

Denise Inês Simões Janeiro

**Estratégias terapêuticas baseadas nos
mecanismos fisiopatológicos conhecidos na
Doença de Alzheimer**

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Herrero Valverde

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Ciências da Saúde

Lisboa

2015

Denise Inês Simões Janeiro

Estratégias terapêuticas baseadas nos mecanismos fisiopatológicos conhecidos na Doença de Alzheimer

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Licenciatura com Mestrado Integrado conferido pela Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador científico: Professora Doutora Ana Maria Herrero Valverde

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Ciências da Saúde

Lisboa

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais que sempre me apoiaram e ajudaram em tudo. Um grande obrigado também por toda a paciência naqueles momentos mais difíceis.

Quero agradecer ao meu marido, primeiro por me ter dado o exemplo e a disciplina necessária para realizar este trabalho e por fim, por me ter apoiado incondicionalmente.

Por fim, os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, professora doutora Ana Valverde, por estar sempre atenta e disponível e também por toda a sua simpatia.

Resumo

O trabalho exposto é uma revisão bibliográfica com o objetivo de fazer uma reflexão sobre a terapêutica existente, ou em desenvolvimento com base nos mecanismos implicados na etiologia da Doença de Alzheimer.

A medicação disponível no mercado apenas atua a nível sintomático e não na progressão da doença, o que traduz a urgência do desenvolvimento de novas opções terapêuticas. As alternativas apresentadas passam pela imunoterapia baseada nas duas principais características da doença, presença de placas amilóides eovelos neurofibrilares, sendo estas as abordagens mais promissoras. No entanto, a imunoterapia com base na hipótese amilóide não tem surtido efeitos encorajadores podendo a sua ineficácia ser atribuída à administração tardia do fármaco. Como complemento da terapêutica, surgem ainda outras opções terapêuticas como a administração de antioxidantes, dos quais são exemplos vitamina E e C, extrato EGb 761 de *Ginkgo biloba*.

No final do trabalho é ainda apresentada uma proposta de esquema terapêutico para a fase prodrômica e de declínio cognitivo ligeiro que sugere uma terapia múltipla contemplando os mecanismos fisiopatológicos discutidos.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, β -amilóide, proteína tau

Abstract

The presented work is a literature review in order to make a reflection on the treatment available or in development based on the mechanisms involved in the etiology of Alzheimer's disease.

The treatment currently available on the market only operates on a symptomatic level and not on the disease progression, reflecting the urgent need for new therapeutic options. The alternatives presented focus on immunotherapy based on the two major features of the disease, presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which show up as the most promising approaches. However, immunotherapy based on the amyloid hypothesis has not had encouraging its effects which might be explained by the delayed drug administration. As therapeutic addition, there are even other therapeutic options such as the administration of antioxidants, for example vitamin E and C, EGb 761 extract of Ginkgo biloba.

Finally are proposed two therapeutic regimens, one for the prodromal phase and the other for mild cognitive decline that suggests a multiple therapy contemplating the discussed pathophysiological mechanisms.

Keywords: *Alzheimer's Disease, β -amyloid, tau protein*

Abreviaturas

AAC – Angiopatia Amilóide Cerebral
A β – Proteína β -Amilóide
ADNP – Proteína Neuroprotetora Atividade-Dependente
AGE – produtos finais avançados de glicosilação
AINE – Anti-Inflamatórios Não Esteróides
ApoE – Apolipoproteína E
ATP – Adenosina Tri-Fosfato
APP – Proteína Percursora Amilóide
BHE – Barreira Hemato-Encefálica
CDK5 – Quinase-5 Ciclina-Dependente
CK – Creatinina-Quinase
DA – Doença de Alzheimer
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
Dyrk1A – *dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase*
FGF – Fator de Crescimento dos Fibroblastos
GSK/GSK-3 β – Quinase Glicogénio Sintase
I χ PP2A – Inibidor da Proteína Fosfatase 2A
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
Li₃PQQ – Tri-Lítio Pirroloquinolina Quinona
LRP-1 – Proteína Recetora de Lipoproteína 1 (LRP-1)
MARK – Quinase Reguladora da Afinidade do Microtúbulo
MCI – Declínio Cognitivo Ligeiro
MMP9 – Matriz Metalopeptidase 9 (MMP9)
MPTP - Poro Mitocondrial de Permeabilidade Transitória
NAP – Davunetide
NFT – Emaranhados Neurofibrilares
NMDA – Recetor N-metil-D-aspartato
PHF – Filamentos Helicoidais Emparelhados
PP2A – Proteína Fosfatase 2A
PRR – Recetores Reconhecedores de Padrões
RNA – Ácido Ribonucleico
RNS – Espécies Reativas de Nitrogénio
ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SF – Filamentos Retos

SNC – Sistema Nervoso Central

SR – Recetores *Scavenger*

TLR – Recetores *Toll-Like* (TLR)

UPS – Sistema de Ubiquitina-Proteossoma (UPS)

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
<i>Abstract</i>	4
Abreviaturas	5
Índice de Ilustrações	9
Índice de Tabelas.....	9
Introdução	10
I. Fisiopatologia da Doença de Alzheimer.....	11
1.1. Placas β -Amilóides	11
1.1.1. Agregados β -Amilóides e Placas Senis	11
1.2. Disfunção da Proteína Tau	14
1.2.1. Neurodegenerescência Induzida	14
1.2.2. Interação β -amilóide-tau	17
1.3. Hipótese da Inflamação	18
1.3.1. Funções da Microglia e Consequências do Envelhecimento.....	18
1.3.2. Modelo Inflamatório	21
1.4. <i>Stress</i> oxidativo	25
1.4.1. Radicais Livres	25
1.4.2. Disfunção Mitocondrial.....	27
1.4.3. Apolipoproteína E	30
II. Estratégia Terapêutica.....	31
2.1. Terapêutica com Base na Hipótese Amilóide	31
2.1.1. Inibição da β e γ -secretase e ativação da α -secretase.....	31
2.1.2. Inibição da agregação ou acumulação.....	32
2.1.3. Imunoterapia com alvo A β	32
2.2. Terapêutica com Base na Patologia de Tau	35
2.2.1. Modulação da fosforilação de tau	35

2.2.2. Estabilização do microtúbulo	36
2.2.3. Inibição da agregação de tau.....	37
2.2.4. Redução dos níveis de tau	37
2.2.5. Imunoterapia com alvo tau.....	38
2.3. Terapêutica Antioxidante	40
2.3.1. Antioxidantes	40
2.3.2. Outros compostos.....	41
2.4. Terapêutica com Células Estaminais.....	41
2.5. Terapêutica Baseada no Neurotransmissor Histamina	42
2.6. Proposta de Esquema Terapêutico.....	42
2.6.1. Fase prodrômica.....	42
2.6.2. Fase de declínio cognitivo ligeiro	44
Conclusão	46

Índice de Ilustrações

Ilustração 1 - Locais de clivagem da APP pelas diferentes secretases.	11
Ilustração 2 - Estrutura do péptido β amilóide [12].....	11
Ilustração 3 - Estruturas amilóides a) péptido amilóide, b) monómero oligomérico, c) monómero fibrilhar, d) agregado oligomérico, e) agregado fibrilhar [13].	12
Ilustração 4 - Destabilização dos microtúbulos e formação de novelos neurofibrilares.	15
Ilustração 5 - Mecanismo endossomal-lisossomal com agregação de tau [31].	16
Ilustração 6 - Localização do córtex entorrinal (fonte: http://www.methodus.com.br/artigo/701/o-lugar-do-movimento.html).....	16
Ilustração 7 - Envelhecimento saudável [8].	22
Ilustração 8 - Envelhecimento patológico [8].	23
Ilustração 9 - Lesão mitocondrial na Doença de Alzheimer [10].	29
Ilustração 10 – Proposta de esquema terapêutico para a fase prodrômica da Doença de Alzheimer.....	43
Ilustração 11 - Proposta de esquema terapêutico para a fase de declínio cognitivo ligeiro da Doença de Alzheimer.	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação das afinidades de ligação das diferentes imunoterapias em desenvolvimento e da fase em que são administradas à população alvo [40,44].	34
---	----

Introdução

A Doença da Alzheimer (DA) é a demência senil mais prevalente e constitui um problema de saúde pública de grande importância devido ao aumento do envelhecimento da população mundial como consequência da melhoria geral dos cuidados de saúde e aumento da esperança de vida. Embora os tratamentos disponíveis não parem a progressão da doença, controlam/melhoram/atenuam os sintomas de demência e melhoram a qualidade de vida dos doentes e de quem cuida destes. Neste momento existem esforços para encontrar maneira de tratar a DA, atrasar o seu aparecimento e prevenir o seu desenvolvimento [1,2,3,4].

O sintoma mais proeminente da DA é a perda progressiva de memória e verifica-se que o doente começa por experienciar pequenas perdas de memória episódica, tal como repetir-se a si mesmo ou esquecer eventos recentes. Nesta altura os sintomas ainda não representam perda funcional, sendo possível esta fase como prodrómica. A fase prodrómica é a fase pré-demência da DA, em que os doentes ainda não possuem demência mas é possível diagnosticar a DA com base em biomarcadores específicos. Uma outra fase inicial da DA é a fase de declínio cognitivo ligeiro (MCI) que tem como sintomas diminuição da memória objetiva, sem afetar as tarefas diárias. Neste grupo, a progressão para o quadro de demência é muito mais rápida. A relevância destes termos prende-se na escolha da terapêutica mais adequada. No caso de fases como a prodrómica e MCI, os alvos terapêuticos serão os mecanismos de progressão para estádios mais graves da doença [1,5,6].

Relativamente à patologia ou base patológica, as suas principais características são a presença de placas amilóides, também conhecidas como placas senis, emaranhados (novelos) neurofibrilares (NFT) e morte celular neuronal. As causas da doença continuam em estudo, encontrando-se as teorias patogénicas focadas nas moléculas implicadas na fisiopatologia da doença [2,3,4].

De entre os vários mecanismos fisiopatológicos conhecidos, a hipótese da cascata amilóide é a mais estudada e a que tem dado origem a mais hipóteses terapêuticas. No entanto, surgem outras hipóteses que focam a formação de radicais livres, disfunção mitocondrial, processos inflamatórios e fatores genéticos para desenvolvimento de terapias alternativas ou adjuvantes. Todos estes fatores podem interagir e amplificar os efeitos resultando num ciclo vicioso de toxicidade dando origem a disfunção neuronal e, finalmente, morte celular [4].

I. Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

1.1. Placas β -Amilóides

Nos últimos 20 anos a teoria da cascata β -amilóide é a que tem reunido maior consenso a nível académico, sendo uma das mais investigadas. Esta hipótese postula que, na DA, há deposição de péptidos β -amilóides ($A\beta$) que se vão agregar em placas, resultando em perda neuronal e sináptica [7,8,9].

1.1.1. Agregados β -Amilóides e Placas Senis

Uma das principais características da DA é a deposição de fibrilhas amilóides insolúveis sob a forma de placas amilóides que são constituídas por péptidos de $A\beta$, formados por 39 a 42 aminoácidos, sendo as formas mais abundantes a $A\beta$ 42 e a $A\beta$ 40, esta última representando 80 a 90% do total produzido [10,11,12,13].



Ilustração 1 - Locais de clivagem da APP pelas diferentes secretases.

Os péptidos de $A\beta$ (Ilustração 2) resultam da proteólise sequencial da proteína precursora amilóide (APP) pelas enzimas β -secretase e γ -secretase (Ilustração 1). A APP é uma proteína transmembranar tipo I que tem expressão em vários tecidos, com maior quantidade no tecido cerebral. Os péptidos originados na proteólise da APP pelas enzimas mencionadas, são particularmente propensos a

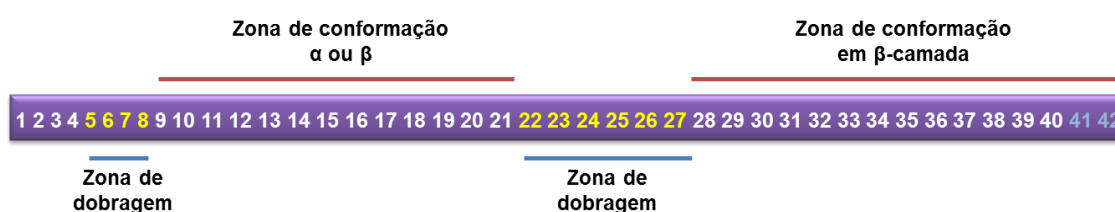


Ilustração 2 - Estrutura do péptido β amilóide [12].

sofrer oligomerização e fibrilhação, resultando nas espécies patogénicas. Estes fenómenos são favorecidos em condições patológicas, nomeadamente na DA, pois a produção de péptidos A β e/ou a sua capacidade de agregação estão aumentadas.

