

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Disfunção Lisossomal: Uma ligação-chave para compreender a patogénese da Doença de Parkinson**

**Dalila Isabel Martins Afonso Pires**

Monografia orientada pela Professora Doutora Liana Casquinha da Silva,  
Professora Auxiliar com Agregação.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2024**



**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Disfunção Lisossomal: Uma ligação-chave para compreender a patogénese da Doença de Parkinson**

**Dalila Isabel Martins Afonso Pires**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Liana Casquinha da Silva,  
Professora Auxiliar com Agregação.

**2024**

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Eduarda e António e aos meus irmãos, Maria e Gabriel por todo o apoio incondicional ao longo de todo o meu percurso, nomeadamente nesta reta final em que, apesar da distância e quantidade de trabalho, nos manterem afastados fisicamente, nunca deixaram de ser o meu maior pilar.

Ao meu avô Pires, à minha avó Faty e ao meu avô Afonso por todo o carinho e ajuda que me deram e uma promessa que daqui em diante já vou estar mais livre para podermos fazer mais almoços em família. Um especial agradecimento à minha avó Candinhas que, devido a uma doença neurodegenerativa, se tornou uma estrelinha no meu Céu no decorrer da escrita desta monografia e a quem dedico o meu Trabalho Final do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Aos meus sete: Diana, Diogo, Hugo, Leonor, Maria Mendes, Maria Fialho e Paulo, sem eles nunca teria chegado aqui. Tanto por todos os tempos de lazer e memórias que levo para a vida, mas também por todas as vezes que nos impulsionámos mutuamente a ser as nossas melhores versões de “armas académicas”.

À Bia, à Matilde e à Sofia em que um “obrigada” não é suficiente para expressar o quão grata sou por as ter na minha vida. Nunca ter uma engenheira informática, uma psicóloga e uma farmacêutica como melhores amigas foi tão bom.

Às minhas afilhadas, Avina e Patrícia, e à minha madrinha Maria que, apesar de serem família de faculdade, espero que a nossa conexão se mantenha mesmo após a vida no MICF.

E o meu maior agradecimento à Professora Doutora Liana Silva por todas as admiráveis sugestões, por toda a paciência e por toda a prontidão a ajudar-me na elaboração desta monografia.

O meu muito obrigada a todos os meus familiares, colegas de faculdade e trabalho e amigos que me acompanharam ao longo destes 5 anos.

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

## Resumo

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum mundialmente, afetando cerca de 1% da população com mais de 60 anos. Caracteriza-se pela presença de agregados anómalos da proteína alfa-sinucleína no tecido neuronal, resultando na formação de corpos de *Lewy* e na morte celular de neurónios dopaminérgicos na *substancia nigra*. Atualmente, é uma doença sem cura, em que os tratamentos visam apenas aliviar os sintomas.

O sistema autofágico endo-lisossomal é uma rede interligada, com o lisossoma como ponto central, responsável pela degradação e reciclagem de macromoléculas. Os lisossomas contêm enzimas hidrolíticas que degradam materiais intracelulares e extracelulares entregues por autofagia e endocitose, mantendo a homeostase celular.

O envelhecimento causa uma diminuição progressiva da capacidade de processamento lisossomal, afetando várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente a Doença de Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência Frontotemporal. Na Doença de Parkinson, a degradação da alfa-sinucleína pelo sistema autofágico endo-lisossomal, mediada principalmente pelos lisossomas, é fundamental para manter os níveis normais desta proteína e impedir a sua toxicidade. A disfunção da degradação lisossomal e da maquinaria autofágica pode, assim, levar à acumulação patológica desta proteína nos neurónios.

Estudos genéticos revelaram diversos genes e proteínas lisossomais ligados à Doença de Parkinson, em destaque o gene *GBA1*, que codifica a enzima  $\beta$ -glucocerebrosidase, cuja atividade reduzida leva à acumulação de alfa-sinucleína. Mutações no gene *ATP13A2* também provocam falha lisossomal e aumento de alfa-sinucleína. Outros genes e proteínas importantes incluem o gene *TMEM175*, que regula o pH lisossomal e influencia a degradação de alfa-sinucleína, e o *TFEB*, que promove a eliminação de oligómeros desta proteína.

As semelhanças nas vias patogénicas das doenças de armazenamento lisossomal e doenças neurodegenerativas revelam alvos potenciais para tratamentos inovadores, que oferecem novas perspetivas para abordar a patologia da Doença de Parkinson, ainda que muitos destes métodos estejam em fase experimental e requeiram mais estudos clínicos.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson; Lisossomas; Neurodegeneração;  $\alpha$ -sinucleína;  
Autofagia

# Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease worldwide, affecting around 1% of the population over 60. It is characterised by the presence of abnormal aggregates of the protein alpha-synuclein in neuronal tissue, resulting in the formation of Lewy bodies and the cell death of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*. It is currently a disease without a cure, with treatments aimed only at relieving symptoms.

The autophagic endo-lysosomal system is an interconnected network, with the lysosome at its centre, responsible for the degradation and recycling of macromolecules. Lysosomes contain hydrolytic enzymes that degrade intracellular and extracellular materials delivered by autophagy and endocytosis, maintaining cellular homeostasis.

Ageing causes a progressive decrease in lysosomal processing capacity, affecting several neurodegenerative diseases, namely Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. In Parkinson's disease, the degradation of alpha-synuclein by the autophagic endo-lysosomal system, mediated mainly by lysosomes, is essential for maintaining normal levels of this protein and preventing its toxicity. Dysfunction of lysosomal degradation and the autophagic machinery can therefore lead to the pathological accumulation of this protein in neurons.

Genetic studies have revealed several genes and lysosomal proteins linked to Parkinson's disease, in particular the GBA1 gene, which encodes the  $\beta$ -glucocerebrosidase enzyme, whose reduced activity leads to the accumulation of alpha-synuclein. Mutations in the ATP13A2 gene also cause lysosomal failure and an increase in alpha-synuclein. Other important genes and proteins include the TMEM175 gene, which regulates lysosomal pH and influences the degradation of alpha-synuclein, and TFEB, which promotes the elimination of oligomers of this protein.

The similarities in the pathogenic pathways of lysosomal storage diseases and neurodegenerative diseases reveal potential targets for innovative treatments, which offer new perspectives for addressing the pathology of Parkinson's disease, although

many of these methods are still in the experimental phase and require further clinical studies.

**Keywords:** Parkinson's disease; Lysosomes; Neurodegeneration;  $\alpha$ -synuclein; Autophagy

# Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

ASMase – Esfingomielina fosfodiesterase/esfingomielinase ácida

ATP – Adenosina Trifosfato

ATP13A2 – Gene da ATPase de transporte de cátions 13A2

AVV – Vetor de adenovírus

BHE – Barreira hematoencefálica

CTSA – Catepsina A

CTSD – Catepsina D

CTSF – Catepsina F

CMA – Autofagia mediada por chaperones

COMT – Catecol O-Metiltransferase

DA – Doença de Alzheimer

DG – Doença de Gaucher

DH – Doença de Huntington

DP – Doença de Parkinson

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

EOPD – *Early-Onset Parkinson's Disease*

FTD – Demência frontotemporal

GABA – Ácido-gama-aminobutírico

GALC – Gene da galactosilceramida

GALCase –  $\beta$ -galactocerebrosidase

GBA – Gene da Glucosilceramidase Beta

GCase –  $\beta$ -glucocerebrosidase

GlcCer – Glucosilceramida

Hsc70 – Proteína cognata de choque térmico 71kDa

KRS – Kufor-Rabek

LAMP-2A – Proteína de membrana associada ao lisossoma 2

LRRK2 – Gene da proteína serina/treonina 2 de repetição rica em leucina

LSD – Doenças do Armazenamento Lisossomal

L-Dopa – Levodopa

MAO-B – Monoamina oxidase-B

MAPT – Gene da proteína tau associada aos microtúbulos

mTORC1 – Complexo I do alvo mamífero da rapamicina

NAC - Domínio N-terminal de componente não amilóide

NCL10 – Lipofuscinose ceróide neuronal do tipo 10

NCL13 – Lipofuscinose ceróide neuronal do tipo 13

PRKN – Gene da Parkina

RE – Retículo endoplasmático

SMPD1 – Gene da ASMase

SNC – Sistema Nervoso Central

SNCA – Gene da alfa-sinucleína

SNpc – *Substantia nigra pars compacta*

SRT – Terapias de redução do substrato

TFEB – Fator de transcrição EB

TMEM175 – Gene do canal de K<sup>+</sup> TMEM175

TSE – Terapêutica de substituição enzimática

$\alpha$ -Syn – Alfa-sinucleína

## Índice:

1. Introdução.....	11
1.1 Metodologia.....	12
2. Doença de Parkinson.....	13
2.1 Introdução à doença.....	13
2.2 Contextualização Histórica.....	13
2.3 Epidemiologia.....	13
2.4 Etiologia.....	14
2.4.1 $\alpha$ -sinucleína.....	15
2.5 Fisiopatologia.....	16
2.6 Semiologia.....	17
2.7 Tratamento.....	17
3 Sistema Autofágico Endo-Lisossomal.....	19
3.1 Lisossoma.....	19
3.2 Autofagia.....	19
3.3 Endocitose.....	22
3.4 Degradação lisossomal-dependente da $\alpha$ -sinucleína.....	22
4 Disfunção lisossomal na Doença de Parkinson.....	24
4.1 Genes e Proteínas lisossomais que têm sido associados à DP.....	24
5 Potencial terapêutico dos lisossomas e enzimas lisossomais.....	29
5.1 Terapêutica de substituição enzimática (TSE).....	29
5.2 Terapêutica genética.....	30
5.3 Terapêuticas farmacológicas com chaperonas (PCT).....	30
5.4 Terapêuticas de redução do substrato (SRT).....	31
5.5 Terapias adjuvantes.....	32
6 Conclusões.....	34
Referências Bibliográficas.....	35

