S (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Assim, o Keap 1 é considerado um repressor do Nrf2. É uma proteína de 624 aminoácidos, constituída por 3 domínios fundamentais: o domínio BTB (*Broad-Complex, Tramtrack, e Bric-à-Brac*) de dimerização e recruta da Culina 3; domínio IVR (*Intervening region*), rico em cisteína que funciona como sensor redox, e o domínio Kelch, responsável pela ligação do Keap 1 às regiões DLG e ETGE, do domínio Neh2 do Nrf2 (Kobayashi *et al.*, 2006).

Quando a célula é exposta a ROS ou compostos electrofilicos, a ligação Keap1-Nrf2 é quebrada, por modificações nas cisteínas do domínio IVR, e o Nrf2 é translocado para o núcleo. No núcleo, o Nrf2 hetrodimeriza com uma sMaf e liga-se ao ARE. A formação deste complexo leva à transcrição de genes de protecção celular (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Outros mecanismos de regulação da actividade do Nrf2, independentes do Keap1, têm sido estudados nos últimos anos, por exemplo, regulação do Nrf2 por interação com novas proteínas ou regulação epigenética da sua expressão (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014).

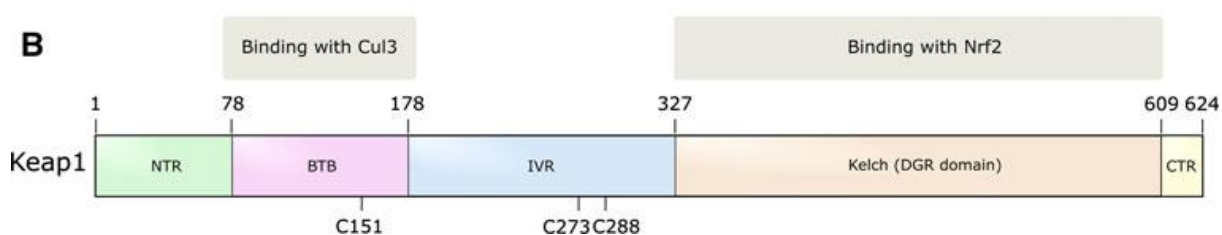


Figura 2: Domínios Funcionais do Keap1. (Baird and Dinkova-Kostova, 2011) O Keap1 é composto por 3 domínios principais: o BTB (ligação à Cul3), IVR (a sua modificação altera a ligação ao Nrf2) e Kelch (local de ligação ao Nrf2).

5.3 Genes regulados pela via Nrf2/ARE

Uma ampla gama de genes citoprotectores com funções anti-oxidantes, proteínas envolvidas na síntese e regeneração da glutathiona e proteínas de fase II do metabolismo de xenobióticos são transcritos pela activação da via Keap1-Nrf2-ARE.

Itoh *et al* (2000) (Itoh *et al.*, 1997) fizeram um estudo com macrófagos peritoneais de murganhos expostos a agentes electrofilicos e ROS e observaram indução de transcrição de genes como heme-oxigenase-I (HO-1), e a peroxiredoxina MSP23 (Ishii *et al.*, 2000).

Assim, de uma forma geral, as enzimas reguladas pelo Nrf2 incluem enzimas de regulação redox [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxina (Prdx)], síntese e metabolismo da glutathiona [glutathiona peroxidase (Gpx), glutathiona reductase (GR)], reciclagem da quinona [NAD(P)H quinona oxiredutase (Nqo1)] e homeostase do ferro [

heme oxigenase (HO-1), ferritina]. Alguns destes antioxidantes têm papéis mais activos que outros no cérebro, dependendo da condição da doença, do ambiente celular e tipo de célula (Joshi and Hhonsoon, 2012).

A NAD(P)H- quinona oxiredutase (Nqo1) é uma flavoproteína que catalisa a redução da quinona a hidroquinona, evitando que as quinonas sejam reduzidas a radicais semiquinona e, conseqüentemente, produzam ROS. Foi observado que, neste tipo de doentes, os níveis de expressão de Nqo1 na substância nigra *pars compacta*, estão aumentados como forma de resposta adaptativa à sua potencial acumulação (Dinkova-Kostova and Talalay, 2011).