Por outro lado, a α -secretase pode cortar a APP no centro evitando a formação de péptidos de A β e, desta forma, a sua agregação [7,9,10,11,12,13,14,15,16].

Em termos estruturais (Ilustração 2 / Ilustração 3a), os péptidos podem adotar duas conformações. Uma em que há dobramento das regiões 1-8 e 22-27, que vai originar os monómeros oligoméricos (Ilustração 3b), ou apenas um dobramento na região 22-27 para formar os monómeros fibrilares (Ilustração 3c). No caso dos monómeros oligoméricos, estes podem agrupar-se originando à forma oligomérica A β , que pode ser composta por 5 (exemplo na Ilustração 3d) ou 6 péptidos que podem associar-se para formar conjuntos de dez ou doze péptidos ainda mais tóxicos. A forma oligomérica surge, então, como espécie patológica primária,

insolúvel e mais tóxica. A toxicidade da forma oligomérica é dependente da conformação, tamanho e concentração [10,12,13,17,18].

A forma oligomérica induz fatores pró-inflamatórios que, juntamente com o *stress* oxidativo, provocam desregulação da microglia dando origem ao processo inflamatório neurodegenerativo característico da DA. Este processo conduz ao aparecimento de sintomas, nomeadamente diminuição das funções cognitivas, como a aprendizagem e a memória. Numa fase mais avançada, origina também disfunção neuronal [14,18,19,20].

No caso do monómero fibrilhar, a conformação adotada é denominada β -camada e pode formar protofibrilhas/protofilamentos pela associação de duas ou mais

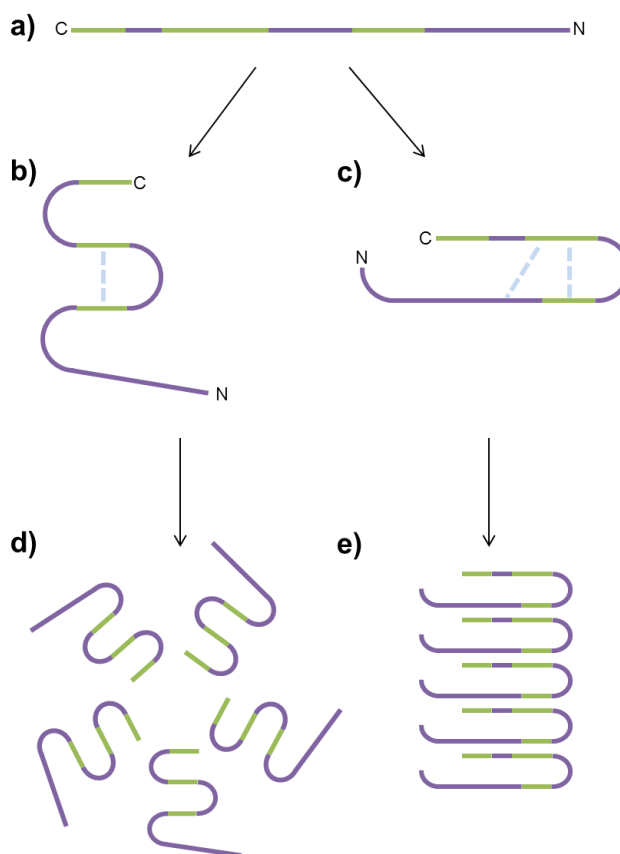


Ilustração 3 - Estruturas amilóides a) péptido amilóide, b) monómero oligomérico, c) monómero fibrilhar, d) agregado oligomérico, e) agregado fibrilhar [13].

β -camadas. Estas vão agir como precursoras conferindo o núcleo para as fibrilhas. As fibrilhas são constituídas por 5 ou 6 protofilamentos dispostos paralelamente (Ilustração 3e) com ligações de hidrogénios que as mantêm unidas. As diferentes β -camadas possuem um eixo perpendicular que vai conferir à fibrilha uma estrutura em β -cruz. À medida que as fibrilhas se vão formando, esta espécie vai-se tornando cada vez menos tóxica, não perdendo, porém a sua toxicidade. As fibrilhas amilóides são depois depositadas no meio extracelular como placas neuríticas/placas senis no córtex cerebral. As placas senis são áreas esféricas constituídas pelo núcleo amilóide com uma camada exterior de axónios e dendrites degenerados, rodeados por fragmentos dos mesmos. Estas placas apresentam elevada toxicidade para as sinapses e neurónios provocando destruição das membranas, com perda da função sináptica e morte celular, verificando-se uma correlação entre a formação de placas e a perda de sinapses. As placas senis encontram-se principalmente na matéria cinzenta cerebral, pois é o local onde se encontram os corpos celulares dos neurónios [12,13,14,15,17,18,21,22].

A deposição de $A\beta$ no cérebro ocorre não só a nível do parênquima mas também nas paredes dos vasos sanguíneos provocando angiopatia amilóide cerebral (AAC) outro fenómeno frequentemente encontrado em pacientes com DA. A AAC é uma das causas de hemorragia intracerebral em pacientes idosos [23,24].

1.2. Disfunção da Proteína Tau

A proteína tau é uma proteína associada ao microtúbulo que tem como funções a regulação da montagem, estabilidade, comportamento dinâmico e organização espacial dos microtúbulos. Esta proteína encontra-se normalmente fosforilada e é o grau de fosforilação que determina a sua ligação aos microtúbulos. Estudos recentes revelaram que também regula o transporte axonal de vesículas e organelos, incluindo mitocôndrias [2,10,16,25,26].

Esta proteína é codificada por apenas um gene que expressa seis isoformas, definidas pelo número de repetições na porção de ligação à tubulina, e possui dois domínios, uma projeção localizada na porção N-terminal e um domínio de ligação ao microtúbulo na porção C-terminal, que pode ter 3 (3R) ou 4 (4R) repetições que, no cérebro adulto saudável, existem em quantidades iguais [2,10,16,26].

As doenças neurodegenerativas caracterizadas pela acumulação de agregados de tau no cérebro são denominadas taupatias. Nas taupatias, a proteína tau forma estruturas fibrilares intracelulares de agregados de tau hiperfosforilados e ubiquitinados (ver ponto seguinte), que estão associados a perda neuronal e sináptica [2,25,26,27].

De facto, no que diz respeito ao défice cognitivo observado nos doentes com DA, a taupatia explica melhor a fisiopatologia da doença do que a hipótese da cascata β -amiloide [2,26].

1.2.1. Neurodegenerescência Induzida

Na DA verifica-se uma acumulação de proteína tau no pericário¹ neuronal. A nível celular, começa por haver hiperfosforilação da proteína tau, que resulta no enfraquecimento da ligação da mesma ao microtúbulo conduzindo à sua desestabilização. A proteína tau hiperfosforilada migra do compartimento axonal para o compartimento somatodendrítico onde a sua acumulação conduz à formação de agregados na forma de inclusões filamentosas que se encontram nas várias células, nomeadamente nos neurónios, astrócitos e oligodendroglia. Este fenómeno resulta na perda dos microtúbulos dendríticos e sinapses, degenerescência da membrana plasmática e, eventualmente, morte celular [2,16,26,28].

¹ Corpo celular neuronal.

A neurodegenerescência induzida pela proteína tau é consequência da combinação da perda de funções da proteína com o ganho de funções tóxicas. Por um lado, a perda de proteínas tau pelos microtúbulos, resultante da hiperfosforilação ou mutação, conduz à perda gradual da função dos microtúbulos, do transporte axonal seguida de disfunção sináptica, e perda neuronal. Por outro lado, as moléculas de tau hiperfosforiladas têm tendência a formar filamentos helicoidais emparelhados (PHF) ou filamentos retos (SF) que juntos vão formar emaranhados ou novelos neurofibrilares (NFT) (Ilustração 4). Estas moléculas também têm a capacidade de sequestrar moléculas tau normais (e talvez outras moléculas constituintes dos microtúbulos), e formar agregados, que vão ter um impacto negativo na função normal do microtúbulo [2,10,16,26,27,28,29,30,31].

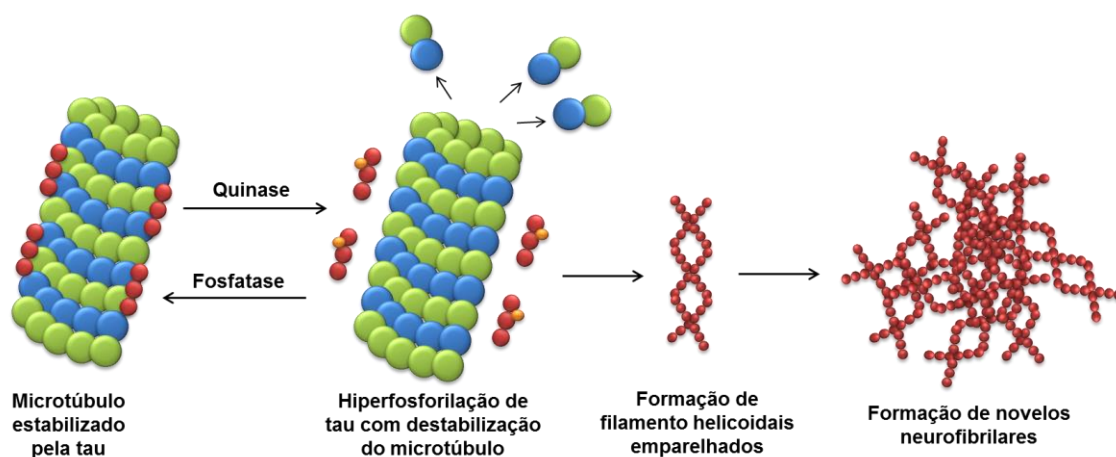


Ilustração 4 - Destabilização dos microtúbulos e formação de novelos neurofibrilares.

Além da destabilização dos microtúbulos e formação de NFT originada pela hiperfosforilação da tau, existe outro mecanismo celular que contribui para o aumento de NFT e perda neuronal, nomeadamente o mecanismo endossomal-lisossomal que, com o avançar da idade fica comprometido. Na Ilustração 5 pode observar-se que variadas proteínas e produtos de metabolismo celular são sujeitas ao processo de digestão lisossomal. No entanto, com o aumento de idade, este processo torna-se deficiente libertando estes produtos semi-digeridos que se acumulam no citosol na forma de lipofuscina. Estes depósitos constituem o substrato inicial para a nucleação dos agregados de tau. A tau oligomérica forma agregados, podendo capturar tau normal no processo, originando PHF. Como os oligómeros de tau são resistentes à proteases citosólicas, apenas são removidos pelo mecanismo endossomal-lisossomal o que vai provocar maior congestão e disfunção do processo lisossomal. Entretanto, os agregados de tau propagam-se pela célula e formam NFT. Por outro lado, os agregados oligoméricos de tau, proteoliticamente estáveis, vão propagar-se para

neurónios adjacentes por exocitose/endocitose ou via nanotubos. Isto conduz à propagação autocatalítica da cascata de agregação de tau a todos os neurónios interconectados [31].