## Índice de Figuras:

**Figura 1** - Autofagia e mecanismos endo-lisossomais e genes relacionados associados a doenças neurodegenerativas. Adaptado de (31).....20

**Figura 2** - Evidência crescente de patomecanismos partilhados entre as LSD e a DP que sugere que as intervenções terapêuticas estabelecidas ou atualmente em desenvolvimento para o tratamento das LSD têm o potencial de serem também adequadas para o tratamento da DP. Os ícones ao lado dos nomes dos compostos exemplares indicam se o fármaco foi avaliado em modelos de DP *in vitro* (ícone de cultura de tecidos) ou *in vivo* (ícone de rato), ou se entrou em ensaios clínicos (ícone de hospital). O ícone da marca de verificação vermelha indica se um composto foi aprovado para o tratamento de uma LSD. Abreviaturas: AVV, vetor de adenovírus; GBA, b-gluco cerebrosidase (gene); GCase, b-gluco cerebrosidase (proteína); CTSD, catepsina D; TFEB, fator de transcrição EB; FTI, inibidor da farnesil transferase; aSyn, a-Sinucleína. Adaptado de (15).....32

# 1 Introdução

A Doença de Parkinson (DP) é uma das patologias neurodegenerativas mais prevalentes, afetando milhões de pessoas em todo o mundo e representando um grande desafio para a saúde pública. A DP é uma doença progressiva, caracterizada maioritariamente por sintomas motores, como tremores, rigidez e bradicinesia. Apesar das evidências científicas indicarem que o principal marcador patológico seja a perda de neurónios dopaminérgicos na *substancia nigra*, os mecanismos moleculares patológicos subjacentes permanecem por esclarecer, dificultando a identificação de intervenções terapêuticas eficazes, o que se traduz numa ausência de cura para esta doença até aos dias hoje.

Nos últimos anos, a disfunção dos lisossomas, que representam organelos fundamentais para a degradação e reciclagem celular, emergiu como uma possível ligação-chave para desvendar a complexidade da DP. Diversos estudos sugerem que a existência de anomalias no funcionamento lisossomal pode interferir com a autofagia e a eliminação de proteínas agregadas, ambos processos vitais para a manutenção da homeostase neuronal. Como será explorado nesta monografia, é plausível que tanto a acumulação de alfa-sinucleína, como outras alterações celulares características desta doença, estejam associadas à disfunção lisossomal, dada a relevância destes organelos na regulação da qualidade das proteínas e organelos.

Este trabalho pretende elucidar a relação entre a disfunção lisossomal e a patogénese da DP, procurando estabelecer de que forma é que as alterações destes organelos contribuem para a progressão da doença. Com este objetivo em mente, foram analisados os estudos mais recentes e relevantes que se focam na atividade dos lisossomas, nas suas interações com os mecanismos neurodegenerativos e os potenciais alvos terapêuticos que visam restaurar a função lisossomal como estratégia para retardar a progressão da DP.

## **1.1 Metodologia**

Para elaboração da presente monografia foram efetuadas várias pesquisas bibliográficas nas bases de dados *PubMed*, *GoogleScholar* e *Web of Science* tendo sido selecionados artigos escritos em inglês e português, dando sempre prioridade à recolha de informação o mais atualizada e relevante possível.

## 2 Doença de Parkinson

### 2.1 Introdução à doença

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente globalmente, superada apenas pela Doença de Alzheimer, com evidências de um notável incremento na sua prevalência ao longo das últimas três décadas (1), afetando, atualmente 1% da população com mais de 60 anos (2).

A DP é caracterizada pela presença de uma proteína intracelular, a alfa-sinucleína ( $\alpha$ -Syn), agregada de uma forma anómala no tecido neuronal, originando os característicos corpos de *Lewy* e por um processo de neurodegenerescência, que dá origem a morte precoce e proeminente de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (3,4).

### 2.2 Contextualização Histórica

A DP foi originalmente descrita em 1817 por James Parkinson em “*Essay on the shaking palsy*”, descrevendo os principais sintomas da doença, dos quais, os motores ainda hoje são considerados os sintomas cardinais desta: bradicinesia, rigidez e tremor (1,5,4).

### 2.3 Epidemiologia

Relativamente à epidemiologia da doença, existe uma grande variação nas estimativas globais de incidência e prevalência que pode ser resultado de vários fatores, nomeadamente a forma como os dados são recolhidos, as diferenças nas estruturas populacionais e na sobrevivência dos doentes, a determinação dos casos e a metodologia utilizada para definir os casos (2). No entanto, é geralmente aceite que a prevalência da doença se situe entre os 1 a 3 casos por 1000 habitantes, com a maioria dos estudos a apresentar uma prevalência de aproximadamente 120 casos por 100000 habitantes (2,5). Um estudo recente em Portugal, com uma amostra populacional

acima dos 50 anos de idade, calculou a prevalência da DP em 180/100000 habitantes (1).

A incidência da DP varia entre 5-35 novos casos por 100000 habitantes por ano, demonstrando o seu aumento em 5 a 10 vezes entre a sexta e a nona décadas de vida (7).

Nas últimas décadas, à medida que a população mundial envelhece, a prevalência da DP tem vindo a aumentar drasticamente, sobretudo nos países mais desenvolvidos, estimando-se que duplique nas próximas duas décadas (1,7). A acompanhar este aumento, os encargos sociais e económicos aumentarão, a menos que sejam identificados tratamentos, curas ou meios de prevenção mais eficazes (7).

## **2.4 Etiologia**

As causas para a doença de Parkinson ainda permanecem um mistério para a maioria dos casos, sendo que esta pode ser classificada como esporádica ou familiar consoante a ausência ou presença de historial familiar de DP (8). A maioria dos casos são considerados esporádicos e apresentam uma etiologia multifatorial, resultante da interação entre fatores ambientais e genéticos (7,8). O principal fator de risco para a doença é a idade (9), no entanto, também há evidencia de que traumatismos cranianos, inflamação intestinal, exposição a substâncias químicas tóxicas, como pesticidas agrícolas e o manganês, elevam o risco de desenvolver a forma esporádica da doença (7,8). Por outro lado, fatores relacionados com o estilo de vida sugerem diminuir o risco de DP, como o consumo de café e tabaco (1,7).

Recentemente, o aumento da incidência da DP tem sido cada vez mais associado a fatores genéticos (8). Mutações no gene GBA, responsável por codificar a enzima lisossomal  $\beta$ -glucocerebrosidase (GCCase), são o principal fator de risco genético para a doença, sendo que, existem outros genes de risco, como o LRRK2, o SNCA e o MAPT. Tanto o LRRK2 como o SNCA foram associados a formas familiares e esporádicas de DP, indicando que podem coexistir no mesmo locus diferentes mecanismos genéticos relacionados com a doença (25,11).

Cerca de 15% dos casos são considerados familiares, dos quais, apenas cerca de 5-10% apresentam uma forma monogénica da doença (8). Vários genes têm sido associados a formas autossómicas dominantes (LRRK2, SNCA, VPS35, EIF4G1, CHCHD2...), autossómicas recessivas (PRKN, PINK1, DJ-1) e ligadas ao X (RAB39B) (12).

É interessante notar que um número importante destes fatores de risco e dos genes causais identificados para as formas monogénicas de DP estão envolvidos nas vias autofágicas endo-lisossomais, apontando para o envolvimento importante destas vias na patogénese da doença.

#### **2.4.1 $\alpha$ -sinucleína**

Um dos *hallmarks* da DP é a presença de agregados proteicos no Sistema Nervoso Central (SNC), os corpos de Lewy, formados principalmente por agregados oligoméricos de uma proteína, a  $\alpha$ -sinucleína, mas também por parkina, ubiquitina e neurofilamentos (13).

As sinucleínas são uma família de pequenas proteínas solúveis, que incluem a alfa-sinucleína, a beta-sinucleína e a gama-sinucleína (14). A  $\alpha$ -Syn anormalmente agregada é o principal componente dos corpos de Lewy encontrados nas áreas cerebrais afetadas nos doentes com DP. Por esta razão, a doença de Parkinson é classificada como uma sinucleinopatia, que engloba doenças neurodegenerativas caracterizadas pela acumulação progressiva de agregados de  $\alpha$ -Syn no SNC (2,8,15).

A  $\alpha$ -Syn é uma pequena proteína de 140 aminoácidos que se desdobra em pH neutro (2,8). Nos seres humanos, é codificada pelo gene SNCA (8). Esta proteína localiza-se principalmente nos terminais pré-sinápticos neuronais e está envolvida na modulação da estabilidade da membrana neuronal, influenciando a sinalização pré-sináptica e o tráfego da membrana através do transporte vesicular na regulação da atividade sináptica (14).

Tem três domínios funcionais: um domínio N-terminal, um domínio central de componente não amiloide (NAC) e uma cauda C-terminal (14). O domínio NAC

central é uma região hidrofóbica responsável pelas interações proteína-proteína e, por esta razão, propensa à oligomerização (16). O domínio N-terminal é rico em resíduos de lisina e pode formar hélices  $\alpha$  anfipáticas para interação com lípidos, que são importantes para as interações membranares (16). Pensa-se que a região C-terminal é responsável pela mediação das interações da  $\alpha$ -Syn com outras proteínas citosólicas ou ligadas à membrana (16).