A enzima heme-oxigenase (HO-1) catalisa a degradação do grupo heme a biliverdina, a qual por sua vez é reduzida a bilirrubina. Tanto a biliverdina como a bilirrubina mostram propriedades antioxidante e imunomoduladora (Joshi and Hhonsoon, 2012).

O sistema glutathiona é composto pela glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG); A GSSG é reciclada a GSH pela glutathiona redutase (GR). GSH é largamente reconhecida como um anti-oxidante endógeno não enzimático e um captador de radicais livres e, portanto, crítico para manter o ambiente celular reduzido e proteger a célula de danos oxidativos. Os níveis de GSH podem estar reduzidos em algumas áreas do SNC em várias doenças neurodegenerativas com o concomitante aumento dos níveis de GSSG, levando a um aumento do stresse oxidativo.

A glutathiona-S-transferase (GST) é uma enzima chave que catalisa a conjugação de vários electrófilos e outros xenobióticos ao GSH. Estes GSH-S-conjugados são removidos das células pela MRP-1 (*multidrug resistance protein-1*). Esta proteína faz parte integrante da membrana plasmática e exporta os conjugados de glutathiona para fora da célula de uma forma ATP-dependente (Joshi and Hhonsoon, 2012).

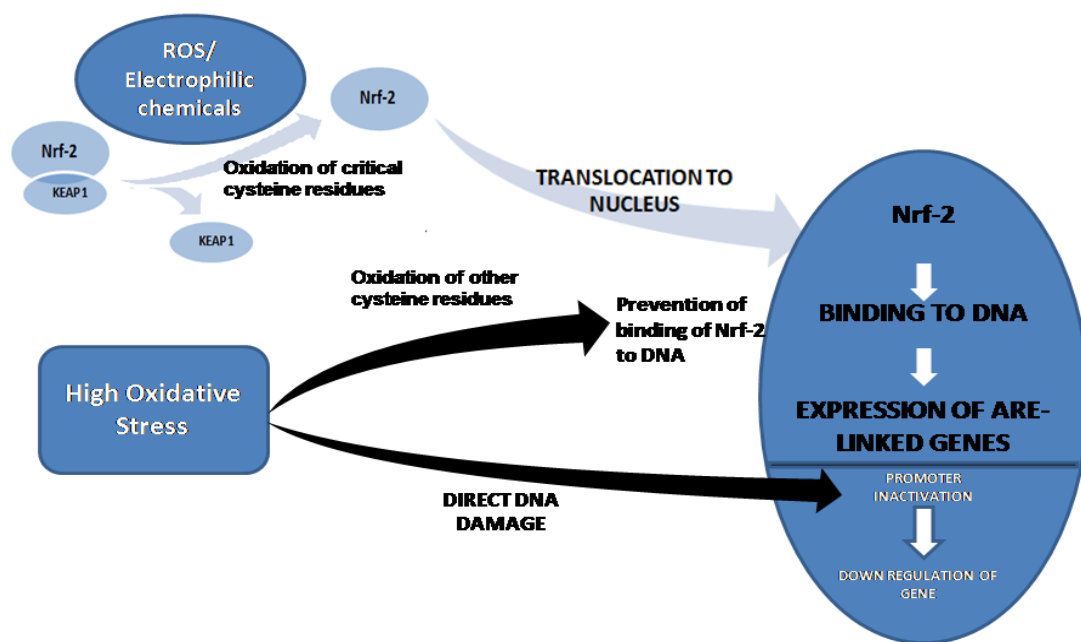


Figura 3: Controlo redox dos genes da via Nrf2/ARE. (Chakrabarti *et al.*, 2011). O stresse oxidativo activa a via Nrf2/ARE por destabilização da ligação Keap1-Nrf2, libertando o segundo. O Nrf2 é translocado para o núcleo e inicia-se a transcrição dos genes dependentes da via.