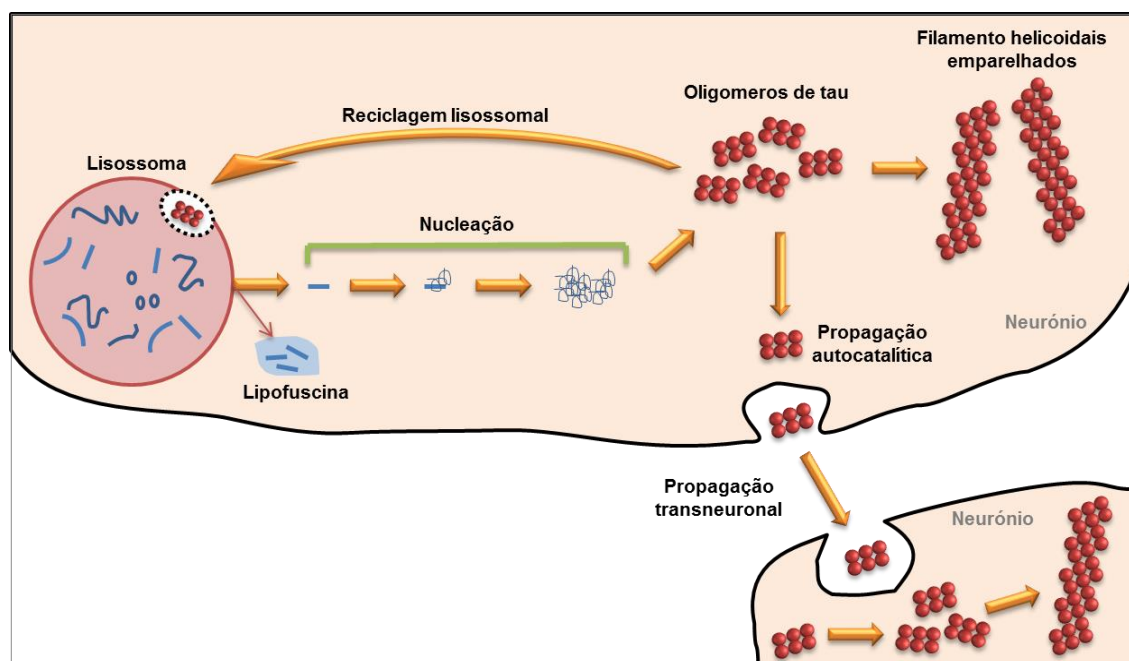


Ilustração 5 - Mecanismo endossomal-lisossomal com agregação de tau [31].

Desde que se separa dos microtúbulos até formar os agregados, a proteína tau também sofre alterações pós-translacionais como truncação, glicosilação, O-GlcNAcilação, ou seja, adição de uma N-acetilglicosamina na ligação O-glicosídica de um resíduo de serina ou treonina, e ubiquitinação, que é a ligação de uma ubiquitina ao grupo amina de um resíduo de lisina, que também contribuem para a patologia. Nesta fase, a forma oligomérica de tau pode ser libertada para o espaço extracelular, onde vai agir como agente transmissor, espalhando a patologia pelo cérebro. Isto pode ser confirmado pelo facto de no início da doença se detetar novelos de tau apenas no córtex entorrinal (Ilustração 6) e à medida que a doença progride, a patologia de tau alastrar para o hipocampo e córtex. Adicionalmente, a tau não funcional sequestra proteínas tau fosforiladas, evitando que estas se liguem ao microtúbulo conduzindo a maior disfunção [2,7,10,26,29].

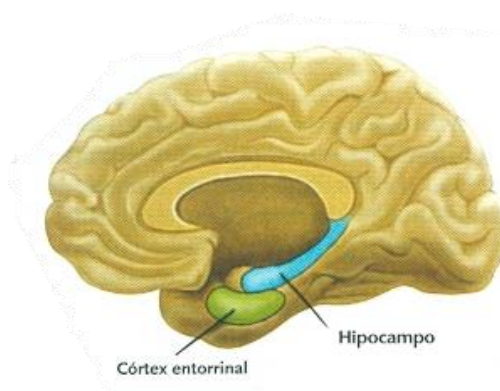


Ilustração 6 - Localização do córtex entorrinal
(fonte: <http://www.methodus.com.br/artigo/701/o-lugar-do-movimento.html>).

Também se verifica a presença de microglia ativada na proximidade de NFT em fases iniciais e finais da formação dos mesmos reforçando a correlação entre a resposta inflamatória e as lesões neurofibrilares provocadas por tau [20,29].

Durante muito tempo, os emaranhados ou fibrilhas foram considerados as espécies patológicas. No entanto, recentemente tem-se verificado que, tal como acontece com as placas amilóides, os NFT são a fase final do processo patológico e as lesões são provocadas por espécies hiperfosforiladas intermédias, provavelmente espécies tau oligoméricas solúveis [2].

1.2.2. Interação β -amilóide-tau

A interação da A β e tau na fisiopatologia da DA é um assunto de intensa investigação, visto a presença de placas amilóides e NFT serem as principais características da patologia. Embora a maior parte das evidências indicarem que alterações de tau ocorrem após o aparecimento de A β , na verdade a taupatia precede a deposição de agregados amilóides, verificando-se ainda que a sobreexpressão de tau aumenta a deposição amilóide. Verificou-se ainda que a estimulação neuronal contínua é responsável pela secreção de tau e produção de A β [7,31].

A observação de que as placas neuríticas/senis se desenvolvem gradualmente nas áreas de projeção de neurónios com NFT indica que os NFT se desenvolvem apenas em neurónios cujos neuritos estão envolvidos na formação de placas senis. Isto é sustentado pela observação de tecido cerebral de doentes com DA que exibem neuritos inchados e distróficos que participam na formação de placas que também contêm tau hiperfosforiladas. Estes factos reforçam a hipótese de que os NFT se formam em resposta à axonopatia com acumulação e clivagem descontrolada de APP com consequente formação de placas, e não como consequência da patologia A β [8,32].

Esta relação é difícil de explicar se o agente causador da cascata de agregação de tau for a mutação do complexo APP/presenilina, ou seja, no caso de a etiologia ter origem genética. No entanto, na forma esporádica, se a ligação entre eles é a falha do mecanismo endossomal-lisossomal, então a acumulação de A β pode apenas ser outra manifestação da falha deste mecanismo resultante da doença tau-lisossomal [31].

1.3. Hipótese da Inflamação

A resposta inflamatória resulta, quase sempre, de um estímulo inicial, como trauma ou infeção. A resposta inflamatória aguda no SNC originada pela ativação imediata das células da glia como resposta a estímulos nocivos, traduz-se numa resposta defensiva para reparar a área lesada. No entanto, se o estímulo for contínuo, desenvolve-se uma condição inflamatória crónica que leva a um fenómeno cumulativo de lesões ao longo do tempo [20].

Na fisiopatologia da DA, o processo inflamatório tem sido considerado desde uma possível causa da doença a um subproduto ou mesmo uma resposta benéfica da mesma, embora este ainda seja bastante controverso. Esta hipótese tem suscitado interesse devido à presença de quantidades elevadas de citocinas, quimiocinas, produtos de complemento e radicais de oxigénio no tecido cerebral de pessoas com DA. Estes mediadores inflamatórios podem resultar da ligação de péptidos A β a recetores celulares de superfície induzindo expressão de genes pro-inflamatórios. Por outro lado, a A β também interage com as citocinas pro-inflamatórias de maneira sinérgica, induzindo danos neuronais via mecanismos dependentes de ROS. Os captadores de ROS, como a catalase, reduzem a ativação do fator nuclear kB (NF-kB), um fator de transcrição que medeia respostas imunes e inflamatórias e que, consequentemente, diminui o elevado nível de IL-1 β (mediador pró-inflamatório) induzido pelo A β . De acordo com estes mecanismos, podem ser adotadas estratégias para tratamento visando a supressão do *stress* oxidativo e da ativação de NF-kB, que vai resultar na atenuação da neuroinflamação e dos danos neuronais. A hipótese da inflamação realça que a microglia hiperativa é a principal causa da neurotoxicidade associada à DA. A ativação prolongada da microglia pode também prejudicar o complexo lisossomal enzimático tornando estas células incapazes de remover lesões próprias da DA. Portanto, à medida que a doença progride as células da microglia podem tornar-se disfuncionais ou senescentes, o que é corroborado pela associação de microglia fragmentada nas patologias do tau [8,14,20,23,29,33,34].

1.3.1. Funções da Microglia e Consequências do Envelhecimento

Como agentes fagocitários a nível cerebral, uma visão amplamente aceite defende que as células da microglia são recrutadas para remover depósitos de proteínas A β . No entanto, à medida que a idade avança, associada à DA, a microglia

torna-se ineficaz e o declínio das suas funções, nomeadamente do mecanismo de remoção de resíduos celulares pode originar não só um ambiente neurotóxico mas também um local para a acumulação de agregados de péptidos denominados placas senis [8,11,14,23].

A microglia é um conjunto de células do Sistema Nervoso Central (SNC) responsáveis pela imunidade inata, sendo por isso a primeira linha de defesa contra vários agentes patogénicos. Representam 5-20% da população total de células da glia. As células da microglia estão presentes no cérebro, medula espinhal, retina e nervo ótico. De acordo com o descrito na bibliografia, as suas funções podem ser divididas em seis categorias: Proliferação, Transformação Morfológica, Motilidade e Migração, Comunicação Intracelular, Fagocitose e Proteostase. De acordo com as funções definidas verifica-se que a microglia não só se encontra ativa quando existem agressores externos, mas também está envolvida em vários processos celulares de monitorização do parênquima cerebral [20,33].

1.3.1.1. Proliferação da Microglia e Senescência

À medida que a idade avança, as células envelhecem e perdem as suas funções. Estas células são denominadas senescentes e são normalmente removidas via fagocitose. No entanto, em condições patológicas esta função pode estar comprometida, o que resulta numa acumulação de células senescentes. Como mecanismo compensatório, há um aumento da capacidade proliferativa da microglia resultando numa população heterogénea com baixa capacidade de resposta imune aos diversos estímulos provocados como acontece na DA [14,33].

1.3.1.2. Morfologia e Motilidade

As alterações na morfologia da microglia são induzidas pelo grau de ativação da célula e definem a resposta desta. Na microglia envelhecida verifica-se uma diminuição de resposta ao ATP, não permitindo a alteração de conformação da microglia, resultando em células distróficas que apresentam alterações de motilidade, migração e espessamento. Estas alterações vão afetar gravemente a resposta imunitária porque a mobilidade das células vai estar reduzida, aumentando o tempo de resposta e, conseqüentemente, prolongando as lesões induzidas por agentes patogénicos [14,33].

Em cérebros humanos que possuem quantidades elevadas de A β verifica-se um grau de distrofia da microglia significativamente maior do que os que não possuem [14,33].

1.3.1.3. Comunicação intercelular

A microglia apresenta várias moléculas tanto superficiais como intracelulares responsáveis pela comunicação intercelular. Estas moléculas têm diferentes níveis de expressão consoante o grau de ativação da célula. Como indicadores deste grau de ativação (possivelmente os mais relevantes) podemos apontar fatores pro e anti-inflamatórios como as citocinas [33].

1.3.1.4. Fagocitose

Uma das funções da microglia é a fagocitose. Associada a esta função, as células da microglia apresentam múltiplos recetores capazes de reconhecer patógenos e produtos do metabolismo celular que têm de ser removidos. Um desses agentes patogénicos que a microglia consegue reconhecer e captar é a forma solúvel de A β , ou seja, a forma oligomérica desta proteína. A microglia apresenta diversos recetores que se ligam à A β beta, nomeadamente, recetores reconhecedores de padrões (PRR), recetores de ligação de nucleótidos, recetores *scavenger* (SR) e os recetores *toll-like* (TLR), TLR2 e TLR4, entre outros. Após a captura por macropinocitose, as formas solúveis de A β são degradadas por diversas enzimas como a enzima de degradação da insulina, neprililina e matriz metalopeptidase 9 (MMP9) [14,20,33].

Na DA, existem dois fatores que influenciam a capacidade fagocitária da microglia, a idade e a fase da doença. Por um lado, à medida que a idade avança, a capacidade de resposta diminui, tornando este mecanismo ineficaz. Por outro lado, verifica-se que na fase inicial da doença a microglia tem capacidade de remoção de A β . No entanto, em fases tardias da doença verifica-se que as células são capazes de internalizar a proteína mas não de a digerir. Aliando isto à incapacidade fagocitária derivada da doença, há um aumento da concentração de A β que vai permitir a sua aglomeração e formação de placas amilóides [14,29,33].