Fatores como o *stress* oxidativo, a proteólise, a concentração de ácidos gordos, os fosfolípidos e os iões metálicos podem modular a estrutura da  $\alpha$ -Syn, conduzindo a formações alternativas da proteína, que incluem oligómeros e fibrilhas, podendo estas últimas desenvolver-se em inclusões citoplasmáticas (17,18). Além disso, as modificações pós-tradução, como a fosforilação, a ubiquitinação, a nitratação e o truncamento, também podem resultar na alteração do tamanho, da estrutura ou da carga da proteína (19).

Impedir a propagação da agregação anormal de  $\alpha$ -Syn pode ser a chave para abrandar ou parar a progressão da doença de Parkinson (2).

## 2.5 Fisiopatologia

Para além do envolvimento da proteína  $\alpha$ -Syn na patologia da DP, já explorada anteriormente, esta também acaba por afetar os circuitos dos gânglios da base (núcleo estriado, globo pálido, núcleo subtalâmico e *substantia nigra*) e por esta razão a sua semiologia está muito interligada com alterações nas funções motoras, mas também apresenta alterações ao nível das funções cognitivas e comportamentais (13).

Tal como mencionado anteriormente, a doença pode ser caracterizada por degeneração dos neurónios dopaminérgicos da SNpc, que afeta um dos principais circuitos neuronais dos gânglios da base, o nigroestriado (entre o núcleo estriado e o núcleo da *substantia nigra*).

Desta disfunção, a dopamina, sintetizada pelos neurónios da *substantia nigra pars compacta*, que projetam os seus axónios para o núcleo estriado, é o principal neurotransmissor afetado. Este neurotransmissor possui um efeito inibitório para os

neurónios gabaérgicos do núcleo estriado, inibindo a ação do neurotransmissor ácido-gama-aminobutírico (GABA). Com a neurodegeneração este efeito perde-se e é potenciado o efeito dos neurónios colinérgicos (acetilcolina - ACh) no GABA, que em conjunto levam à escassez de movimentos (13).

## 2.6 Semiologia

Como mencionado anteriormente, os sintomas motores, como bradicinesia, rigidez, tremor e distonia estão maioritariamente associados à disfunção dos circuitos neuronais dos gânglios da base, que regulam a iniciação, a amplitude e a velocidade dos movimentos e representam os sintomas cardinais da doença (2,13).

Os sintomas não motores, como manifestações cognitivas e psiquiátricas estão normalmente interligados com a patologia associada aos Corpos de *Lewy*, sendo de destacar depressão, ansiedade, psicose, demência, problemas de sono e alterações gastrointestinais e genitourinárias (2,13).

## 2.7 Tratamento

Atualmente, as intervenções terapêuticas apenas têm capacidade de melhorar os sintomas da doença, principalmente os sintomas motores, e a qualidade de vida dos doentes, não existindo terapêutica disponível para desacelerar ou parar a doença (4).

Os tratamentos farmacológicos para os sintomas motores da DP baseiam-se principalmente na Dopamina. As preparações de Levodopa, os agonistas da dopamina, os anticolinérgicos, os inibidores da monoamina oxidase-B (MAO-B) e da COMT e a Amantadina são terapêuticas iniciais úteis, sendo a escolha do mais adequado baseada no perfil único do doente (2,20).

A Levodopa (L-Dopa), que atua ao substituir a dopamina estriatal, revolucionou a terapêutica para a DP, pois foi o primeiro fármaco utilizado eficazmente para o tratamento da DP e, após mais de 50 anos, continua a ser o mais eficaz no tratamento dos sintomas motores (21,4). Apesar de ser o 1º marco histórico no tratamento da DP,

apresenta diversas complicações, nomeadamente a sua baixa biodisponibilidade e difícil absorção, que pode ser melhorada com a sua associação com outro fármaco, a Carbidopa, ou a associação de Carbidopa + Entacapona (1,4).

O 2º marco histórico para o tratamento da DP é a estimulação cerebral profunda, que é um tratamento cirúrgico utilizado quando as flutuações motoras e as discinesias se tornam incapacitantes, apesar da capacidade de resposta dos sintomas motores à Levodopa (2,4).

As terapias não farmacológicas disponíveis para a DP incluem exercício físico, fisioterapia, educação direcionada, grupos de apoio, terapia da fala e nutrição (2,4).

Todos os sinais apontam para que os oligómeros ou fibrilhas de  $\alpha$ -Syn desempenhem um papel crucial na disseminação da patologia na DP, embora ainda não estejam completamente esclarecidos quais os fatores genéticos ou ambientais que promovem o seu processamento ou depuração errática, que levam à deposição anormal de  $\alpha$ -sinucleína nos corpos de *Lewy*. Estes agregados podem, portanto, ser um componente-chave desta patologia (22).

### **3 Sistema Autofágico Endo-Lisossomal**

O sistema autofágico endo-lisossomal é uma rede repleta de mecanismos que trabalham de forma coordenada e interligada, com o lisossoma sendo o ponto terminal para o qual convergem as diversas vias (8).

#### **3.1 Lisossoma**

Os lisossomas são organelos citoplasmáticos especializados, fechados em formato de vesícula por uma membrana que contém enzimas hidrolíticas, nomeadamente nucleases, glucosidases, fosfatases, proteases, sulfatases e enzimas de degradação de lípidos ou polissacáridos (8,23). A sua principal função é degradar e reciclar macromoléculas intra e extracelulares, entregues por autofagia e endocitose, respetivamente, como proteínas, lípidos, polissacáridos, hidratos de carbono e outros componentes, para manter a homeostase celular (8,15,23).

A função lisossomal é regulada por diversos fatores, tais como o tráfico das hidrolases/proteínas lisossomais, o pH luminal ácido essencial para a atividade enzimática das hidrolases, a renovação de substratos, a exocitose/exportação de determinados substratos e metabolitos e a comunicação com a membrana celular (15,23). Estes organelos desempenham ainda um papel crucial em processos essenciais, como a autofagia e a endocitose, permitindo o controlo de agentes patogénicos e a depleção de substratos tóxicos e produtos de degradação (15).

Novos estudos apontam para a insuficiência lisossomal como uma das principais patologias celulares na DP e outras doenças neurodegenerativas, daí a importância de se desenvolver mais pesquisa neste âmbito (23).

#### **3.2 Autofagia**

O termo autofagia advém da junção das palavras gregas “*auto*” (próprio) e “*phagy*” (comer) e refere-se, tal como o nome indica, ao processo catabólico pelo qual

os componentes intracelulares são entregues ao lisossoma para serem posteriormente degradados. Foram identificadas três vias de entrega de material citosólico aos lisossomas que diferem na especificidade do material alvo a ser degradado, no modo de entrega aos lisossomas e nos mecanismos de regulação – macroautofagia, autofagia mediada por chaperones e microautofagia (24,25).

A macroautofagia, comumente referida apenas como “autofagia”, é o principal mecanismo responsável pela degradação da maioria dos componentes intracelulares. Esta forma de autofagia envolve a entrega de carga citoplasmática sequestrada em vesículas de dupla membrana (autofagossomas) que se fundem com lisossomas para degradar o seu conteúdo (24,26). Este processo inicia-se pela formação e alongamento de uma membrana de isolamento, o fagóforo, cujos bordos se fundem para formar o autofagossoma, que reconhece e aprisiona a carga; por sua vez, o autofagossoma sofre fusão com um lisossoma para formar o autolisossoma, onde o material capturado, juntamente com a membrana interna, é degradado (24,26).

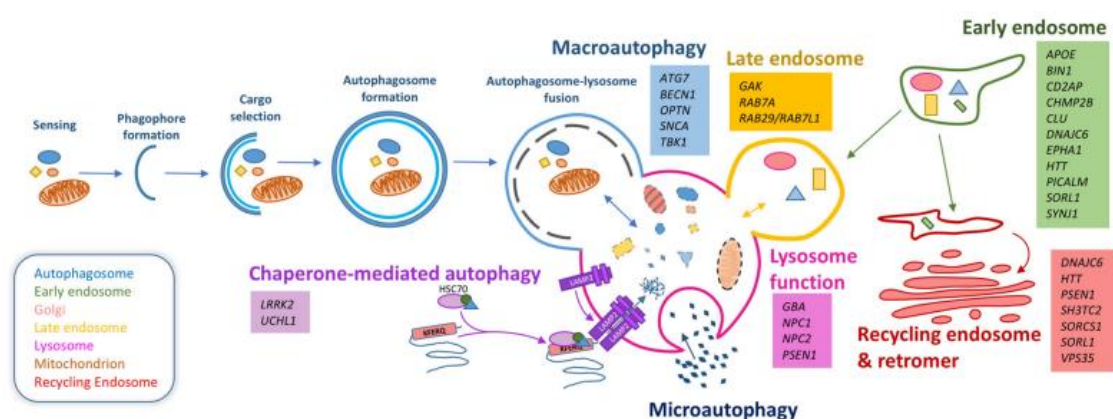
Este tipo de autofagia pode ser subdividido em duas categorias: autofagia não seletiva/grande volume e autofagia seletiva, consoante o tipo de substratos, conteúdos citosólicos não específicos ou cargas seletivas que são reconhecidas e entregues aos lisossomas através de mecanismos altamente regulados, respetivamente (8,26). Os processos de macroautofagia seletiva incluem a degradação de mitocôndrias (mitofagia), peroxissomas (pexofagia), porções do retículo endoplasmático (RE) (reticulofagia), ribossomas (ribofagia), gotículas lipídicas (lipofagia), agentes patogénicos (xenofagia) e agregados ubiquitinados (agrefagia), entre outros (8).