6 A via Nrf2/ARE e a Doença de Parkinson

Através do uso de inúmeros modelos expostos a agentes tóxicos, as conclusões são de que murganhos Nrf2 *-/-* são mais sensíveis a danos oxidativos. Estudos mostram que tecidos cerebrais de cadáveres com DP apresentam níveis aumentados de enzimas derivadas da via Nrf2/ARE com a Nqo1 e HO-1. A primeira evidência surgiu num estudo de autópsia, que examinou a expressão e a localização do Nrf2 em neurónios de tecidos cerebrais de doentes com DP: a conclusão foi de que o Nrf2 está aumentado na SN nestes doentes, mesmo que esse aumento não seja suficiente para proteger os neurónios da degeneração.

Bogdanov *et al.* estudaram, em doentes com e sem DP, possíveis biomarcadores fulcrais no diagnóstico. Entre eles, foram encontrados níveis aumentados de GSH em doentes com DP. Este aumento do GSH, sintetizado pela via Nrf2/ARE pode ser interpretado como uma resposta neuronal adaptativa a estímulos oxidativos (Bogdanov *et al.*, 2008).

A questão que tem sido levantada é se neurónios e células da glia têm o mesmo efeito neuroprotector na activação da via Nrf2/ARE. Uma análise *microarray* feita para avaliar o potencial de neuroprotecção das células da glia *versus* neurónios utilizou a tBHQ (*tert* butilhidroquinona) e o sulfurano como activadores da via Nrf2/ARE. Nesta análise observou-se que a activação da mesma e a expressão genética se dão maioritariamente nos

astrócitos em vez dos neurónios. Conclui-se então que a activação da via Nrf2/ARE nos astrócitos confere protecção aos neurónios vulneráveis. (Kraft, Johnson and Johnson, 2004)

A ligação entre a via Nrf2/ARE e a DP tem também sido estudada com modelos animais *in vivo* com DP induzido por neurotoxinas. Jakel, *et al*, mostraram que a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma espécie reactiva oxidante e inibidora do complexo I e IV da cadeia respiratória, em combinação com outros factores oxidativos, activa a via Nrf2/ARE tanto *in vivo* como *in vitro*. Também a tBHA activa a mesma via, por estabilização do Nrf2, mas com um potencial indutor muito maior que a primeira. Para calcular o nível de protecção da via Nrf2/ARE contra a 6-OHDA, foi feito um transplante de astrócitos infectados com adeno-Nrf2 em cérebros de murganhos e tratados depois com 6-OHDA. Verificou-se que a via Nrf2-ARE era significativamente activada nestes astrócitos (Jakel *et al.*, 2008).

Chen *et al*, estudaram o efeito neuroprotector da via Nrf2/ARE em murganhos com DP induzida pelo MPTP, e qual o papel dos astrócitos nesta protecção. Neste estudo serviram-se de murganhos Nrf2 +/+ e Nrf2-/- transgénicos que expressavam uma enzima codificada por um gene com a sequência ARE na sua região promotora. Depois de injectados com MPTP, conclui-se que os modelos Nrf2-/- apresentam mais sensibilidade ao MPTP. De seguida estudaram o potencial neuroprotector dos astrócitos. Após injeção com MPTP, verificou-se que os astrócitos eram menos sensíveis aos efeitos do MPTP, comparativamente às restantes células. Estes resultados demonstram que, por si só, os astrócitos que sobreexpressam Nrf2, são suficientes na protecção contra os danos do MPTP e que a via Nrf2/ARE (por meio dos astrócitos) tem um papel crucial na dinâmica microglial (Chen *et al.*, 2009).

7 Activadores da via Nrf2/ARE

Os dados anteriores sugerem que a activação do Nrf2 nos astrócitos confere uma protecção significativa nos neurónios *in vitro* e que compostos que activem esta via podem ser eficazes na prevenção de morte celular. Além da tBHQ e do sulfurano supracitados, existem outros fármacos que estão em fase de teste.