Ainda relativo à DA, a diminuição da capacidade de remoção da A β pode ser resultado tanto do enfraquecimento dos mecanismos de deteção de alvos o que se traduz num atraso na migração para o local da lesão, como da supressão da capacidade fagocitária induzida pela forma fibrilhar da A β [14,33].

Esta função demonstra o potencial do uso de microglia exógena e “saudável” como possível abordagem terapêutica para a DA [14].

1.3.1.5. Proteostase

A homeostase das proteínas, ou proteostase, é definida como um conjunto de mecanismos de regulação proteica que garantem todo o processo de síntese proteica bem como a degradação das mesmas, evitando a sua acumulação.

Esta é uma das funções da microglia que, no caso da DA, se encontra alterada, permitindo a acumulação de várias proteínas, como o A β [33].

1.3.2. Modelo Inflamatório

Num modelo testado por Krstic e Knuesel (8), verificou-se que, no envelhecimento saudável há deposição de proteínas com origem intracelular no meio extracelular do parênquima cerebral. Estas resultam de um mecanismo de extrusão compensatório devido ao declínio da função lisossomal. Os depósitos de proteínas apresentam-se sob a forma de varicosidades com morfologia “*budding-like*” que também podem conter organelos celulares. No meio extracelular estas estruturas são removidas pela microglia e astrócitos (Ilustração 7a). Este fenómeno pode, portanto, refletir uma estratégia neuroprotetora de neurónios pós-mitóticos, para ultrapassar a acumulação de proteínas “*misfolded*”, danificadas ou anormalmente clivadas, relacionada com a idade. Um aumento de citocinas acelera a formação destes “*buddings*” e induz a acumulação de mitocôndrias e outros organelos dentro das varicosidades, aumentando a necessidade da sua remoção por parte da microglia [8].

Durante o envelhecimento, fenômenos como inflamação crônica e stress celular, provocados por infecções, outras patologias inflamatórias ou alterações relacionadas com a idade, que desestabilizam o microtúbulo, resultando na perturbação/diminuição do transporte axonal. Estas alterações induzem declínio ou falha total do

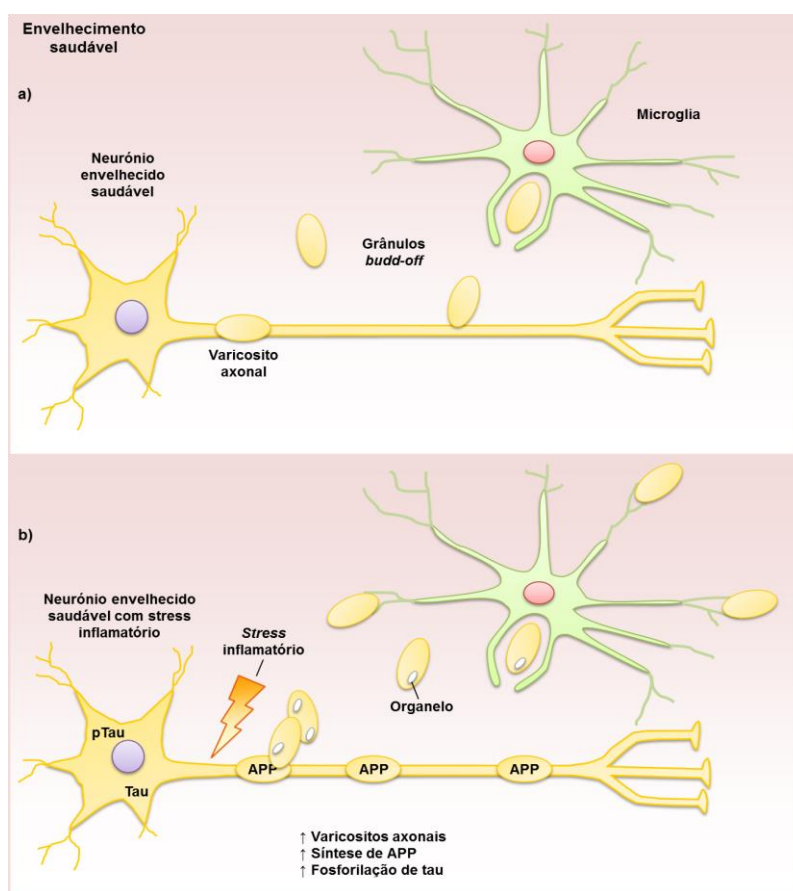


Ilustração 7 - Envelhecimento saudável [8].

mecanismo de extrusão de proteínas induzindo, assim, nódulos axonais localizados e acumulação de organelos, principalmente mitocôndrias (Ilustração 8a). A desestabilização do metabolismo energético no axónio pode induzir hiperfosforilação adicional, conduzindo à formação de filamentos helicoidais emparelhados (PHF). Toda esta cascata de eventos provoca um maior declínio da função axonal, seguido de bloqueio total do transporte axonal resultando, finalmente, perda sináptica, originando diminuição da performance cognitiva (Ilustração 8b). Num estado de inflamação crónica verifica-se indução de APP seguido da sua acumulação nos locais dos nódulos (Ilustração 7b e Ilustração 8a, b, c) [8].

Por outro lado, numa situação de envelhecimento patológico associado a inflamação sistêmica, verifica-se ativação ou *priming* das células da microglia e astrogliose² derivado da inflamação crônica ou de *stress* oxidativo repetido (Ilustração 8a). O recrutamento de microglia para a periferia de axónios degenerativos com varicosos axonais resulta na sobreativação da microglia que representam “*hot-spots*” inflamatórios locais que têm um efeito nocivo também nos neurónios das imediações. Evidência disto é a acumulação individual de APP que envolve vários grupos adjacentes de neuritos, que estão rodeados de células da microglia ativadas. Finalmente, estas acumulações de APP podem levar à agregação de outros péptidos (Ilustração 8c) [8].

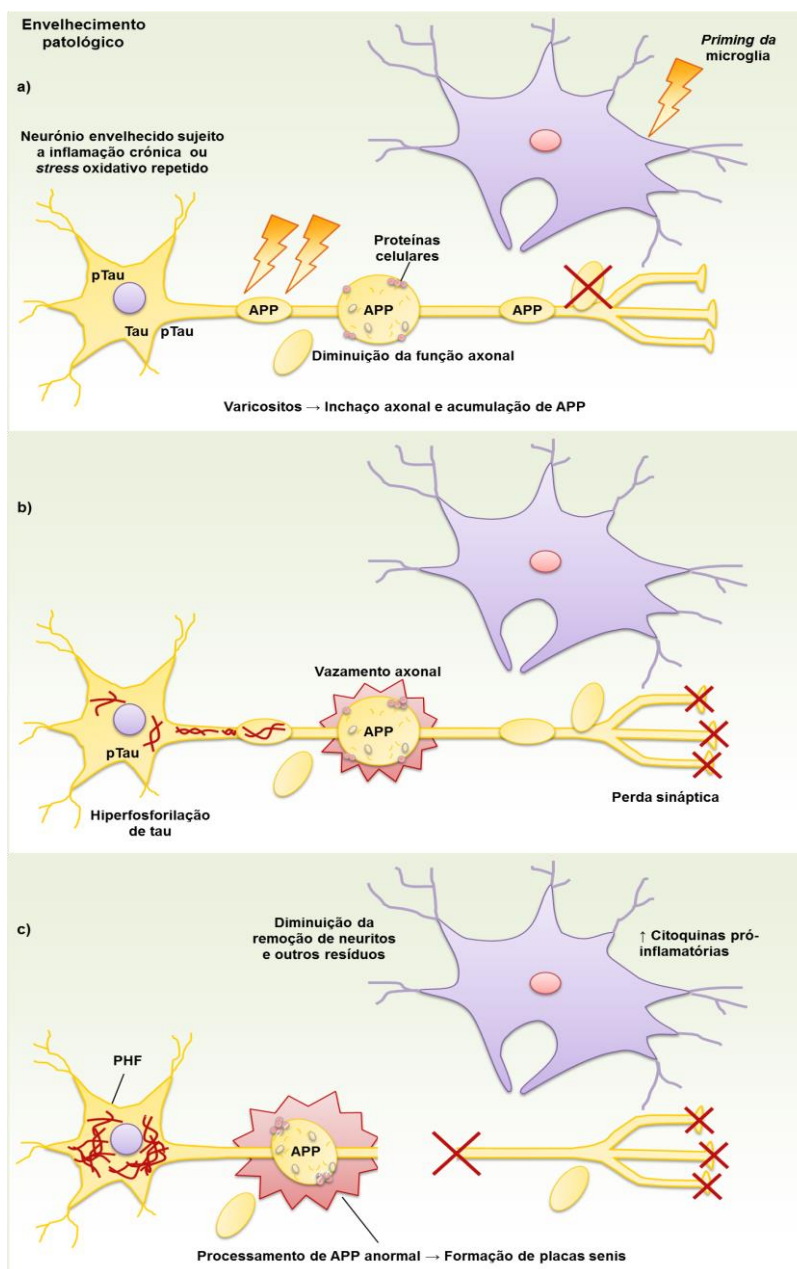


Ilustração 8 - Envelhecimento patológico [8].

Com base na recente observação de cérebros com Alzheimer, é proposto por Krstic e Knuesel (8) que a perda axonal e de componentes intracelulares, principalmente de vesículas autofagolisossomais densas, ou seja, vesículas que

² Astrócitos reactivos.

possuem proteínas no seu interior. A perda de componentes intracelulares é corroborada pela presença de enzimas intracelulares de clivagem de APP [8].

Em suma, um ambiente pro-inflamatório com concomitante perda de axónios pode levar à formação de NFT e morte celular neuronal. A perda de ligações sinápticas combinado com *stress* celular induzido pela inflamação, provavelmente contribui para o início da fisiopatologia em zonas interconectadas do cérebro e para o alastramento da doença pelas redes cerebrais [8,20].

1.4. Stress oxidativo

O *stress* oxidativo resulta da inevitável necessidade de reduzir o oxigénio molecular a água durante a síntese de adenosina trifosfato (ATP), indispensável à vida, durante a respiração celular e metabolismo energético. No entanto, deste processo também resultam radicais livres, nocivos para o organismo. O cérebro humano é particularmente vulnerável ao *stress* oxidativo, o que requer defesas antioxidantes complexas de modo a manter o balanço oxidativo. No entanto, com o avançar da idade há uma diminuição gradual das defesas antioxidantes que pode resultar em doença, tal como acontece na DA [30,35].

As mitocôndrias são as principais fontes de *stress* oxidativo. Os radicais livres produzidos durante o *stress* oxidativo pela fuga de eletrões durante a transferência dos mesmos na cadeia transportadora de eletrões têm sido considerados como patologicamente relevantes na DA. Recentemente verificou-se que não só o *stress* oxidativo está envolvido na etiologia da doença, mas também tem um papel importante na sinalização de mecanismos de morte celular [10,34,36].

A DA possui um longo período de latência no qual não é possível identificar sinais ou sintomas da doença. Na fase pré-clínica sintomática verifica-se desequilíbrio oxidativo, com aumento da peroxidação proteica e diminuição de enzimas antioxidantes. Estes factos sugerem que o desequilíbrio oxidativo surge numa fase precoce da doença e que poderá ter um papel central na patogenia da DA [3,36,37].

A correlação que se verifica entre os danos específicos dos tecidos e as alterações sistémicas, juntamente com a identificação dos marcadores de disfunção cerebral permite a quantificação dos mesmos nas fluídos corporais, principalmente no LCR, plasma e urina. Estes biomarcadores vão permitir um diagnóstico mais preciso e uma melhor previsão da progressão da doença [37].

1.4.1. Radicais Livres

Como consequência do *stress* oxidativo, o desequilíbrio redox observado tanto pode ser resultado de um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) ou comprometimento do sistema antioxidante. As ROS são altamente reativas, instáveis e têm uma semi-vida muito curta, tornando difícil a sua quantificação direta. As reações que originam os diversos marcadores de oxidação são a peroxidação lipídica, oxidação proteica e oxidação de DNA/RNA. Desta forma, são usadas como

marcadores, biomoléculas oxidadas, muito mais estáveis, geradas pelas ROS, como o radical hidroxilo e superóxido. Estes marcadores são produtos de oxidação que incluem proteínas oxidadas, peróxidos lipídicos, produtos finais de glicosilação avançados (AGE) e ductos de ADN. A importância destes biomarcadores está na necessidade de facilitar o diagnóstico precoce da doença, monitorizar a sua progressão e avaliar a resposta a tratamento quando existir medicação que atue na fisiopatologia da doença [15,30,36,37].