A macroautofagia basal é responsável pela renovação constante dos componentes dentro das células, enquanto a autofagia induzida é um mecanismo de resposta ao *stress*, ativado em várias condições, como falta de nutrientes, *stress* oxidativo, hipóxia ou danos mitocondriais. Portanto, a autofagia pode ser ativada quando é necessário eliminar materiais específicos, como proteínas mal dobradas, organelos danificados ou agentes patogénicos externos, ou quando são necessários elementos básicos, como aminoácidos, para a formação de novas macromoléculas (8). O complexo I do alvo mamífero da rapamicina (mTORC1) é o principal regulador negativo da macroautofagia e induz a autofagia em resposta à falta de aminoácidos

(fome), insulina, fatores de crescimento, níveis de ATP, glicose, hipóxia e outras formas de *stress* (27).

A autofagia mediada por chaperones (CMA) tem sido associada com a seletividade devido ao seu mecanismo único subjacente à entrega da carga lisossomal. Nesta via, as proteínas, a única carga degradada por esta via, atravessam a membrana lisossomal uma a uma. Para serem substratos da CMA, as proteínas devem conter um motivo específico na sua sequência de aminoácidos (28,29). Por sua vez, este motivo liga-se a uma chaperona citosólica (Hsc70) e forma um complexo substrato-chaperona que é transportado para a superfície lisossomal e interage com o complexo multimérico de translocação da proteína de membrana associada ao lisossoma 2 (LAMP-2A). Ocorre a translocação da proteína substrato através do complexo LAMP-2A e, uma vez que a proteína substrato está dentro do lúmen lisossomal, é rapidamente degradada, enquanto o complexo de translocação LAMP-2A se dissemina em monómeros até que o próximo complexo de chaperona-substrato se ligue novamente (8,28,29).

A microautofagia é um mecanismo relativamente pouco estudado que envolve o sequestro e a degradação de regiões completas do citosol, incluindo proteínas e organelos, através da invaginação direta da própria membrana lisossomal (30).



**Figura 1 – Autofagia e mecanismos endo-lisossomais e genes relacionados associados a doenças neurodegenerativas. Adaptado de (31).**

No SNC, os neurónios são particularmente vulneráveis à desregulação dos sistemas de depuração celular e posteriormente à acumulação anormal de material no interior da célula, uma vez que são células pós-mitóticas, com uma morfologia e

características metabólicas específicas, acabando por depender fortemente do processo de autofagia (8,23,32). Diversos estudos demonstram que a deleção de genes macroautofágicos cruciais resultam em neurodegeneração secundária à acumulação progressiva de proteínas agregadas mal dobradas e organelos disfuncionais (33,34). Diversas doenças neurodegenerativas, em particular a Doença de Parkinson, apresentam disfunções na autofagia. Esta deficiência pode desempenhar um papel significativo na patogénese desta doença (8,29).

### **3.3 Endocitose**

A endocitose é o processo pelo qual a célula internaliza proteínas e lípidos da membrana plasmática e do material extracelular (35). A carga é posteriormente entregue aos endossomas iniciais onde pode ser reciclada ou retida nos endossomas primitivos que amadurecem e se transformam em endossomas tardios através de alterações do pH luminal, da ativação e recrutamento de RAB GTPases e da alteração dos lípidos fosfatidilinositol essenciais (36,37). Por fim, os endossomas tardios fundem-se com os lisossomas, onde a carga pode ser degradada (37).

A endocitose tem uma relevância particular no cérebro, uma vez que está envolvida em funções essenciais como a sinalização de neurotransmissores (38). Foram também descritas alterações neste sistema complexo na DP, sugerindo o papel importante desta via na patogénese da doença (8).

### **3.4 Degradação lisossomal-dependente da $\alpha$ -sinucleína**

Uma ligação chave entre a função lisossomal e a doença de Parkinson pode ser a degradação da  $\alpha$ -Syn pelo sistema lisossomal (39). Como a  $\alpha$ -Syn, em condições fisiológicas, é encontrada em quantidades abundantes e o seu processo de polimerização é altamente dependente da concentração, qualquer elevação pode alterar o seu estado de polimerização para monomérica, oligomérica, fibrilar ou agregada, podendo levar a consequências patológicas. Por este motivo, o equilíbrio

entre a síntese e a degradação desta proteína é crucial para manter os níveis normais da mesma no meio intracelular, nomeadamente nos neurónios (40,41).

O aumento na concentração de  $\alpha$ -sinucleína nos neurónios pode ser causado por aumento da sua expressão devido a multiplicações (duplicações ou triplicações) do gene SNCA ou polimorfismos na região promotora, ou por erros na sua degradação causados por mutações pontuais no gene SNCA (42-48).

No lisossoma, a degradação da  $\alpha$ -Syn é principalmente mediada por catepsinas lisossomais, sendo entregue a este organelo, preferencialmente, pelas vias endossomais e autofágicas – macroautofagia e mais predominantemente CMA (41,49). Ambas estas vias de autofagia, caso inibidas, levam à acumulação de  $\alpha$ -Syn (49). As catepsinas não só degradam  $\alpha$ -Syn, como também são cruciais para o processamento, maturação e regulação de outras proteínas e enzimas lisossomais, daí a sua deficiência poder conduzir a Doenças do Armazenamento Lisossomal (LSD) (50).

A  $\alpha$ -sinucleína contém o motivo CMA, mencionado anteriormente, que reconhecido pela chaperona Hsc70, forma um complexo proteína-chaperona que é recrutado para a membrana lisossomal e interage com o recetor CMA LAMP-2A e a  $\alpha$ -Syn é transportada para o lúmen lisossomal para ser degradada (48,49,51).

Algumas formas mutantes de  $\alpha$ -Syn que estão associadas a casos familiares de DP não são eficientemente degradadas através da CMA, podendo ligar-se à LAMP-2A na superfície lisossomal com elevada afinidade. No entanto, não são internalizadas nos lisossomas, impedindo a sua própria degradação e bloqueando, além disso, a degradação dependente da CMA de outros substratos (48,49,52).

A diminuição da capacidade destas espécies de  $\alpha$ -sinucleína para serem translocadas e eliminadas através da via CMA favorece o aumento destas formas solúveis no citosol e promove a formação de intermediários protofibrilares oligoméricos, que geralmente progridem para fibrilas insolúveis de  $\alpha$ -sinucleína (8).

Tendo em conta o papel fundamental da degradação lisossomal-dependente da  $\alpha$ -Syn e as consequências do seu turnover ineficiente, podemos assumir que a alteração

direta ou indireta da função lisossomal e também da maquinaria autofágica ou endossomal, podem desencadear a acumulação anormal de  $\alpha$ -sinucleína.

## 4 Disfunção lisossomal na Doença de Parkinson

O envelhecimento leva à diminuição progressiva da capacidade de processamento lisossômico, que, por sua vez, tem demonstrado implicação em várias patologias neurodegenerativas, tal como a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer (DA), ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica), demência frontotemporal (FTD) e doença de Huntington (DH) (31,53).

O papel do sistema autofágico endo-lisossomal tem sido amplamente estudado no âmbito da neurodegeneração, nomeadamente na DP, sendo o desempenho dos lisossomas central nesta patologia, particularmente pela degradação da  $\alpha$ -Syn.

### 4.1 Genes e Proteínas lisossomais que têm sido associados à DP

A importância da disfunção lisossomal na patogenicidade da DP tem sido suportada por evidências baseadas em estudos genéticos. Nos últimos anos, diversos estudos genéticos, como estudos de associação de genoma e sequenciação do genoma completo, também identificaram vários genes envolvidos na patogenicidade da doença. Associados aos genes lisossômicos que têm vindo a demonstrar ligação à DP, encontram-se também proteínas lisossomais. Em relevo, encontram-se as mutações no GBA e no gene ATP13A2, assim como as alterações que ocorrem nos processos celulares associados às proteínas codificadas por estes genes (8).

Uma ligação chave entre a função lisossomal e a DP poderá ser a degradação da  $\alpha$ -Syn no sistema lisossomal. Como já foi referido anteriormente, a degradação em massa de substratos proteicos, incluindo aSyn agregada, no lisossoma é principalmente mediada por catepsinas lisossômicas. Estas enzimas lisossomais não só degradam proteínas, como também são cruciais para o processamento, maturação e regulação de outras proteínas e enzimas lisossomais. Devido à sua importância, a sua deficiência perturba a função lisossomal e pode conduzir a LSD, como as lipofuscinoses ceróides neuronais do tipo 10 (NCL10) e 13 (NCL13) – associadas às catepsinas D (CTSD) e F (CTSF), respetivamente (54,55) – a galactosialidose – associada à catepsina A (CTSA) (56). A catepsina D, codificada pelo gene CTSD, não

foi só associada a LSD, mas também a doenças neurodegenerativas (57), nomeadamente a DP, uma vez que é essencial para a clivagem da  $\alpha$ -Syn monomérica e agregada (58,59), e foi demonstrado ser um fator de suscetibilidade para a DP (60).

O cérebro humano caracteriza-se por um elevado teor de lípidos, essenciais para as suas funções devido à alta densidade de membranas celulares e células da glia. Dentro destas membranas, as ceramidas desempenham um papel crucial na regulação da homeostasia do SNC (61).

As ceramidas são moléculas lipídicas compostas por esfingosina e ácidos gordos e são consideradas o “*backbone*” de todos os esfingolípido. Alguns destes lípidos, nomeadamente a esfingomielina, encontram-se em regiões especializadas das membranas chamadas “jangadas lipídicas”. Essas jangadas lipídicas são estruturas organizadas e altamente compactas, compostas por colesterol, esfingolípido e proteínas. Estas funcionam como plataformas que facilitam a comunicação entre as células, transdução de sinais e a organização de proteínas que regulam processos celulares vitais. No sistema nervoso central, essas jangadas lipídicas são essenciais para a organização de recetores e canais iónicos nas membranas neuronais, garantindo uma transmissão sináptica eficiente e respostas celulares rápidas a estímulos (61).