- **Terpenóides:**

Os triterpenóides naturais são uma importante base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Derivados sintéticos de triterpenóides, análogos do ácido oleanólico, são conhecidos por activarem a via Nrf2/ARE. (Kumar, Koppula, *et al.*, 2012)

Recentemente, Yang *et al*, estudaram o efeito neuroprotector de um triterpenoide sintético designado de CCDO metilamida (2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oic acid) -

CCDO-MA. Neste estudo usaram modelos de ratos com DP induzida por ácido nitropropiónico e MPTP e constataram que este composto atenua a neurodegeneração dopaminérgica nigrostriatal, a peroxidação lipídica e acumulação de α -sinucleína (Yang *et al.*, 2009).

- **Compostos electrofílicos:**

Nem todos os agentes electrofílicos são capazes de regular a actividade da via Nrf2/ARE. A maioria dos compostos electrofílicos é representada por enonas ou catecois. Os compostos NEPP (*electrophilic neurite outgrowth-promoting prostaglandin*) são um exemplo de enonas bem estudado, captados principalmente pelos neurónios (em parte, graças á sua lipofilia) e que se ligam ao Keap1. Ao ligarem-se ao Keap1 inibem a ubiquitinização do Nrf2 e permitem que este se desloque para o núcleo (Kumar, Koppula, *et al.*, 2012). Satoh *et al* estudaram o NEPP com um indutor de enzimas de fase II, nomeadamente HO-1, por meio da activação da via Nrf2/ARE. A activação da via foi demonstrada *in vitro* em modelos expostos à toxicidade do glutamato e *in vivo* em modelos cerebrais com isquémia ou défices na perfusão sanguínea, em concentrações não tóxicas de NEPP. Os resultados mostraram que a activação da via e consequente indução da HO-1 é suficiente para prevenir a morte celular e, uma vez que o NEPP se acumula principalmente nos neurónios, este pode ser um factor chave na terapêutica contra doenças neurodegenerativas e Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC) (Satoh *et al.*, 2006).

A tert-butil hidroquinona é outro composto electrofílico do tipo catecol. Ao contrário do NEPP, activa a via Nrf2/ARE nos astrócitos e os seus efeitos citoprotectores são essencialmente nestas células.

Uma abordagem para o tratamento de doenças crónicas neurodegenerativas é o estudo de fármacos pro-electrofílicos: não reactivos fora do local de acção mas que se convertem com compostos electrofílicos (Kumar, Koppula, *et al.*, 2012).

Além destes há ainda outros compostos que são já usados como anti-parkinsónicos e sobre os quais têm sido feitos estudos que comprovam a sua relação com a via Nrf2/ARE. Um deles é a Apomorfina (Apo), um agonista dos receptores da dopamina, que promove a translocação do Nrf2 para o núcleo e induz a expressão do HO-1 de uma forma dose-dependente. Outro exemplo é a bromocriptina, também com indicação neurológica para a DP, é um agonista da dopamina que diminui os défices motores por activar o receptor D2 da dopamina; induz a expressão da NED(P)H quinona oxiredutase-1 (Nqo1) e aumenta a sua actividade. Além disso também induz a expressão do Nrf2 e a sua translocação para o núcleo (Vries, *de et al.*, 2008).

8 Conclusão

As doenças neurodegenerativas constituem umas das áreas mais estimulantes e desafiadoras no campo de investigação. As incógnitas são bastantes e, apesar da pesquisa intensiva, há ainda uma série de desafios que têm que ser superados e respostas que urgem em surgir. A DP é uma doença neurodegenerativa com relativa prevalência em Portugal e no mundo e, apesar de descrita pela primeira vez em 1817, continua sem uma terapêutica que leve à cura.

Como evidenciado já por várias análises de tecidos em autópsias e modelos *in vivo* e *in vitro* Nrf2 *knock-out*, a disfunção mitocondrial desempenha um papel central na DP, levando ao stress oxidativo, danos no DNA e alteração da dinâmica interna da mitocôndria. Assim, agentes terapêuticos que tenham como alvo a mitocôndria são compostos promissores no tratamento da doença.