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual os lípidos são atacados pelas ROS através de um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres que, no caso da DA, se encontra muito aumentada, sendo a principal causa da perda de fosfolípidos da membrana. Como produtos desta reação são formados aldeídos reativos como o 4-hidroxinonal e malondialdeído (MDA) e isoprostanóides química e metabolicamente estáveis. Na DA verificam-se elevados níveis de 4-hidroxinonal no hipocampo, córtex entorrinal, córtex temporal, amígdala, giro parahipocampal, fluído ventricular e plasma. Este é um composto extremamente tóxico para as células do hipocampo porque provoca morte neuronal por alteração das ATPases envolvidas nas trocas iónicas e na homeostase do cálcio. Por sua vez, o aumento da concentração de cálcio provoca uma cascata de acontecimentos intracelulares que resultam no aumento das ROS e morte celular. No que diz respeito à oxidação proteica, esta decorre do ataque direto das ROS ou da reação com produtos de glicação, glicoxidação a oxidação lipídica. Os principais marcadores de oxidação proteica são os carbonilos proteicos e a 3-nitrotirosina. Estes encontram-se elevados na DA em diversas regiões do cérebro e LCR. Adicionalmente, a oxidação proteica e lipídica também provocam perda de funções enzimáticas críticas, incluindo as que regulam o transporte de glutamato, o que resulta em excitotoxicidade, por glutamato excessivo extracelular, e perda das ATPases responsáveis pelo transporte de iões, com rutura da homeostase do ião cálcio e disfunção mitocondrial. A oxidação de DNA/RNA também se verifica na DA. As ROS lesam o DNA através da separação da cadeia dupla, modificações de bases e ligações a proteínas. Estas alterações verificam-se tanto no hipocampo como no córtex cerebral. Por fim, na DA observam-se baixos níveis de antioxidantes, como a albumina, bilirrubina, ácido úrico, licopenos, vitamina A, vitamina C e vitamina E, ou da atividade enzimática antioxidante, das quais fazem parte o superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e heme-oxigenase. Além dos marcadores resultantes das reações de oxidação, a quantificação pode ainda ser feita medindo os níveis de antioxidantes ou a atividade enzimática antioxidante [15,23,30,34,36,38].

1.4.2. Disfunção Mitocondrial

As mitocôndrias estão presentes em todas as células eucarióticas e são responsáveis pela produção de energia necessária para os processos metabólicos, em condições aeróbias. Nos neurónios, as mitocôndrias têm uma importância especial devido às elevadas taxas metabólicas, morfologia complexa e ao seu papel como produtoras de ATP, que é a principal fonte de energia celular para a libertação e reciclagem de neurotransmissores [10,36].

A disfunção mitocondrial é observada como uma característica de muitas doenças neurodegenerativas, mesmo antes do aparecimento de outros sinais e sintomas específicos. Os defeitos nas mitocôndrias lesam a célula através de dois mecanismos: aumento da produção e libertação de ROS que, por sua vez, provocam lesões e, eventualmente, morte celular; e depleção de energia devido à interrupção da fosforilação oxidativa [10,36].

Uma das substâncias capazes de provocar disfunção mitocondrial é o péptido A β que induz a produção de ligações oxidativas e possui na sua sequência uma metionina na posição 35 que tem um papel importante na promoção da atividade oxidativa. Quando este aminoácido é substituído por outro verifica-se diminuição da capacidade oxidativa da A β . Por outro lado, os oligómeros de A β têm a capacidade de se inserir na bicamada lipídica provocando peroxidação dos lípidos com consequente lesão oxidativa de proteínas e outras biomoléculas. Como consequência das alterações da membrana, há um influxo de iões Ca²⁺, alterando a sua homeostase, provocando entrada de água que lesa a célula e organelos provocando disfunção mitocondrial, perda sináptica e, finalmente, morte neuronal. A acumulação de A β vai ter um impacto na função mitocondrial como descrito abaixo [10].

1.4.2.1. Disfunção da cadeia transportadora de eletrões induzida por A β

A cadeia transportadora de eletrões é um sistema enzimático complexo constituído por cinco fases distintas: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (sucinato desidrogenase), complexo III (ubiquinol-citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintetase). Defeitos na cadeia transportadora de eletrões são considerados um dos principais fatores que levam à produção de radicais livres. Estes defeitos podem ser provocados pela A β através da diminuição das enzimas da cadeia. A A β é capaz de diminuir a atividade do complexo IV através

da ligação direta à subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase, ou de provocar disfunção deste complexo, induzindo a geração de ROS. O A β também provoca lesões no complexo I na mitocôndria em condições normais que resultam num aumento da produção de ROS [10,23,34,36].

As alterações energéticas provocadas pela disfunção da cadeia transportadora de eletrões podem provocar perda sináptica de duas maneiras. Por um lado, a neurotransmissão pode ser interrompida devido ao défice de ATP. Por outro lado, devido à falta de ATP, as enzimas que necessitam desta molécula tornam-se disfuncionais levando ao colapso da homeostase do Na⁺ e Ca²⁺ celular, necessários para a manutenção do potencial de membrana [10,36].

1.4.2.2. Abertura do poro mitocondrial de permeabilidade transitória (MPTP)

As ROS induzidos pelo A β estimulam a abertura de poros mitocondriais de permeabilidade transitória (MPTP). Estes poros são complexos proteicos que formam um canal não-seletivo entre as duas membranas (interior e exterior) da mitocôndria. Em condições normais, o MPTP possui baixa permeabilidade, no entanto, em algumas condições patológicas a sua permeabilidade aumenta incrementando a carga intracelular de cálcio e o *stress* oxidativo [10,15].

A sobre-expressão de APP, e o consequente aumento de proteína amilóide, pode levar à abertura de MPTP, desregulando a fosforilação oxidativa e a produção de ATP, fatores que conduzem à perda sináptica e eventual morte celular [10].

1.4.2.3. Alterações na dinâmica mitocondrial

Existem evidências de que o A β possa provocar alterações de tamanho e dinâmica da mitocôndria, e de que o *stress* oxidativo influencie estas anormalidades. Em ratos transgênicos analisados por microscopia eletrónica, verificou-se que as mitocôndrias eram significativamente menores quando comparadas com os controlos. Na análise *postmortem* de tecidos do hipocampo, verificou-se redução das proteínas envolvidas na regulação do tamanho e reciclagem da mitocôndria, como a proteína dinamina 1 (Drp1), e das proteínas de fusão, como a proteína de atrofia ótica 1 (OPA1), mitofusina 1 (Mfn1), e mitofusina 2 (Mfn2), e aumento da proteína de fissão 1 (Fis1). Estes resultados sugerem que condições de fissão aumentadas levam à diminuição do tamanho das mitocôndrias afetando, subsequentemente, o metabolismo energético celular [10].

O A β também influencia assim a dinâmica mitocondrial que regula o transporte axonal [10].

1.4.2.4. Creatinina-quinase (CK) mitocondrial

A creatinina-quinase é uma enzima que fosforila a creatinina através da transferência de um fosfato do ATP. A função da CK pode estar alterada na DA resultando em défices na manutenção dos níveis energéticos e alteração do fornecimento de energia da glia, neurónios e sinapses [10].

Os pontos discutidos acima são disfunções mitocondriais importantes na patologia da DA que podem ser explorados como possíveis alvos terapêuticos, nomeadamente, a nível da cadeia transportadora de eletrões. O controlo da disfunção da mesma permitiria diminuição da produção de ROS.

Também a proteína tau, mediante *stress* oxidativo, induz disfunção mitocondrial com geração de ROS e RNS, o que contribui para a perda da integridade das membranas biológicas e falência sináptica [10].

Na Ilustração 9 estão representadas as diversas lesões provocadas na

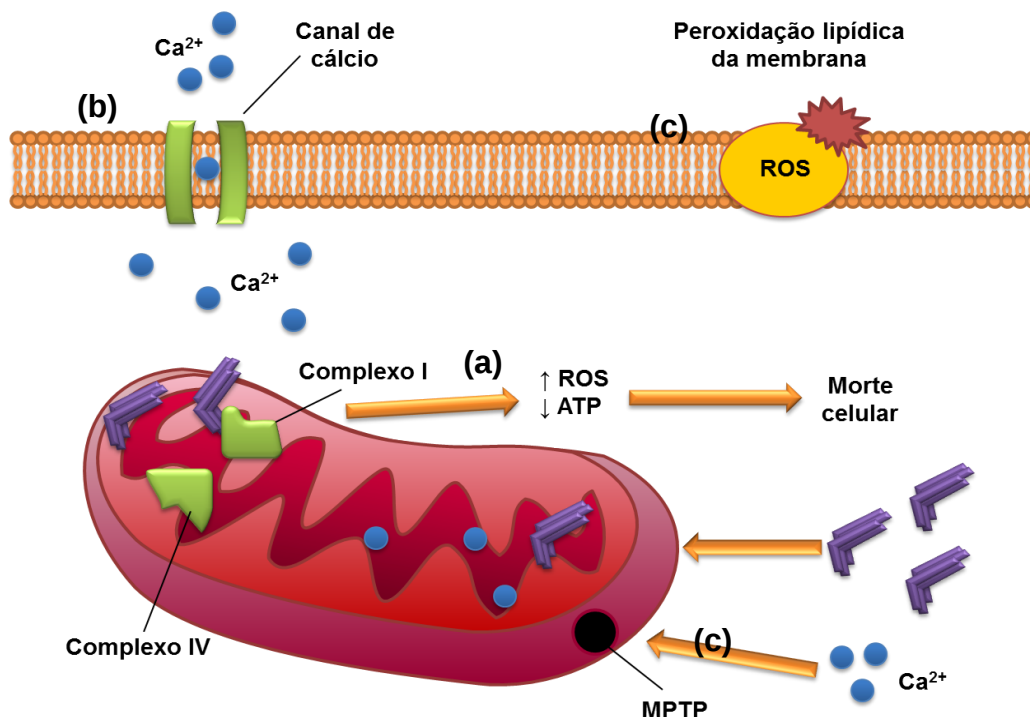


Ilustração 9 - Lesão mitocondrial na Doença de Alzheimer: (a) A sobreprodução de proteína A β provoca disfunção dos complexos I e IV, resultando na sobreprodução de ROS e depleção de ATP; (b) A diminuição de ATP também causa disfunções nos canais iónicos dependentes de ATP, provocando desequilíbrio de iões no citosol; (c) O aumento de ROS provoca abertura de um MPTP, resultando num maior influxo de cálcio na matriz mitocondrial, interrompendo a cadeia de transporte de eletrões e a fosforilação oxidativa; (d) A peroxidação lipídica desencadeia os mecanismos de morte celular, nomeadamente apoptose [10].

mitocôndria durante a DA que resumem o descrito acima.

1.4.3. Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (ApoE) é a proteína de transporte de colesterol no SNC o que explica o seu papel na plasticidade neuronal. Assim, esta proteína tem uma função fundamental na manutenção da integridade estrutural e funcional das sinapses e membranas [10,15,34].

A ApoE possui três isoformas: ApoE2 (Cys¹¹², Cys¹⁵⁸), ApoE3 (Cys¹¹², Arg¹⁵⁸) e ApoE4 (Arg¹¹², Arg¹⁵⁸). O alelo ApoE4 constitui um fator de risco de maneira dose-dependente para a DA, enquanto o alelo ApoE3 confere uma função protetora. Vários estudos demonstraram que a interação entre a ApoE4 e formas solúveis de A β favorece a formação de fibrilhas. Verifica-se também que a forma ApoE4 liga-se a formas agregadas intermédias de A β de maneira mais eficaz do que ApoE2. Por outro lado, parece aumentar a reciclagem intracelular de APP, o que resulta num aumento da produção de A β [10,34,39].