As ceramidas, especificamente, estão envolvidas na regulação de processos celulares fundamentais, como diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose celular. Além disso, atuam na resposta ao *stress* celular e em mecanismos de autofagia, o que é vital para a homeostase neuronal e para evitar acúmulo de proteínas tóxicas (61).

Um exemplo é o gene GBA1, que codifica a enzima lisossomal  $\beta$ -glucocerebrosidase (GCCase) responsável por hidrolisar dentro do lisossoma, um esfingolípido, a glucosilceramida (GlcCer) em ceramida e glucose (62,63,64). Diversos estudos apontam para uma relação entre a acumulação de  $\alpha$ -Syn e a atividade da GCCase (65,66). Apesar de ainda não se compreenderem completamente os mecanismos associados a esta relação, a perda da atividade ou os níveis baixos da GCCase levam a uma diminuição da capacidade de degradar a  $\alpha$ -Syn e consequentemente à sua acumulação em forma oligomérica. Esta, por sua vez, atua na maturação da GCCase, levando a um ciclo vicioso (64-69). Mutações no gene GBA1

causam a doença de Gaucher (DG), que é uma das LSD mais comuns (70) e cujos doentes apresentam um maior risco de desenvolver DP ao longo da sua vida, em comparação com a população não afetada (25,11). Além disto, o envelhecimento tem sido associado com a diminuição progressiva da atividade da GCase e a acumulação de Glucosilceramidas, pelo que não são surpreendentes as suas implicações na DP e noutras doenças degenerativas relacionadas com a idade (71).

A galactosilceramida é outro esfingolípido, degradado dentro do lisossoma pela  $\beta$ -galactocerebrosidase (GALCase) que, por sua vez, é codificada pelo gene GALC e responsável pela hidrólise das ligações éster dos glicolípidos. A GALCase é associada à doença de Krabbe, pois a sua deficiência na atividade enzimática causa a acumulação de galactosilceramida nos oligodendrócitos e subsequente desmielinização, características desta doença. Pode haver uma associação entre esta doença e a DP, pois o aparecimento de inclusões neuronais contendo ubiquitina e  $\alpha$ -Syn agregada é um efeito secundário comum da doença de Krabbe e uma característica da DP, apesar do mecanismo não se encontrar completamente esclarecido (72,73).

O gene SMPD1 codifica a enzima lisossomal esfingomielina fosfodiesterase/esfingomielinase ácida (ASMase), que hidrolisa a esfingomielina em ceramida e fosocolina. A perda de função da ASMase leva à acumulação de esfingomielina e da sua forma desacetilada, a liso-esfingomielina, no lisossoma de diferentes órgãos. Mutações neste gene podem causar as LSD Niemann-Pick tipos A e B pela acumulação de esfingomielina no lisossoma (74,75,76). Enquanto a tipo B não apresenta sinais de envolvimento do SNC, a tipo A é caracterizada por neurodegeneração progressiva. A perda de função da enzima ASMase e o gene que a codifica têm sido associados à DP em diversos estudos; apesar de ainda não se conhecer o seu envolvimento completamente, sabe-se que está relacionado com a redução da sua atividade influenciar a acumulação de  $\alpha$ -Syn (77,78).

O gene ATP13A2 codifica a ATPase 13A2 do tipo P5 (ATP13A2, também conhecida por PARK9), que é uma bomba transmembranar (79). As proteínas de membrana servem como importadores ou exportadores de substratos específicos, sendo a sua disfunção prejudicial à acumulação de moléculas potencialmente tóxicas. A ATP13A2 encontra-se especificamente envolvida no transporte de catiões (como

iões de zinco e manganésio) e poliaminas (79-82). A falha desta bomba causa a permeabilização da membrana lisossomal e alterações no pH, promovendo a falha na maturação e função das catepsinas lisossomais responsáveis, entre outras, pela hidrólise da proteína  $\alpha$ -Syn, levando à acumulação de  $\alpha$ -Syn e outros substratos tóxicos (80,82,83). As mutações no gene ATP13A2 conduzem a EOPD (*Early-Onset Parkinson's Disease*) e/ou a síndrome de Kufor-Rabek (KRS) (84-86).

O gene TMEM175 codifica uma proteína transmembranar, o canal de K<sup>+</sup> TMEM175, localizado nos endossomas tardios e lisossomas, e tem sido vastamente considerado um grande fator de risco associado à patogénese da DP, através de diversos estudos genéticos. Estes estudos demonstram que a deficiência desta proteína resulta na instabilidade do pH lisossómico e do potencial de membrana, com consequente diminuição da atividade catalítica lisossómica, diminuição da atividade da GCase e das catepsinas lisossomais, defeitos nos processos autofágicos e na respiração mitocondrial, que no seu conjunto levam à acumulação de  $\alpha$ -Syn anormal, característica da patologia da doença (87-90).

Outra proteína lisossomal com ligações significativas à DP é o fator de transcrição EB (TFEB), que coordena a expressão de hidrolases lisossomais, proteínas de membrana e genes envolvidos na autofagia. Estudos *in vivo* demonstraram que alterações neurodegenerativas semelhantes às da DP induzidas por níveis celulares excessivos de  $\alpha$ -syn nos neurónios de roedores estão intimamente ligadas à retenção citoplasmática do TFEB, sendo as alterações invertidas pela sobreexpressão deste fator de transcrição, que proporcionou uma neuroproteção através da eliminação de oligómeros de  $\alpha$ -Syn (91-94).

As proteínas de membrana associadas aos lisossomas (LAMPs), subtipos 1, 2 e 3, são as proteínas de membrana mais comuns relacionadas com a integridade lisossomal e os processos de segregação, sendo que os subtipos 1 e 2 representam metade de todas as proteínas da membrana lisossomal (95,96). A interação e a ligação de substratos ligados a enzimas são frequentemente mediadas pela LAMP2A, que se liga à Hsc70 e permite a formação de um complexo que transporta substratos para o lisossoma. Como uma das vias de degradação da  $\alpha$ -Syn é pela autofagia, esta proteína necessita de eventualmente ser entregue ao lisossoma para completar o processo e daí a importância da LAMP2A na DP (97).

A LRRK2 é outra das proteínas implicadas na DP. Esta proteína é relativamente grande com múltiplos domínios de interação proteína-proteína e duas regiões enzimáticas com atividade de GTPase e cinase (98). Ao ter esta capacidade de interagir com diversas proteínas, ou seja, ser capaz de formar diferentes complexos e controlar diversas funções em diferentes localizações subcelulares, tipos de células e condições, a LRRK2 tem sido bastante implicada em diversas vias celulares (98), nomeadamente no sistema autofágico endo-lisossomal, em particular na macroautofagia (98,99,100) e CMA, através da desregulação do ciclo da  $\alpha$ -Syn (101).

Outros genes altamente ligados à patologia da DP são o PINK1 e o PRKN e os seus produtos PINK1 e E3 ubiquitina-proteína ligase Parkin por, aquando mutação, afetarem o mecanismo de mitofagia, o reconhecimento seletivo e a degradação das mitocôndrias por macroautofagia (102).

## **5 Potencial terapêutico dos lisossomas e enzimas lisossômicas**

As semelhanças entre as vias patogénicas das LSD e das doenças neurodegenerativas na disfunção lisossomal permitem identificar vários alvos que podem ser traduzidos em abordagens terapêuticas para a doença de Parkinson (15,40).

Foram investigadas ou estão a ser desenvolvidas várias estratégias para o tratamento das LSD, que podem constituir novas oportunidades para o tratamento da DP. Atualmente estas intervenções podem ser agrupadas em (i) substituição de enzimas defeituosas por enzimas funcionais, utilizando a terapia de substituição enzimática (TSE); (ii) terapia genética; (iii) modificação da atividade enzimática com a utilização de pequenas moléculas que visam o local ativo da enzima ou como reguladores alostéricos, ou seja, a terapia farmacológicas com chaperones (TCP); (iv) ajuste dos níveis de substrato para reduzir o material de armazenamento, ou seja, a terapia de redução de substrato (TRS); (v) terapias adjuvantes (103,104,105). Em teoria, qualquer uma destas estratégias poderia ser transversal para uma possível abordagem no tratamento da DP.

### **5.1 Terapêutica de substituição enzimática (TSE)**

O objetivo da TSE é compensar defeitos metabólicos patológicos através de infusões semanais ou quinzenais de enzimas recombinantes. Utilizando um recetor específico, principalmente o recetor de manose-6-fosfato, as enzimas aplicadas por via intravenosa podem ser absorvidas pelas células e transportadas para os lisossomas, onde desempenham as suas funções catalíticas (105).

Este é o método padrão para múltiplas LSD. No entanto, apresenta diversas limitações, como por exemplo, o seu elevado custo, o risco de infeção e o facto das enzimas utilizadas serem moléculas grandes que não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE), pelo que a sua utilização é maioritariamente limitada ao tratamento de sintomas não neurológicos (106).

Uma abordagem que permite contornar este problema consiste em administrar a enzima recombinante diretamente no líquido cefalorraquidiano (LCR). As vias possíveis para o efeito são a administração intracerebroventricular e a administração intratecal de enzimas (107).

## **5.2 Terapêutica genética**

O objetivo desta abordagem é introduzir, por injeção direta na circulação ou no cérebro, uma cópia funcional do gene defeituoso no indivíduo afetado (108). Os métodos desta terapêutica envolvem abordagens *in vivo* e *ex vivo*: a primeira utiliza um vetor viral para transportar o gene para as células-alvo, na segunda as células derivadas dos doentes são geneticamente modificadas *in vitro* e as células alteradas são depois reimplantadas nos doentes (108). Tal como acontece com as TSE, uma forma possível de ultrapassar o acesso limitado da BHE consiste em efetuar a transferência de genes diretamente para o cérebro (109).