Mecanismos que estimulem a produção de anti-oxidantes endógenos e induzam a biogénese e fusão/fissão mitocondrial mostraram ser mais eficazes no controlo e regressão da doença comparativamente a estratégias terapêuticas antioxidantes exógenas ou à tentativa de reposição dos níveis de dopamina perdidos pela neurodegeneração.

A via Nrf2/ARE, por ser activada na presença de ROS, desempenha um papel importante na homeostase redox das células. O facto de promover a transcrição de genes fulcrais no combate ao stress oxidativo e ser regulado por mecanismos endógenos que funcionam como uma espécie de sensor redox fazem desta via uma via de excelência na procura de soluções.

Além de ser activada por ROS, também pode ser activada por compostos sintéticos, o que viabiliza a sua utilização na terapêutica.

Apesar do caminho ainda ser longo, a descoberta de uma nova visão terapêutica na cura para a DP está cada vez mais próxima e esse será, certamente, um dos pontos altos na área das neurociências.

Bibliografia

BAIRD, L.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. - The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. **Archives of toxicology**. . ISSN 1432-0738. 85:4 (2011) 241–72. doi: 10.1007/s00204-011-0674-5.

BOGDANOV, M.; MATSON, W. R.; WANG, L.; MATSON, T.; SAUNDERS-PULLMAN, R.; BRESSMAN, S. S.; BEAL, M. F. - Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain: a journal of neurology**. . ISSN 1460-2156. 131:Pt 2 (2008) 389–96. doi: 10.1093/brain/awm304.

CHAKRABARTI, S.; MUNCHI, S.; BANERJEE, K.; THAKURTA, I.G.; SINHA, M.; BAGH, M. B. - Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation. **Aging and disease**. . ISSN 2152-5250. 2:3 (2011) 242–56.

CHEN, P.; VARGAS, M. R.; PANI, A. K.; SMEYNE, R. J.; JOHNSON, A. D.; KAN, Y. W.; JOHNSON, J. A.. - Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 38 (2009) 1–6.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. - Redox Imbalance in Parkinson's Disease. **Biochimica et biophysica acta**. 1780:11 (2009) 1362–1367. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.02.005.Redox.

CLEMENTS, C. M.; MCNALLY, R. S.; CONTI, B.J.; MAK, T. W.; TING, J. P. Y. - DJ-1, a cancer and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 103:41 (2006) 15091–15096.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. - NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. **Archives of biochemistry and biophysics**. 501:1 (2011) 116–123. doi: 10.1016/j.abb.2010.03.019.NAD(P)H.

Estudo inédito revela que existem 13 mil doentes de Parkinson em Portugal - [Em linha], atual. 2014. [Consult. 11 jul. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://visao.sapo.pt/estudo-inedito-revela-que-existem-13-mil-doentes-de-parkinson-em-portugal=f774558>.

EUROPEAN PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATION - **Prevalence of Parkinson's disease** [Em linha] [Consult. 11 jul. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://www.epda.eu.com/en/parkinsons/life-with-parkinsons/part-1/prevalence-of-parkinsons-disease/>.

EXNER, N.; LUTZ, A. K.; HAAS, C.; WINKLHOFER, K. F. - Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. **The EMBO journal**. . ISSN 1460-2075. 31:14 (2012) 3038–62. doi: 10.1038/emboj.2012.170.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. - Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. **Arquivos de Medicina**. 22:2/3 (2008) 49–56.

GANDHI, P. N.; CHEN, S. G.; WILSON-DELFOSE, A. L. - Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience research**. . ISSN 1097-4547. 87:6 (2009) 1283–95. doi: 10.1002/jnr.21949.

GOETZ, C. G. - The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. . ISSN 2157-1422. 1:1 (2011) a008862. doi: 10.1101/cshperspect.a008862.

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. - Mitochondrial production of reactive oxygen species. **Biochemistry. Biokhimiia**. . ISSN 1608-3040. 78:13 (2013) 1490–511. doi: 10.1134/S0006297913130087.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. - The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. **Trends in biochemical sciences**. . ISSN 0968-0004. 39:4 (2014) 199–218. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.