II. Estratégia Terapêutica

De acordo com os vários mecanismos fisiopatológicos descritos nos capítulos anteriores, existem várias abordagens terapêuticas que podem ser consideradas. O tratamento medicamentoso atual da DA com inibidores da colinesterase ou antagonistas do recetor NMDA tem demonstrado uma eficácia sintomática muito modesta, deixando a necessidade para novas e mais eficazes terapias [2].

2.1. Terapêutica com Base na Hipótese Amilóide

Sendo a produção anormal e acumulação de A β no parênquima cerebral a hipótese etiológica central da DA, a primeira linha de estratégia será a inibição ou diminuição dos processos de geração de A β de modo a prevenir ou estabilizar a doença [25,28].

2.1.1. Inibição da β e γ -secretase e ativação da α -secretase

De acordo com esta hipótese, uma das alternativas possíveis será bloquear a maquinaria proteolítica pela qual os péptidos de A β são produzidos de modo a reduzir esta proteína. Existem duas abordagens a considerar: redução da formação de APP ou inibição da proteólise de APP que resulta na formação de A β . A abordagem mais promissora é a inibição das vias β e γ -secretase (via da clivagem proteolítica amiloidogénica da APP) ou estimulação da via α -secretase. No que diz respeito à α -secretase, foram identificados poucos ativadores eficazes até ao momento. Para a via da β -secretase já foram identificados e testados vários inibidores e recentemente foi descoberto um bastante promissor, MK-8931 (Merck), cujos resultados dos testes de fase I foram publicados em 2012. Este inibidor está agora em testes de fase II e III [15,23,28].

Em relação à γ -secretase, embora esta enzima tenha um papel crucial na geração de A β , a modulação da sua atividade pode provocar vários efeitos adversos porque esta intervém na clivagem de muitos outros substratos fisiologicamente importantes. Assim sendo, modular a atividade da γ -secretase torna-se bastante complicado pois é necessário restringir o substrato apenas à APP, para reduzir a A β , não afetando outros substratos [15,23,25,28].

2.1.2. Inibição da agregação ou acumulação

A toxicidade da A β está associada à sua estrutura oligomérica que surge após agregação dos monómeros A β . Portanto, a inibição da agregação pode ser considerada uma estratégia para inibir a sua toxicidade.

Uma das alternativas poderá ser a redução da formação de placas amilóides através da ligação preferencial a monómeros de A β , provocando a desagregação das fibrilhas e oligómeros como mecanismo compensatório [15,28].

Como alternativa pode proceder-se à inibição indireta da agregação de A β através da atuação sobre metais como o cobre e o zinco, mediadores da agregação. Neste processo utiliza-se um ionóforo cobre/zinco, PBT2, que tem como alvos os iões de cobre e zinco, o que vai impedir a formação de novos agregados, facilitando a remoção dos mesmos no córtex o que poderia atenuar a perda cognitiva em doentes com DA. Este composto está em testes clínicos de fase II [15,28].

2.1.3. Imunoterapia com alvo A β

A imunoterapia surge desde 2003 como nova alternativa bastante atrativa. Já foram estudadas várias estratégias de imunização ativa usando A β 42 sintético, de modo a induzir resposta imune com geração de anticorpos, bem como imunização passiva com anticorpos monoclonais para diferentes regiões da A β 42 [28,40,41].

No entanto ambas as abordagens apresentam vantagens e desvantagens. Considerando a imunização ativa, esta apresenta a enorme vantagem de fornecer uma resposta de longa duração, reduzindo o número de administrações e os custos associados. Por outro lado, a resposta policlonal originada possui diversos anticorpos com diferentes especificidades podendo resultar em reações adversas, às quais o grupo de tratamento, envelhecido, é mais suscetível. No caso da imunização passiva, é possível usar anticorpos policlonais de origem humana ou anticorpos monoclonais humanizados e permite selecionar os anticorpos de interesse consoante o alvo terapêutico. Os anticorpos gerados podem promover a desmontagem direta dos depósitos de A β no parênquima cerebral, a ativação da microglia ou ainda anular a toxicidade da A β pelo bloqueio dos monómeros, impedindo assim a formação de agregados no SNC. A desvantagem deste tipo de imunização prende-se na necessidade de administração de doses múltiplas frequentes [28,40].

Os resultados dos modelos testados mostraram que este tratamento reduz os níveis de amiloide no cérebro e de placas senis. Em modelos com ratos transgênicos, a imunoterapia melhorou a memória e performance comportamental [16,31].

Os primeiros testes em humanos foram feitos usando injeções com péptido A β 42 de modo a induzir resposta imune. No primeiro ensaio de imunização, o AN1792, complicações como a encefalite e o edema vasogénico fizeram com que o estudo fosse descontinuado. No entanto, estudos *postmortem* de alguns indivíduos participantes revelaram remoção das placas amilóides do parênquima cerebral. Tendo em conta os efeitos adversos originados pela resposta imune das células T, os testes de imunização ativa concentram-se agora no epitopo da célula B para A β ou na produção de anticorpos capazes de evitar a resposta anti-inflamatória desencadeada pelas células T. Vários compostos já se encontram em testes de fase II. Num desses compostos, a vacina CAD106, é usado um péptido com afinidade para o epitopo A β das células B. Até à data não foram descritos efeitos secundários auto-imunes [16,40,41,42].

Na abordagem passiva com anticorpos anti-A β , estes são injetados com o objetivo de ajudar a reduzir a carga de A β no cérebro através de vários mecanismos, nomeadamente a facilitação da fagocitose do amilóide pela microglia, a inibição da agregação amilóide ou a ligação dos anticorpos a amilóides presentes no sangue provocando um efluxo de A β do cérebro para a corrente sanguínea. O aumento dos níveis de A β que se verificam no LCR pode ser indicador de que estes anticorpos, que se ligam preferencialmente a formas solúveis de A β , conseguem mobilizar A β dos depósitos amilóides que se encontram no cérebro [16,43].

Os anticorpos desenvolvidos até ao momento são não seletivos, o que significa que se ligam às diversas espécies de amilóide, nomeadamente às formas oligoméricas, fibrilhares e aos monómeros. Estes anticorpos podem ser vantajosos no tratamento da patologia em fase prodrómica pois proporciona redução do número total de amilóide para uma concentração não tóxica [44].

A Tabela 1 resume as diferentes afinidades de ligação dos anticorpos monoclonais usados até agora, consoante a espécie amilóide. Deles, o Solanezumab e o Bapineuzumab, este último já descontinuado, foram os mais desenvolvidos, ambos atingindo estudos de fase III. O Solanezumab é o único que não apresenta afinidade para as placas amilóides, ou forma fibrilhar, podendo ser usado na fase prodrómica evitando o desenvolvimento da doença. No entanto, nos resultados de dois estudos de fase III, revelou-se ineficaz clinicamente. O anticorpo Bapineuzumab revelou ser ineficaz na melhoria da função cognitiva, o que pode ser explicado pela baixa concentração utilizada. O Bapineuzumab liga-se com a mesma afinidade tanto à forma oligomérica como à fibrilhar mas a concentração da forma não solúvel é muito superior, o que faz com que o anticorpo não consiga sequestrar eficazmente a forma

solúvel. Foi descontinuado por falta de eficácia nos testes cognitivos. O Crenezumab foi desenvolvido de modo a reduzir a ativação da microglia e minimizar os efeitos adversos cognitivos do edema e das microhemorragias, que se verificavam nos outros compostos acima referidos. Este anticorpo não possui seletividade para nenhuma das formas amilóides, ligando-se a todas de igual modo. Por outro lado, esta característica faz com que evite a agregação de A β e promova a desagregação de espécies pré-agregadas. Os estudos em modelos animais, usando ratos transgênicos, efetuados até à data, demonstraram que o BAN2401/mAb158 possui seletividade para as espécies tóxicas de A β sendo o que apresenta melhores resultados em termos de afinidade de ligação. O Gantenerumab revelou provocar redistribuição de A β de pequenas placas amilóides para as de maiores dimensões. Nos indivíduos sujeitos a este tratamento foram observados edema vasogénico e microhemorragia [40,41,43,44,45,46,47].

Tabela 1 - Comparação das afinidades de ligação das diferentes imunoterapias em desenvolvimento e da fase em que são administradas à população alvo [40,44].

Anticorpo A β	Afinidade para Ligação			Fase da DA da população alvo
	Monómero A β	A β oligomérica	Placa A β	
Solanezumab/266	+++	++	-	Prodrómica e ligeira
Bapineuzumab/3D6	++	+++	+++	Ligeira/moderada
Crenezumab	++	+++	++	Prodrómica e ligeira/moderada
Ponezumab/D-2H6	++	++	+++	Ligeira/moderada
BiiB037/NI-101.11	+	+++	+++	MCI ou ligeira
BAN2401/mAb158	-	+++	+++	MCI
Gantenerumab	+	++	+++	Prodrómica e ligeira
SAR228810/13C3	-	+++	+++	Ligeira/moderada

+ baixa afinidade, ++ afinidade moderada, +++ elevada afinidade, - afinidade baixa ou nula

Os maus resultados que a terapia imunológica amilóide apresentou até à data em testes clínicos não implicam que esta não seja uma terapia adequada para a doença. Possivelmente os doentes devem ser selecionados de forma estrita e a sua administração deve ser feita em fases mais precoces da doença [40,47,48].

Uma outra alternativa que começa a ser estudada é a imunoterapia com alvo nas protofibrilhas, com inibição da formação de placas senis. Esta terapia apenas possui eficácia quando administrada antes da formação das placas [40].

2.2. Terapêutica com Base na Patologia de Tau

Enquanto nas duas últimas décadas, a pesquisa se tem focado na hipótese da cascata amilóide, até agora com resultados desapontantes, neste momento há uma nova estratégia: procura de terapias baseadas na proteína tau, visto a DA constituir uma taupatia [2].

As abordagens terapêuticas em estudo são apresentadas abaixo.

2.2.1. Modulação da fosforilação de tau

Embora ainda seja debatido se a hiperfosforilação de tau favorece a agregação proteica ou se é uma consequência da mesma, verifica-se uma forte correlação entre a fosforilação e as patologias associadas à proteína tau, tornando a pesquisa de inibidores das quinases responsáveis pela fosforilação de tau uma aposta terapêutica favorável. Não existe apenas uma mas sim múltiplas quinases envolvidas na hiperfosforilação da tau *in vivo*, gerando a questão se o alvo deve ser uma só quinase ou um grupo, de modo a reduzir eficazmente a hiperfosforilação de tau. Algumas das envolvidas são a quinase glicogénio sintase isoforma β (GSK-3 β), quinase-5 ciclina-dependente (CDK5) e a quinase reguladora da afinidade do microtúbulo (MARK), entre outras. Apesar das dificuldades desta abordagem no que refere a toxicidade e especificidade, têm sido desenvolvidos vários inibidores [2,25,28,31].

A DA foi um dos primeiros distúrbios ligado à disfunção da GSK-3 e, por conseguinte, a descoberta de inibidores desta quinase tem atraído muita atenção na intervenção terapêutica. Por muitos anos, o lítio, um conhecido estabilizador de humor, tem sido considerado um inibidor GSK-3 sendo parte da sua ação terapêutica na doença bipolar atribuída à inibição de GSK-3. Na DA, o tratamento com lítio demonstrou uma significativa diminuição das concentrações de tau no líquido cefalorraquidiano (LCR) com melhoria da performance das tarefas cognitivas. No entanto, o lítio é altamente tóxico na dose convencional, principalmente para a população idosa, o que limita fortemente a sua utilização no tratamento da mesma. Dado este problema, um estudo recente testou a hipótese de utilização de uma

microdose (300µg por dia) como tratamento da DA, o que poderia ser suficiente para estabilizar a deteriorização cognitiva. Outro possível inibidor do GSK-3 é o valproato, um conhecido medicamento para a epilepsia e estabilizador de humor. De momento, a hipótese de este composto melhorar os sintomas ou atrasar a progressão da DA está a ser testada [2,28,30,49,50].