Estudos pré-clínicos indicam que a terapia genética direcionada ao restabelecimento de enzimas lisossomais deficientes pode ser promissora para tratar a DP. Em modelos murinos, a administração intracerebral do gene GBA1 através de um vetor de adenovírus (AVV) mostrou melhorias na acumulação de  $\alpha$ -Syn no *striatum* e na *substantia nigra* dos animais (110). Estudos recentes em ratos transgênicos também demonstraram que a administração do AVV com o gene GBA1 modificado aumentou a expressão da enzima GCase no sistema nervoso central, reduzindo a patologia associada à  $\alpha$ -Syn (111).

## **5.3 Terapêuticas farmacológicas com chaperonas (PCT)**

Uma abordagem inovadora para corrigir a deficiência enzimática envolve o uso de chaperonas farmacológicas. As chaperonas endógenas têm um papel essencial na estabilização de proteínas, impedindo a sua dobragem incorreta e agregação, preservando assim a sua função e apresentando a vantagem de passarem a BHE devido ao seu pequeno tamanho. As proteínas incorretamente dobradas e/ou instáveis

são detetadas pelos sistemas de controlo de qualidade das células e são marcadas para degradação. As mutações *missense* em enzimas lisossomais podem afetar a estrutura da proteína, resultando em dobragem incorreta e conseqüente compromisso da sua atividade e/ou tráfico para o lisossoma, daí a importância desta terapêutica (112,113).

A elevada prevalência de mutações GBA1 entre os doentes com DP coloca a GCCase no centro das atenções da investigação sobre a DP. Abordagens experimentais, utilizando neurónios derivados de iPSC de doentes com triplicação de SNCA e ratinhos transgênicos tratados com chaperonas ativadoras da GCCase, mostraram níveis aumentados da atividade da enzima e níveis reduzidos de agregados de  $\alpha$ -Syn (114,115,116); são exemplos disto o BIA 28-6156/LTI-291 (atualmente em ensaios clínicos de fase II desde 2021) (117,118) e o ambroxol (em ensaio clínico de fase II entre janeiro de 2017 e abril de 2018) (119).

#### **5.4 Terapêuticas de redução de substrato (SRT)**

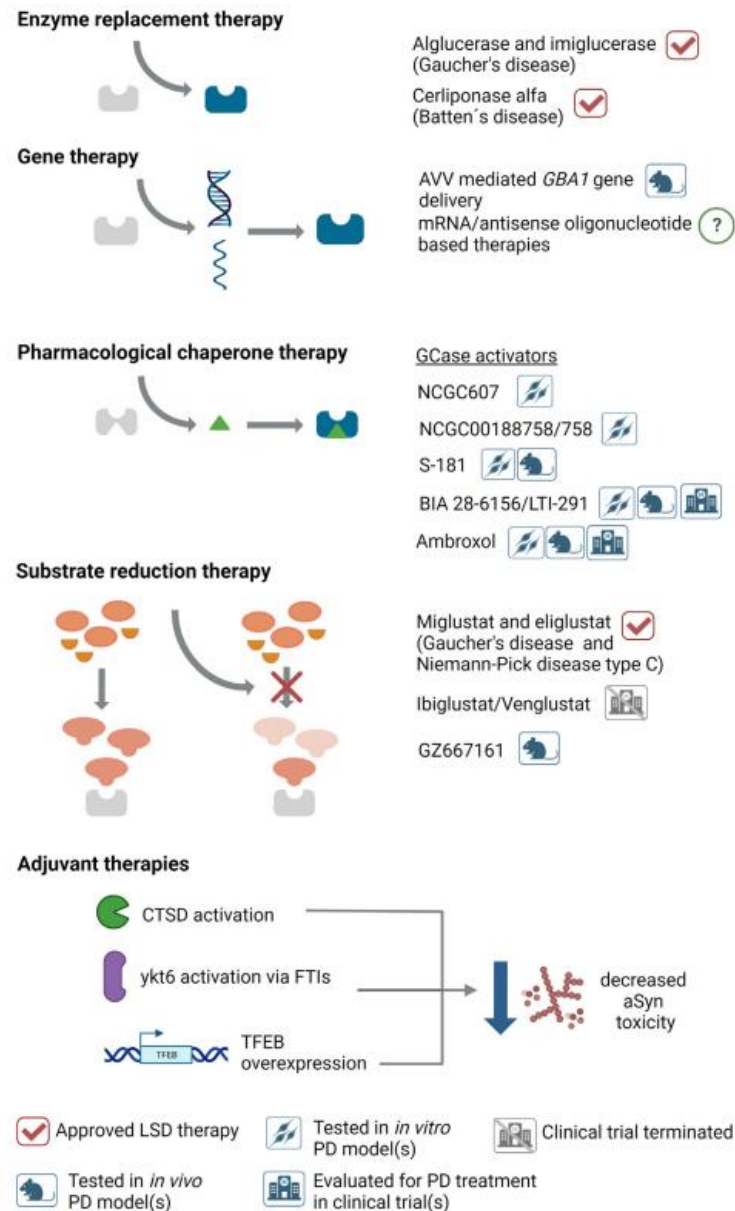
Uma outra forma de evitar a acumulação excessiva de metabolitos tóxicos é através da inibição da produção de substrato. Este é o objetivo das terapias de redução de substrato (SRT) (104).

Estudos sugerem que a diminuição dos níveis de glucosilceramida é uma abordagem promissora contra a patologia da  $\alpha$ -Syn. Estudos *in vitro* demonstraram que a interação da  $\alpha$ -Syn com a glucosilceramida conduz a uma conversão estrutural da proteína numa conformação patogénica. Verificou-se que estas espécies de  $\alpha$ -Syn de elevado peso molecular são capazes de recrutar e converter formas solúveis da proteína em agregados insolúveis, induzindo a degeneração celular. A diminuição dos níveis de glucosilceramida, através dos inibidores da glucosilceramida sintase, eligustat e ibiglustato restabeleceu as formas fisiológicas da proteína e diminuiu a patogenicidade da  $\alpha$ -Syn (104,114,120).

## 5.5 Terapias adjuvantes

As terapêuticas adjuvantes, que visam vias secundárias afetadas pela doença, têm o potencial de melhorar a qualidade de vida e retardar a progressão da doença em doentes com uma variedade de mecanismos patológicos. Uma vez que a acumulação de  $\alpha$ -Syn e a consequente perda de células são características patológicas da DP, mas não são necessariamente causadas por mutações diretas do SNCA, mas sim por efeitos secundários de outras proteínas disfuncionais, qualquer redução da formação de agregados de  $\alpha$ -Syn poderia ser uma abordagem terapêutica viável. A CTSD é um alvo promissor para prevenir a acumulação de  $\alpha$ -Syn. A deficiência da enzima foi associada à acumulação de  $\alpha$ -Syn, ao passo que o aumento da expressão da CTSD teve um efeito protetor contra a toxicidade induzida pela  $\alpha$ -Syn (121).

Uma outra abordagem terapêutica adjuvante promissora é a modulação do TFEB. Num estudo que utilizou células de neuroglioma humano com sobre-expressão de  $\alpha$ -Syn, tanto a sobre-expressão genética como a ativação farmacológica de TFEB induzida por 2-hidroxiopropil-beta ciclodextrina diminuíram a acumulação de  $\alpha$ -Syn agregada através do aumento da depuração autofágica da proteína (122).



**Figura 2 – Evidência crescente de patomecanismos partilhados entre as LSD e a DP que sugere que as intervenções terapêuticas estabelecidas ou atualmente em desenvolvimento para o tratamento das LSD têm o potencial de serem também adequadas para o tratamento da DP. Os ícones ao lado dos nomes dos compostos exemplares indicam se o fármaco foi avaliado em modelos de DP *in vitro* (ícone de cultura de tecidos) ou *in vivo* (ícone de rato), ou se entrou em ensaios clínicos (ícone de hospital). O ícone da marca de verificação vermelha indica se um composto foi aprovado para o tratamento de uma LSD. Abreviaturas: AVV, vetor de adenovírus; GBA, b-glucocerebrosidase (gene); GCase, b-glucocerebrosidase (proteína); CTSD, catepsina D; TFEB, fator de transcrição EB; FTI, inibidor da farnesil transferase; aSyn, a-Sinucleína. Adaptado de (15).**

## 6 Conclusões

O conhecimento científico acerca da patogênese da Doença de Parkinson tem evoluído significativamente nos últimos anos, tendo as disfunções lisossomais emergido como um desencadeador central desta patologia. Ao longo da monografia, foi elucidada a forma como as alterações na função lisossomal afetam os elementos essenciais para a manutenção da homeostase neuronal, nomeadamente no que diz respeito à degradação de proteínas. O lisossoma, que constitui o centro de degradação e reciclagem celular, desempenha um papel vital na eliminação de proteínas agregadas e de organelos disfuncionais, prevenindo assim a toxicidade celular. A autofagia, dividida em macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperones, é um processo dependente dos lisossomas que permite a remoção seletiva e eficiente de componentes celulares, com a CMA atuando na degradação de proteínas específicas, como a  $\alpha$ -sinucleína.

Portanto, qualquer disfunção na atividade lisossomal e na degradação via autofagia, seja por fatores genéticos ou ambientais, pode agravar a acumulação patológica de  $\alpha$ -sinucleína. O que não só reforça a importância da integridade do sistema autofágico endo-lisossomal como também destaca a necessidade de focar os próximos estudos nestas vias, visando encontrar potenciais alvos terapêuticos da DP e de outras patologias com mecanismos similares.