HWANG, O. - Role of Oxidative Stress in Parkinson ' s Disease. **Experimental Neurobiology**. 22:1 (2013) 11–17.

ISHII, T.; ITOH, K.; TAKAHASHI, S.; SATO, H.; YANAGAWA, T.; KATOH, W.; BANNAI, S.; YAMAMOTO, S. - Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. **Journal of biological chemistry**. . ISSN 00219258. 275:21 (2000) 16023–16029. doi: 10.1074/jbc.275.21.16023.

ITOH, K.; CHIBA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; KATOH, Y.; OYAKE, T.; HAYASHI, N.; SATOH, K.; HATAYAMA, I.; YAMAMOTO, M.; NABESHIMA, Y. - An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and biophysical research communications**. . ISSN 0006-291X. 236:2 (1997) 313–22.

JAKEL, R. J.; TOWNSEND, J. A.; KRAFT, A.D.; JOHNSON, J. A. - Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. **Brain Research**. 608 (2008) 192–201.

JANKOVIC, J. - Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**. . ISSN 1468-330X. 79:4 (2008) 368–76. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.

JOSHI, G.; HONSON, J. A. - The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**. 7:3 (2012) 218–229.

KALIA, L. V.; KALIA, S. K.; MCLEAN, P. J. ; LOZANO, A. M.; LANG, A. E. - Alpha-Synuclein oligomers and clinical implication for Parkinson disease. 73:2 (2014) 155–169. doi: 10.1002/ana.23746.

KOBAYASHI, A.; KANG, M.; WATAI, Y.; TONG, K. T.; SHIBATA, T.; UCHIDA, K.; YAMAMOTO, M. - Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1 Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. **Molecular and Cellular Biology**. 26:1 (2006) 221–229. doi: 10.1128/MCB.26.1.221.

KRAFT, A. D.; JOHNSON, D. A; JOHNSON, J. A - Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. . ISSN 1529-2401. 24:5 (2004) 1101–12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3817-03.2004.

KUMAR, H.; LIM, H.; MORE, S. V.; KIM, B.; KIM, I. S.; KOPPULA, S.; CHOI, D.K.- The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. **International journal of molecular sciences**. . ISSN 1422-0067. 13:8 (2012) 10478–504. doi: 10.3390/ijms130810478.

KUMAR, H.; KOPPULA, S.; KIM, I.; MORE, S. V.; KIM, B.W.; CHOI, D. - Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in Parkinson disease: a promising multi therapeutic target against oxidative stress, neuroinflammation and cell death. **CNS & neurological disorders drug targets**. . ISSN 1996-3181. 11:8 (2012) 1015–29.

LAAR, V. S. Van; BERMAN, S. B. - Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. **Experimental Neurobiology**. 218:2 (2010) 247–256. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.019.Mitochondrial.

LIM, K.-L.; NG, X.-H.; GRACE, L. G.-Y.; YAO, T.-P. - Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin. **Antioxidants & redox signaling**. . ISSN 1557-7716. 16:9 (2012) 935–49. doi: 10.1089/ars.2011.4105.

LIN, T.; LIOU, C.; CHEN, S. - Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Chang Gung Medical Journal**. 32:6 (2009) 589–599.

MAASS, A.; REICHMANN, H. - Sleep and non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Journal of neural Transmission**. . ISSN 1435-1463. 120:4 (2013) 565–569. doi: 10.1007/s00702-013-0966-4.

MANDEMAKERS, W.; MORAIS, V. A; STROOPER, B. DE - A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. **Journal of cell science**. . ISSN 0021-9533. 120:Pt 10 (2007) 1707–16. doi: 10.1242/jcs.03443.

MCMAHON, M.; THOMAS, N.; ITOH, K.; YAMAMOTO, K.; HAYES, J. D. - Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. **The Journal of biological chemistry**. . ISSN 0021-9258. 279:30 (2004) 31556–67. doi: 10.1074/jbc.M403061200.