O tideglusib, outro inibidor GSK-3, foi recentemente testado num estudo clínico randomizado de fase II aleatório e com dose crescente (400, 600, 800, 1,000 mg), em 30 doentes com DA, durante 20 semanas. Embora o objetivo principal fosse avaliar a segurança e tolerabilidade, foram também estudados alguns indicadores de eficácia como objetivo secundário. A administração oral de tideglusib foi bem tolerada e mostrou efeitos positivos encorajadores. No entanto a amostra não teve significado estatístico. Embora em estudos posteriores, já com validade estatística, este medicamento tenha falhado, um sub-estudo imagiológico de ressonância magnética mostrou um atraso significativo na taxa de atrofia do cérebro em doentes tratados com tideglusib [2,28,51].

Como alternativa à inibição da quinase pode recorrer-se à ativação das fosfatases de modo a reduzir a fosforilação de tau. A proteína fosfatase 2A (PP2A) é considerada a principal fosfatase responsável pela fosforilação de tau no cérebro, o que a torna o alvo favorito nesta abordagem terapêutica. O tratamento oral de ratos transgénicos com o selenato de sódio, ativador de PP2A, mostrou reduzir a hiperfosforilação de tau, anular a formação de NFT, melhorar a memória contextual e a performance motora e prevenir a neurodegenerescência. No entanto a ativação de PP2A tem os seus desafios devidos ao facto de esta possuir pouca especificidade e um elevado número de subunidades regulatórias, o que torna difícil definir o alvo correto. A ativação desta enzima é regulada por várias modificações pós-translacionais, incluindo fosforilação e metilação, e também por duas proteínas inibitórias não competitivas, I1PP2A (inibidor da proteína fosfatase 2A) e I2PP2A [2,25,28].

Recentemente surgiu uma nova alternativa terapêutica baseada na descoberta da clivagem de I2PP2A [2].

2.2.2. Estabilização do microtúbulo

Com base no mecanismo fisiopatológico em que a proteína tau se separa dos microtúbulos com perda da estabilização dos mesmos, e consequente diminuição do transporte axonal e perda sináptica, têm sido apresentadas novas terapêuticas.

De entre os vários agentes que apresentam ação anti-mitótica, o mais avançado é o davunetide (NAP), um péptido com oito aminoácidos derivado da proteína neuroprotetora atividade-dependente (ADNP), que tem mostrado diminuir a fosforilação de tau e os níveis de A β , em modelos animais. Embora o seu mecanismo ainda não seja totalmente conhecido, o davunetide aparenta contrariar os efeitos da tau patológica nos microtúbulos, porque mantém e estabiliza os mesmos [2].

2.2.3. Inibição da agregação de tau

Outro mecanismo com potencial terapêutico é o processo de agregação da tau, no qual várias espécies de tau se formam, nomeadamente monómeros, oligómeros, prefilamentos, truncados, fibrilhas e agregados insolúveis. Conforme discutido acima, alguns intermediários de tau hiperfosforilados e *misfolded* solúveis, são de facto as espécies neurotóxicas. Desta forma a inibição dos primeiros passos de formação destes intermediários pode ser o alvo da intervenção farmacológica de modo a prevenir a neurodegenerescência [2].

Já foram identificadas *in vitro* várias famílias químicas com potencial para inibir a agregação de tau, nomeadamente N-fenilaminas, rodaminas, feniltiazol-hidrazindas, antraquinonas, aminotienopiridazinas, entre outras. Embora muitos destes compostos sejam eficazes *in vitro*, é difícil avaliar e melhorar propriedades como toxicidade, biodisponibilidade e farmacocinética [2,28].

Um novo fármaco, obtido da redução de um outro fármaco denominado LMTX[™] (leuco-metillioninio), revela ser mais estável, biodisponível e menos tóxico em doses elevadas que o original, e está a ser sujeito a testes clínicos de fase II e III para doentes com DA ligeira-moderada e demência fronto-temporal. Contudo ainda sem resultados clínicos [2].

2.2.4. Redução dos níveis de tau

Há mais de 20 anos que está descrita a presença de níveis de proteína tau intracelular aumentados em cérebro com DA quando comparados com controlos não-dementes da mesma idade. Considerando o conjunto de evidências que incluem alterações comportamentais e motoras, tudo aponta para que a redução dos níveis de tau constitua uma boa aposta terapêutica tanto na DA como noutras taupatias [2].

Outra abordagem possível é a regulação do gene que expressa a proteína tau, principalmente porque o tau-mRNA também aparece aumentado em cérebros com DA. Além destes, muito pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares

exatos que controlam a expressão de tau. No entanto, já estão descritos alguns fatores específicos que afetam este processo, incluindo o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), *dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase* (Dyrk1A), e a família mi-R34 de microRNA [2].

A redução dos níveis de tau pode ser conseguida não só pela redução da sua síntese mas também pelo aumento da sua remoção. À medida que os neurónios envelhecem, a sua sobrevivência depende da eliminação da crescente quantidade de proteínas e organelos danificados e potencialmente tóxicos. No entanto, esta é uma capacidade que se vai deteriorando com o avançar da idade. Nos neurónios existem dois sistemas proteolíticos principais envolvidos no controlo de qualidade de proteínas: o sistema de ubiquitina-proteassoma (UPS) e o sistema autofagia-lisossoma ou endossomal-lisossomal. Pensa-se que estes mecanismos de degradação mantêm os níveis de tau baixos, o que pode prevenir a sua agregação, podendo ser considerados alvos terapêuticos para tratamento e prevenção da DA e, possivelmente, de outras taupatias [2].

2.2.5. Imunoterapia com alvo tau

Considerando os resultados desapontantes as várias abordagens terapêuticas baseadas na hipótese amilóide em fases finais de testes clínicos ao longo dos últimos anos, a investigação voltou a atenção para uma nova terapia baseada em tau [2,25].

A abordagem por imunoterapia pode ser feita por imunização passiva, mediante anticorpos anti-tau capazes de remover moléculas de tau com efeito negativo sobre a viabilidade neuronal, ou por imunização ativa, utilizando fosfopéptidos de tau [2,16].

Foi testada primeiro a imunização ativa de ratos transgênicos P301L usando um fosfopéptido de tau composto por 30 aminoácidos, o que resultou numa resposta específica com redução da taupatia e melhoria do desempenho motor. Considerando este resultado positivo, foi elaborado um novo protocolo baseado na injeção de uma mistura de três fosfo-péptidos de tau (Tau195-213[p202-205]; Tau207-220[p212-214]; e Tau224-238[p231]) em ratos transgênicos com sobre-expressão de proteína tau humana (K257T/P301S) com dupla mutação. Este novo tratamento demonstrou reduzir os níveis de NFT no cérebro e medula espinhal em 40%, na ausência de encefalite, défice neurológico ou lesão axonal [2,16].

No âmbito da imunização ativa surgiram vários modelos animais usando diversos péptidos de tau como agentes imunogénicos. Num desses modelos é usado o mesmo péptido de 30 aminoácidos descrito acima, que expressa as 6 isoformas de tau humana. Estes ratos desenvolveram patologia de tau inicialmente no córtex e hipocampo, com pouca expressão em áreas importantes para a atividade motora. Neste modelo verificou-se que a imunoterapia não só diminuiu a fosforilação de tau mas também o declínio cognitivo nos animais imunizados. Num outro modelo, foi usado um péptido de 12 aminoácidos, incluindo Ser396/Ser404 fosforilado do epitopo de PHF-1, para imunizar ratos transgénicos que expressam a proteína tau P301L mutante. Neste caso, os animais vacinados mostraram uma redução de tau fosforilado e da progressão da patologia associada a NFT [2,25].

A imunização ativa, porém, apresenta efeitos adversos auto-imunes que não se verificam na imunização passiva. Num dos estudos de imunização passiva foram testados os efeitos da administração de anticorpos PHF1, específicos para o epitopo fosfo-Ser396,404, ou MC1, em dois modelos transgénicos diferentes. Os animais imunizados demonstraram uma diminuição significativa da patologia associada a tau e atraso no declínio da função motora. Estes resultados foram corroborados com outros estudos posteriores. Uma outra abordagem de imunização passiva proposta foi o uso de anticorpos “*chaperon*” com alvo em tau “*misfolded*”. Desenvolveu-se um anticorpo monoclonal com uma elevada afinidade para o péptido da tubulina ao qual a proteína tau se liga, anulando a conformação patológica do microtúbulo provocada por tau “*misfolded*” [2,16].

De momento, não existem estudos de imunização passiva em humanos, no entanto, a primeira vacina humana mediante a administração de péptido tau para influenciar a sua oligomerização encontra-se em testes de fase I com o nome de AADvac1. Nos testes em modelos animais, verificou-se produção de anticorpos seletivos para as formas patológicas da tau [41,52].

Normalmente, a tau é uma proteína citosólica, e os NFT formam-se a nível intracelular, portanto, no caso da imunoterapia passiva, quando os anticorpos chegam ao cérebro têm de conseguir penetrar nas células para fazer a remoção eficaz das moléculas de tau, possivelmente através de endocitose mediada por recetor, tal como acontece em culturas neuronais. A imunoterapia de tau já demonstrou reduzir o grau de fosforilação de tau tanto em ratos jovens como idosos, eliminando, desse modo, as espécies solúveis de tau que são tóxicas, o que é comprovado pelo aumento das concentrações de tau no sangue de ratos imunizados [2,16,53].

À medida que aparecem novas imunoterapias, existem questões que se levantam como a natureza exata das espécies tóxicas a considerar como alvo, problemas de segurança associadas a respostas imunes indesejadas, e o mecanismo de ação pelo qual os anticorpos vão provocar a remoção de moléculas de tau [2].

2.3. Terapêutica Antioxidante

Considerando agora o papel das ROS na fisiopatologia da DA, é possível afirmar que uma terapêutica antioxidante e de remoção de radicais livres seria benéfica no tratamento da doença. Esta hipótese é particularmente empolgante porque já são conhecidos muitos antioxidantes, como a vitamina E e C, extrato EGb 761 de *Ginkgo biloba*, melatonina, flavonóides e carotenóides, que não possuem efeitos secundários significativos [34,35].

2.3.1. Antioxidantes

A hipótese de utilização de antioxidantes na terapia da DA foi estudada em condições experimentais e clínicas e verificou-se que muitas das substâncias supracitadas inibem o efeito tóxico de A β e do superóxido de hidrogénio em culturas de células. Diversos estudos preliminares demonstraram que a administração de um agente quelante de ferro, desferroxiamina, durante 2 anos atrasa o desenvolvimento clínico da doença. O objetivo era que o efeito quelante inibisse a peroxidação lipídica induzida pelo ferro, visto esta ter um papel na etiologia da doença [30,34].

Os fármacos antioxidantes testados a nível clínico para a DA com resultados promissores foram a vitamina E (α -tocoferol), selegilina (inibidor da monoamina oxidase B) e o extrato EGb 761 *Ginkgo biloba*. Em relação aos dois primeiros compostos, embora não se tenha verificado melhoria nos testes cognitivos, em casos de DA ligeira a moderada foram observados atrasos na institucionalização, na perda da capacidade para realizar as tarefas básicas diárias, na evolução para demência severa e morte, o qual sugere a utilidade dos antioxidantes para o retardamento do processo patogénico. No entanto, a resposta ao tratamento com vitamina E não é igual em todos os casos, mostrando resultados positivos apenas nos casos em que a vitamina E diminui os níveis de oxidação da glutathione sérica e a peroxidação dos lípidos plasmáticos. Quando a vitamina E não previne o *stress* oxidativo verifica-se que a mesma pode ter um efeito nefasto a nível cognitivo. Por outro lado, estudos clínicos com o extrato EGb 761 revelaram um efeito positivo nos índices cognitivos,

nomeadamente memória, raciocínio e percepção, ao contrário dos outros dois, com efeito protetor dos neurónios acrescido durante o envelhecimento e efeito inibidor da monoamina oxidase (efeito menos pronunciado que o da selegilina) [10,34,54,55].

2.3.2. Outros compostos

Um estudo em modelo animal usando ratos sobre o efeito sinérgico de dois compostos combinou os efeitos benéficos do lítio na DA com a quinona pirroloquinolina, um potente antioxidante capaz de melhorar a função mitocondrial originando a tri-lítio pirroloquinolina quinona (Li₃PQQ), que melhorias da aprendizagem e memória com redução da deposição amilóide e níveis de tau fosforilado. A Li₃PQQ também apresentou ação inibitória da GSK-3 [49].