A disfunção lisossomal revela-se não só como um mecanismo patogénico na Doença de Parkinson, mas também como um alvo terapêutico de grande potencial. Estudos futuros que explorem estratégias para melhorar a atividade destes organelos, seja através de moléculas capazes de restaurar a função lisossomal, corrigir mutações genéticas responsáveis pela deficiência enzimática, ou reduzir a produção de metabolitos tóxicos evitando a sua acumulação, poderão proporcionar novas esperanças para os doentes com DP, contribuindo para um avanço significativo no tratamento desta condição neurodegenerativa.

## Referências Bibliográficas

1. Cabreira V, Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização. *Acta Médica Portuguesa*. 2019 Oct 1;32(10):661.
2. Hauser R. Parkinson Disease: Practice Essentials, Background, Anatomy. Benbadis S, editor. *Medscape.com*. 2020.
3. Pauwels J, Boer GJ. Parkinson's Disease: A Tale of Many Players. *Medical Principles and Practice*. 2023 Jun 7;32(3):1–11.
4. Goyal V, Radhakrishnan D. Parkinson's disease: A review. *Neurology India*. 2018;66(7):26.
5. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's Disease. *Journal of Neural Transmission*. 2017 Feb 1;124(8):901–5.
6. Kempster PA, Hurwitz B, Lees AJ. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology*. 2007 Jul 30;69(5):482–5.
7. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2020 Feb;36(1):1–12.
8. Navarro-Romero A, Montpeyó M, Martínez-Vicente M. The Emerging Role of the Lysosome in Parkinson's Disease. *Cells*. 2020 Nov 2;9(11):2399.
9. Van Den Eeden SK. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology*. 2003 Jun 1;157(11):1015–22.
10. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 2009 Mar 13;132(7):1783–94.
11. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2009 Oct 22;361(17):1651–61.

12. Ferreira M, Massano J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2016 Jun 8;135(3):273–84.
13. Lomen-Hoerth C. *Distúrbios do Sistema Nervoso*, 7e. McGraw Hill Medical. 2023.
14. Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathology*. 2016 Apr 25;26(3):410–8.
15. Mächtel R, Boros FA, Dobert JP, Arnold P, Zunke F. From Lysosomal Storage Disorders to Parkinson's Disease – Challenges and Opportunities. *Journal of Molecular Biology*. 2022 Dec 23;435(12):167932.
16. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G. Conformational properties of  $\alpha$ -synuclein in its free and lipid-associated states 1 Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*. 2001 Apr;307(4):1061–73.
17. Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, et al. Aggregation promoting C-terminal truncation of  $\alpha$ -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Jan 31;102(6):2162–7.
18. Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein. *Progress in Brain Research*. 2010;183:115–45.
19. Beyer K.  $\alpha$ -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathologica*. 2006 Jul 15;112(3):237-51.
20. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*. 2020 Feb 11;323(6):548–60.
21. PD MED Collaborative Group. Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for

Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *The Lancet*. 2014 Sep;384(9949):1196–205.

22. Elsworth JD. Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *Journal of Neural Transmission*. 2020 Mar 14;127(5).

23. Wallings RL, Humble SW, Ward ME, Wade-Martins R. Lysosomal Dysfunction at the Centre of Parkinson's Disease and Frontotemporal Dementia/Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends in Neurosciences*. 2019 Dec;42(12):899–912.

24. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008 Jan;132(1):27–42.

25. He C, Klionsky DJ. Autophagy and Neurodegeneration. *ACS Chemical Biology*. 2006 May 1;1(4):211–3.

26. Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagy in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Biology*. 2020 Apr 3;432(8):2651–72.

27. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*. 2010 Apr 2;584(7):1287–95.

28. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018 Apr 6;19(6):365–81.

29. Bonam SR, Tranchant C, Muller S. Autophagy-Lysosomal Pathway as Potential Therapeutic Target in Parkinson's Disease. *Cells*. 2021 Dec 15;10(12):3547.

30. Ahlberg J, Glaumann H. Uptake—Microautophagy—and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. *Experimental and Molecular Pathology*. 1985 Feb;42(1):78–88.

31. Malik BR, Maddison DC, Smith GA, Peters OM. Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease. *Molecular Brain*. 2019 Nov 29;12(1).

32. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*. 2013 Aug;19(8):983–97.

33. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885–9.
34. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006 Jun 15;441(7095):880–4.
35. Kumari S, MG S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research*. 2010 Feb 2;20(3):256–75.
36. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014 Jul;31:2–10.
37. Elkin SR, Lakoduk AM, Schmid SL. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2016 Feb 9;166(7-8):196–204.
38. Cosker KE, Segal RA. Neuronal Signaling through Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014 Feb 1;6(2):a020669–9.
39. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM. Degradation of  $\alpha$ -Synuclein by Proteasome \*. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Nov 26;274(48):33855–8.
40. Klein AD, Mazzulli JR. Is Parkinson’s disease a lysosomal disorder? *Brain*. 2018 May 30;141(8):2255–62.
41. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012 Dec 20;14(1):38–48.
42. Singleton AB. alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease. *Science*. 2003 Oct 31;302(5646):841–1.
43. Mutez E, Leprêtre F, Le Rhun E, Larvor L, Duflot A, Mouroux V, et al. SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson disease phenotypes. *Human Mutation*. 2011 Feb 8;32(4).

44. Maraganore DM. Collaborative Analysis of  $\alpha$ -Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease. *JAMA*. 2006 Aug 9;296(6):661.
45. Wang CK, Chen CM, Chang CY, Chang KH, Chen IC, Li ML, et al.  $\alpha$ -Synuclein promoter RsaI T-to-C polymorphism and the risk of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2006 Apr 11;113(10):1425–33.
46. Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, et al. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology*. 2007 Jan 24;68(12):916–22.
47. Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, et al. A novel  $\alpha$ -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*. 2013 Feb 20;80(11):1062–4.
48. Cuervo AM. Impaired Degradation of Mutant  $\alpha$ -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1292–5.
49. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild Type  $\alpha$ -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Aug;283(35):23542–56.
50. Bunk J, Prieto Huarcaya S, Drobny A, Dobert JP, Walther L, Rose-John S, et al. Cathepsin D Variants Associated With Neurodegenerative Diseases Show Dysregulated Functionality and Modified  $\alpha$ -Synuclein Degradation Properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021 Feb 11;9(581805).
51. Mak SK, McCormack AL, Manning-Boğ AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal Degradation of  $\alpha$ -Synuclein in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010 Apr 30;285(18):13621–9.
52. Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L. Abberant  $\alpha$ -Synuclein Confers Toxicity to Neurons in Part through Inhibition of Chaperone-Mediated Autophagy. Gendelman HE, editor. *PLoS ONE*. 2009 May 13;4(5):e5515.

53. Peng W, Minakaki G, Nguyen M, Krainc D. Preserving Lysosomal Function in the Aging Brain: Insights from Neurodegeneration. *Neurotherapeutics*. 2019 Jun 10;16(3):611–34.
54. Steinfeld R, Reinhardt K, Schreiber K, Hillebrand M, Kraetzner R, Wolfgang Brück, et al. Cathepsin D Deficiency Is Associated with a Human Neurodegenerative Disorder. *American Journal of Human Genetics*. 2006 Jun 1;78(6):988–98.
55. Smith K, Dahl HHM, Canafoglia L, Andermann E, Damiano JA, Michela Morbin, et al. Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics*. 2013 Apr 1;22(7):1417–23.
56. Galjart NJ, Morreau H, Willemsen R, Gillemans N, Bonten EJ, d’Azzo A. Human lysosomal protective protein has cathepsin A-like activity distinct from its protective function. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Aug;266(22):14754–62.
57. Sayad A, Noruzinia M, Zamani M, Harirchian MH, Kazemnejad A. Association Study of Cathepsin D Gene Polymorphism in Iranian Patients with Sporadic Late-Onset Alzheimer’s Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2014;37(5-6):257–64.
58. McGlinchey RP, Lee JC. Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Jul 13;112(30):9322–7.
59. McGlinchey RP, Lacy SM, Huffer KE, Tayebi N, Sidransky E, Lee JC. C-terminal  $\alpha$ -synuclein truncations are linked to cysteine cathepsin activity in Parkinson’s disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 May 15;294(25):9973–84.
60. Hopfner F, Mueller SH, Szymczak S, Junge O, Lukas Tittmann, May S, et al. Rare Variants in Specific Lysosomal Genes Are Associated With Parkinson’s Disease. *Movement Disorders*. 2020 Apr 8;35(7):1245–8.
61. Abbott SK, Li H, Muñoz SS, Knoch B, Batterham M, Murphy KE, et al. Altered ceramide acyl chain length and ceramide synthase gene expression in Parkinson’s disease. *Movement Disorders*. 2013 Oct 30;29(4):518–26.

62. Yun SP, Kim D, Kim S, Kim S, Karuppagounder SS, Kwon SH, et al.  $\alpha$ -Synuclein accumulation and GBA deficiency due to L444P GBA mutation contributes to MPTP-induced parkinsonism. *Molecular neurodegeneration*. 2018;13(1):1.
63. Adler CH, Beach TG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, et al. GBA mutations in Parkinson disease: earlier death but similar neuropathological features. *European Journal of Neurology*. 2017 Nov 1;24(11):1363–8.
64. Blauwendraat C, Reed X, Krohn L, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Tan M, et al. Genetic modifiers of risk and age at onset in GBA associated Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Brain*. 2019 Nov 22;143(1):234–48.
65. Stojkowska I, Krainc D, Mazzulli JR. Molecular mechanisms of  $\alpha$ -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*. 2017 Oct 24;373(1):51–60.
66. Kinghorn KJ. Pathological looping in the synucleinopathies: investigating the link between Parkinson's disease and Gaucher disease. *Disease Models & Mechanisms*. 2011 Nov 1;4(6):713–5.
67. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased  $\alpha$ -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2014 Jan 28;137(3):834–48.
68. Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, et al. Acid  $\beta$ -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter  $\alpha$ -synuclein processing. *Annals of Neurology*. 2011 Jun 1;69(6):940–53.
69. Mazzulli Joseph R, Xu YH, Sun Y, Knight Adam L, McLean Pamela J, Caldwell Guy A, et al. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and  $\alpha$ -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell*. 2011 Jul;146(1):37–52.
70. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2):441.