MESSING, R. O. - Distúrbios do Sistema Nervoso. In **Fisiopatologia da doença: uma introdução à medicina clínica**. 5ª. ed. São Paulo : McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. ISBN 9788577260102. p. 124–162.

MOI, P.; CHAN, K.; ASUNIS, I.; CAO, A.; KAN, Y. W. - Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America. . ISSN 0027-8424. 91:21 (1994) 9926–30.

MOVEMENT SOCIETY DISORDER - **MDS-UPDRS** [Em linha], atual. 2008. [Consult. 11 jul. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://www.movementdisorders.org/MDS-Files/PDFs/Rating-Scales/NewUPDRS7308final.pdf>.

NIOI, P.; NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. - The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. **Molecular and Cellular Biology**. 25:24 (2005) 10895–10906. doi: 10.1128/MCB.25.24.10895.

RECCHIA, A.; DEBETTO, P.; NEGRO, A.; GUIDOLIN, D.; SKAPER, S. D.; GIUSTI, P. - Alpha-synuclein and Parkinson's disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. . ISSN 1530-6860. 18:6 (2004) 617–26. doi: 10.1096/fj.03-0338rev.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; JAHANSHAHI, M.; KRACK, P.; LITVAN, I.; MACIAS, R.; BEZARD, E.; OBESO, J. A.. - Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet neurology**. . ISSN 1474-4465. 8:12 (2009) 1128–39. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70293-5.

SATOH, T.; OKAMOTO, S.-I.; CUI, J.; WATANABE, Y.; FURUTA, K.; SUZUKI, M.; TOHYAMA, K.; LIPTON, S. A. - Activation of the Keap1-Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 103:3 (2006) 768–773.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. - Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**. . ISSN 1531-8257. 26:6 (2011) 1049–55. doi: 10.1002/mds.23732.

SMITH, Y.; WICHMANN, T.; FACTOR, S. A.; DELONG, M. R.. - Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**. . ISSN 1740-634X. 37:1 (2012) 213–46. doi: 10.1038/npp.2011.212.

TRINH, K. ; ANDREWS, L.; KRAUSE, J.; HANAK, T.; LEE, D.; GELB, M.; PALLANCK, M. - Decaffeinated coffee and nicotine-free tobacco provide neuroprotection in Drosophila models of Parkinson's disease through an NRF2-dependent mechanism. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. . ISSN 1529-2401. 30:16 (2010) 5525–32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4777-09.2010.

TUFEKCI, K. U.; BAYIN, M. C.; GENÇ, S.; GENÇ, K. - The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. **Parkinson's disease**. . ISSN 2042-0080. 2011:2011) 1–14. doi: 10.4061/2011/314082.

VRIES, H. E.; WITTE, M.; HONDIUS, D.; ROZEMULLER, A. J. M.; DRUKARCH, B.; HOOZEMANS, J.; HORSSSEN, J. V. - Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? **Free radical biology & medicine**. . ISSN 0891-5849. 45:10 (2008) 1375–83. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.001.

WINKLHOFER, K. F.; HAASS, C. - Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta**. . ISSN 0006-3002. 1802:1 (2010) 29–44. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Neurological disorders: public health challenges** [Em linha]. Geneva : WHO, 2006. 217 p. Disponível em WWW:URL:http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf?ua=1. ISBN 9241563362.

YANG, L.; CALINGASAN, N. Y.; THOMAS, B.; CHATURVEDI, R. K.; KIAEI, M.; WILLE, E. J.; LIBY, K. T.; WILLIAMS, C.; ROYCE, D.; RISINGSONG, R.; MUSIEK, E. S.; MORROW, J. D.; SPORN, M.; BEAL, M. F. - Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription. **PloS one**. . ISSN 1932-6203. 4:6 (2009) e5757. doi: 10.1371/journal.pone.0005757.

ZHANG, D. D. - Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. **Drug metabolism reviews**. . ISSN 0360-2532. 38:4 (2006) 769–89. doi: 10.1080/03602530600971974.

ZUO, L.; MOTHERWELL, M. S. - The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. **Gene**. . ISSN 1879-0038. 532:1 (2013) 18–23. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.085.