71. Antía Custodia, Aramburu-Núñez M, Correa-Paz C, Adrián Posado-Fernández, Gómez-Larrauri A, Castillo J, et al. Ceramide Metabolism and Parkinson's Disease—Therapeutic Targets. *Biomolecules*. 2021 Jun 25;11(7):945–5.
72. Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui K, Ozono K. Six novel mutations detected in the *GALC* gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease, and new genotype–phenotype correlation. *Journal of Human Genetics*. 2006 Apr 11;51(6):548–54.
73. Konstantin Senkevich, Zorca CE, Dworkind A, Uladzislau Rudakou, Somerville E, Yu E, et al. *GALC* variants affect galactosylceramidase enzymatic activity and risk of Parkinson's disease. *Brain*. 2022 Nov 11;146(5):1859–72.
74. Schuchman EH, Desnick RJ. Types A and B Niemann-Pick Disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2017;120(1-2):27–33.
75. Chuang WL, Pacheco J, Cooper S, McGovern MM, Cox GF, Keutzer J, et al. Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann–Pick B patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014 Feb 1;111(2):209–11.
76. Jenkins RW, Idkowiak-Baldys J, Simbari F, Canals D, Roddy P, Riner CD, et al. A novel mechanism of lysosomal acid sphingomyelinase maturation: requirement for carboxyl-terminal proteolytic processing. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011 Feb 4;286(5):3777–88.
77. Foo JN, Liany H, Bei JX, Yu XQ, Liu J, Au WL, et al. A rare lysosomal enzyme gene *SMPD1* variant (p.R591C) associates with Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 2013 Dec;34(12):2890.e13–5.
78. Alcalay RN, Mallett V, Vanderperre B, Tavassoly O, Dauvilliers Y, Wu RYJ, et al. *SMPD1* mutations, activity, and  $\alpha$ -synuclein accumulation in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2019 Feb 20;34(4):526–35.
79. van Veen S, Martin S, Van den Haute C, Benoy V, Lyons J, Vanhoutte R, et al. *ATP13A2* deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*. 2020 Jan 29;578(7795):419–24.

80. Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, et al.  $\alpha$ -Synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nature Genetics*. 2009 Mar 1;41(3):308–15.
81. Schultheis PJ, Hagen TT, O'Toole KK, Tachibana A, Burke CR, McGill DL, et al. Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004 Oct 1;323(3):731–8.
82. Vrijssen S, Besora-Casals L, Sarah van Veen, Zielich J, Van C, Norin Nabil Hamouda, et al. ATP13A2-mediated endo-lysosomal polyamine export counters mitochondrial oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020 Nov 23;117(49):31198–207.
83. Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron MH., Doudnikoff E, et al. Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 May 30;109(24):9611–6.
84. A. Di Fonzo, Hsin Fen Chien, Socal MP, Giraudo S, Tassorelli C, G. Iliceto, et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007 May 8;68(19):1557–62.
85. Lees AJ, Singleton AB. Clinical heterogeneity of ATP13A2 linked disease (Kufor-Rakeb) justifies a PARK designation. *Neurology*. 2007 May 7;68(19):1553–4.
86. Williams DR, Hadeed A, al-Din ASN, Wreikat AL, Lees AJ. Kufor Rakeb Disease: Autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Movement Disorders*. 2005 Oct;20(10):1264–71.
87. Jinn S, Drolet RP, Cramer PE, Andus Wing-Kuen Wong, Toolan D, Gretzula CA, et al. TMEM175 deficiency impairs lysosomal and mitochondrial function and increases  $\alpha$ -synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 28;114(9):2389–94.
88. Cang C, Aranda K, Seo Y, Gasnier B, Ren D. TMEM175 Is an Organelle K<sup>+</sup> Channel Regulating Lysosomal Function. *Cell*. 2015 Aug;162(5):1101–12.

89. Hu M, Li P, Wang C, Feng X, Geng Q, Chen W, et al. Parkinson's disease-risk protein TMEM175 is a proton-activated proton channel in lysosomes. *Cell*. 2022 Jun 23;185(13):2292-2308.e20.
90. Jinn S, Blauwendraat C, Toolan D, Gretzula CA, Drolet RE, Smith S, et al. Functionalization of the TMEM175 p.M393T variant as a risk factor for Parkinson disease. *Human Molecular Genetics*. 2019 Jun 7;28(19):3244–54.
91. Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Björklund A. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from  $\alpha$ -synuclein toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Apr 22;110(19).
92. Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*. 2010 Sep 15;30(37):12535–44.
93. Zhuang XX, Wang SF, Tan Y, Song JX, Zhu Z, Wang ZY, et al. Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models. *Cell Death & Disease*. 2020 Feb;11(2).
94. Chen M, Dai Y, Liu S, Fan Y, Ding Z, Li D. TFEB Biology and Agonists at a Glance. *Cells*. 2021 Feb 5;10(2):333.
95. Hunziker W, Geuze HJ. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays*. 1996 May;18(5):379–89.
96. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006 Oct 1;27(5-6):495–502.
97. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Archives of Neurology*. 2010 Dec 1;67(12).
98. Cookson MR. LRRK2 Pathways Leading to Neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2015 May 26;15(7).

99. Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans E, Whitney G, Gilks W, Simón J, van der Brug M, et al. Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron*. 2004 Nov;44(4):595–600.
100. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron*. 2004 Nov;44(4):601–7.
101. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nature Neuroscience*. 2013 Mar 3;16(4):394–406.
102. Martínez-Vicente M. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015 Apr;40:115–26.
103. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004 Jul;5(7):554–65.
104. Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017 Nov 17;17(2):133–50.
105. Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2017 Nov 1;60(1):13–8.
106. Parenti G, Medina DL, Ballabio A. The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Molecular Medicine*. 2021 Jan 18;13(2).
107. Edelmann MJ, Maegawa GHB. CNS-Targeting Therapies for Lysosomal Storage Diseases: Current Advances and Challenges. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020 Nov 12;7(559804).
108. Biffi A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: a good start. *Human Molecular Genetics*. 2015 Nov 24;25(R1):R65–75.
109. Massaro G, Geard AF, Liu W, Coombe-Tennant O, Waddington SN, Baruteau J, et al. Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: Ongoing Studies and Clinical Development. *Biomolecules*. 2021 Apr 20;11(4):611.

110. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Brown E, Hayes MA, et al. Glucocerebrosidase gene therapy prevents  $\alpha$ -synucleinopathy of midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of Disease*. 2015 Oct;82(378):495–503.
111. Morabito G, Giannelli S, Ordazzo G, Bido S, Castoldi V, Marzia Indrigo, et al. AAV-PHP.B-Mediated Global-Scale Expression in the Mouse Nervous System Enables GBA1 Gene Therapy for Wide Protection from Synucleinopathy. *Molecular Therapy*. 2017 Dec 6;25(12):2727–42.
112. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Molecular Therapy*. 2015 Jul 1;23(7):1138–48.
113. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, Boyd R, Lee G, Flanagan JJ, et al. Identification and Characterization of Pharmacological Chaperones to Correct Enzyme Deficiencies in Lysosomal Storage Disorders. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2011 Jun;9(3):213–35.
114. Zunke F, Moise AC, Belur NR, Gelyana E, Stojkowska I, Dzaferbegovic H, et al. Reversible Conformational Conversion of  $\alpha$ -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. *Neuron*. 2018 Jan 3;97(1):92-107.e10.
115. Mazzulli JR, Zunke F, Tsunemi T, Toker NJ, Jeon S, Burbulla LF, et al. Activation of  $\beta$ -Glucocerebrosidase Reduces Pathological  $\alpha$ -Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2016 Jul 20;36(29):7693–706.
116. Migdalska-Richards A, Daly L, Bezard E, Schapira AHV. Ambroxol effects in glucocerebrosidase and  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. *Annals of Neurology*. 2016 Nov;80(5):766–75.
117. Jonas, Kruithof AC, Guido van Amerongen, Kam, Thijssen E, Grievink HW, et al. A randomized single and multiple ascending dose study in healthy volunteers of LTI-291, a centrally penetrant glucocerebrosidase activator. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2021 Mar 2;87(9):3561–73.

118. Melamed D. BIAL Acquires Parkinson's Treatment LTI-291, Opens US Research Center [Internet]. Parkinson's News Today. 2020
119. Mullin S, Smith L, Lee K, D'Souza G, Woodgate P, Elflein J, et al. Ambroxol for the Treatment of Patients With Parkinson Disease With and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations. *JAMA Neurology*. 2020 Apr 1;77(4):427.
120. Gegg ME, Menozzi E, Schapira AHV. Glucocerebrosidase-associated Parkinson disease: Pathogenic mechanisms and potential drug treatments. *Neurobiology of Disease*. 2022 May;166(166):105663.
121. Vidoni C, Follo C, Savino M, Melone MAB, Isidoro C. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Medicinal Research Reviews*. 2016 Apr 26;36(5):845–70.
122. Kilpatrick K, Zeng Y, Hancock T, Segatori L. Genetic and Chemical Activation of TFEB Mediates Clearance of Aggregated  $\alpha$ -Synuclein. Komatsu M, editor. *PLOS ONE*. 2015 Mar 19;10(3):e0120819.