Também os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) mostraram efeitos benéficos na DA, nomeadamente na redução do risco de desenvolvimento da doença, sendo um dos compostos mais analisados o ibuprofeno. Estes fármacos atuam nas ciclooxygenases inibindo a síntese de prostaglandinas ou diminuindo a excitotoxicidade associada ao glutamato e reduzindo a produção de ROS. No entanto, o uso deste grupo terapêutico gera divergência de opiniões sobre a sua atividade: a altura em que os mesmos devem começar a ser administrados, a dose adequada e o tempo de tratamento. Por último, o estrogénio também apresentou alguns efeitos benéficos na DA devido à sua atividade antioxidante. Alguns estudos mostraram que o 17β-estradiol protege as células do neuroblastoma contra o *stress* oxidativo e suprime a oxidação da membrana dos neurónios do hipocampo, induzida pela Aβ, mas sem suficiente evidência [20,23,34].

2.4. Terapêutica com Células Estaminais

No grupo denominado células estaminais estão incluídas as embrionárias, as polipotentes e as derivadas de tecidos, tal como da medula espinhal. Na terapêutica com células estaminais, estas células são utilizadas para gerar neurónios novos com capacidade de se incluir na rede neuronal existente no cérebro com DA. Este transplante poderia resultar num aumento dos níveis de acetilcolina melhorando, assim a memória e o nível cognitivo. Esta terapêutica encontra-se a ser testada em modelos animais [56].

2.5. Terapêutica Baseada no Neurotransmissor Histamina

Os recetores H_3 constituem um possível alvo terapêutico por possuir um papel na neuromodulação e estar amplamente distribuídos por todo o SNC, incluindo áreas cognitivas, tal como o hipocampo. No tecido cerebral de doentes com DA, estes recetores encontram-se inalterados tornando-os possíveis alvos para modulação farmacológica. Um estudo de fase II para avaliar a eficácia e segurança do fármaco GSK239512, antagonista do recetor H_3 , como tratamento em monoterapia para a DA ligeira a moderada mostrou melhora da memória episódica sem melhorias nos restantes domínios cognitivos. Por outro lado, o fármaco ABT-288, outro antagonista H_3 , demonstrou noutro estudo de fase II eficácia nos vários domínios cognitivos, e segurança na população idosa [57,58].

2.6. Proposta de Esquema Terapêutico

A DA é extremamente complexa em termos fisiopatológicos tornando a terapêutica um verdadeiro desafio. Como agravante, os meios de diagnóstico disponíveis também não fornecem uma ferramenta precisa o que, na maioria dos casos, resulta num tratamento tardio não se verificando melhorias no doente.

A possibilidade de atraso da doença está intimamente relacionada com o diagnóstico precoce, quando ainda não existem danos significativos no tecido neuronal. Como proposta de esquema terapêutico, apenas serão focados dois estádios da doença: a fase prodrómica e a fase de declínio cognitivo ligeiro a moderado.

2.6.1. Fase prodrómica

Nesta fase, ainda não se verifica presença de placas amilóides, nem de novos neurofibrilares que são as duas principais características desta doença. Portanto, é necessário recorrer a outros marcadores para que a mesma possa ser diagnosticada.

Tal como discutido nos capítulos da fisiopatologia, na fase prodrómica existe alteração oxidativa, existindo um aumento da peroxidação proteica e diminuição de enzimas antioxidantes. As biomoléculas resultantes da peroxidação proteica são biomarcadores quantificáveis que podem ser úteis para permitir o diagnóstico, quando

ainda não se verificam alterações cognitivas. Outro biomarcador quantificável nesta fase é o glutamato excessivo proveniente da excitotoxicidade.

Tendo em conta as alterações fisiológicas, o esquema terapêutico deve incluir um antioxidante de modo a reverter ou atrasar as lesões provocadas pelos radicais livres. O antioxidante mais seguro, que já está a ser utilizado em algumas terapias da doença é o extrato EGb 761 *Ginkgo biloba*. Por outro lado, na fase prodrómica começa a verificar-se aumento da proteína A β e da hiperfosforilação de tau que devem ser controlados. Em relação à proteína A β , o mais adequado é a administração de um anticorpo com elevada afinidade para a espécie monomérica, como já foi utilizado o Solanezumab. No entanto, esta alternativa necessita de várias administrações, o que pode reduzir a adesão à terapêutica. De modo a contornar este problema poderia optar-se pela imunização ativa que apenas necessita de uma administração, que é viável pois ainda não se verifica agregação amilóide. A agregação deve também ser evitada de modo a que as espécies tóxicas não apareçam, o que poderia ser conseguido utilizando o ionóforo do cobre/zinco, nomeadamente PBT2. Considerando a proteína tau, nesta fase é importante evitar a hiperfosforilação da mesma e a sua consequente libertação do microtúbulo. Para tal, o ideal será atuar ao nível das quinases responsáveis pela fosforilação. Uma das opções mais viáveis é a inibição da GSK-3 com lítio, sendo a microdose o mais adequado. Outro mecanismo importante a considerar seria o processo inflamatório e o ibuprofeno constituiria uma opção promissora.

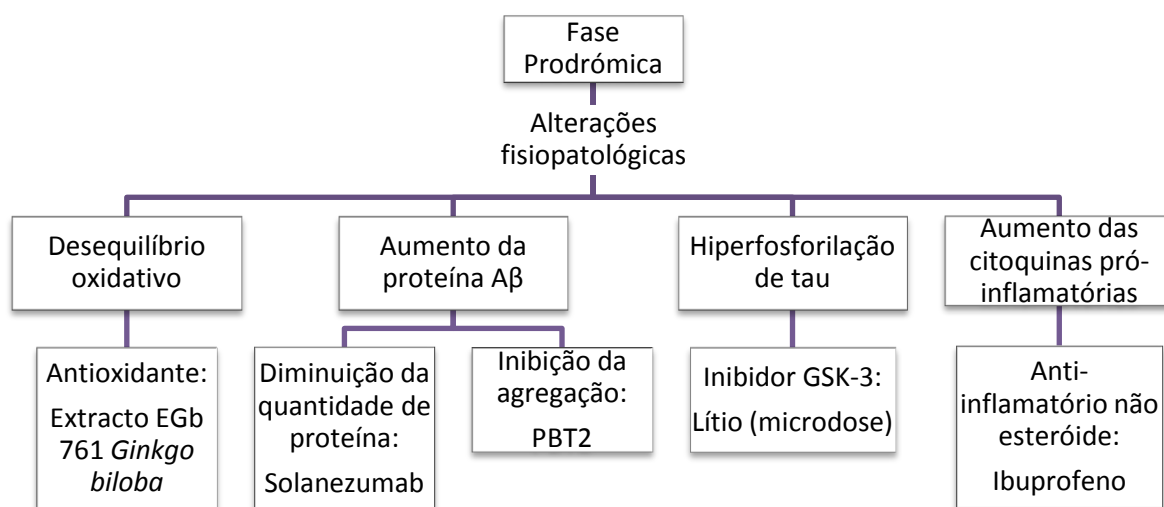


Ilustração 10 – Proposta de esquema terapêutico para a fase prodrómica da Doença de Alzheimer.

2.6.2. Fase de declínio cognitivo ligeiro

O declínio cognitivo ligeiro verifica-se quando o quadro clínico já está instalado, ou seja, já existem evidências de todos os mecanismos fisiopatológicos descritos. Deste modo, é necessário abordar cada um deles para que a terapia seja eficaz.

Nesta fase, encontram-se presentes no parênquima cerebral todas as espécies de amiloide, nomeadamente monómeros, oligómeros e fibrilhas. Portanto, é importante ter uma terapêutica abrangente, tornando-se necessário inibir a formação de novos monómeros recorrendo ao inibidor mais promissor do momento, MK-8931, e eliminar as formas tóxicas através da imunoterapia passiva. Esta associação poderia revelar-se bastante eficaz porque permite a diminuição da concentração das formas tóxicas de duas formas: por um lado, mediante a imunoterapia facilitar a remoção de A β através da microglia, por outro lado, mediante a inibição da formação de novos monómeros com desagregação de alguns oligómeros e fibrilhas. Como alternativa, poderia optar-se pelo BAN2401/mAb158, que apresenta bons resultados na remoção das espécies tóxicas, apresentando elevada afinidade para estas.

A proteína tau encontra-se hiperfosforilada o que constitui um problema para a estabilidade do microtúbulo e para o emparelhamento desta proteína e formação de novos neurofibrilares. Tal como na fase prodrómica, de modo a reduzir a hiperfosforilação da tau é necessária a administração de um inibidor da quinase GSK-3, nomeadamente lítio em microdose. Para diminuir os novos, pode optar-se pela imunoterapia, que surge como uma opção promissora. De entre os vários podemos destacar a nova vacina AADvac1.

Outros mecanismos devem ser tidos em consideração, como é o caso da presença de ROS e da disfunção mitocondrial. No entanto, ainda não se encontram disponíveis opções terapêuticas para a disfunção mitocondrial.

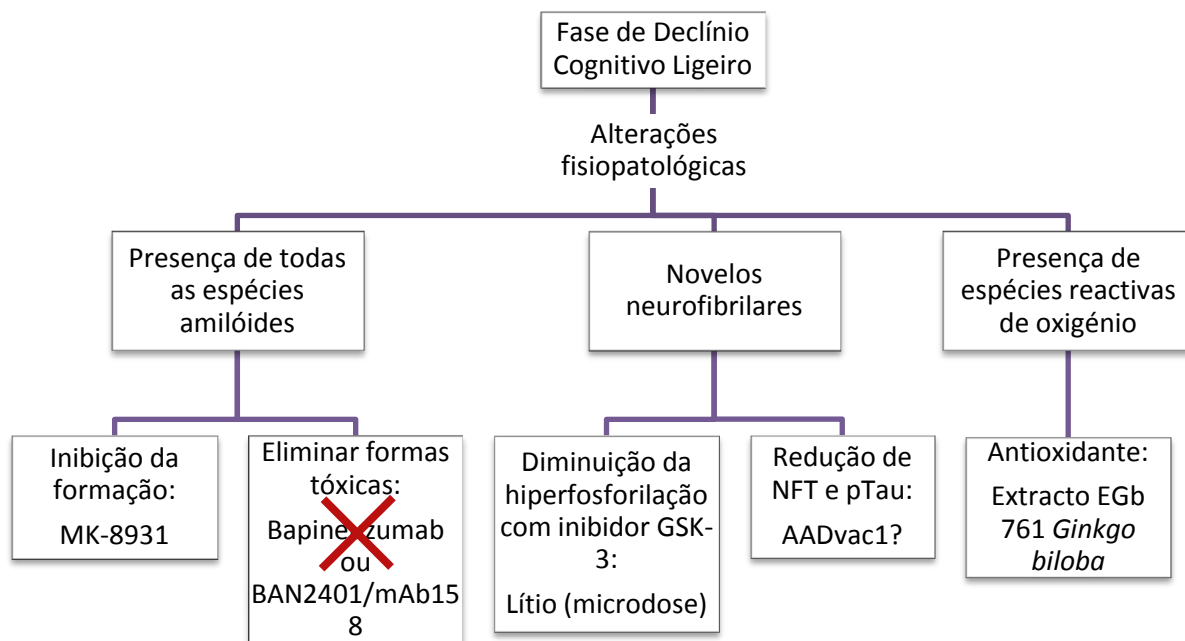


Ilustração 11 - Proposta de esquema terapêutico para a fase de declínio cognitivo ligeiro da Doença de Alzheimer.

Conclusão

A Doença de Alzheimer representa um sério problema de saúde pública que merece toda a atenção. Primeiro há uma necessidade urgente de delinear estratégias de diagnóstico que permitam determinar a existência da doença o mais precocemente possível. Para tal, pode e deve recorrer-se aos biomarcadores já conhecidos para que a terapia seja iniciada o mais cedo possível, permitindo o atraso da progressão da doença.

Relativamente aos diversos mecanismos fisiopatológicos apresentados no presente trabalho, são várias as evidências que apontam para outras alternativas além da teoria da cascata amilóide. Não devendo ser completamente ignorado este mecanismo, hoje começa a ser claro que o mesmo é uma consequência do processo inflamatório inicial. Desta forma, a terapêutica deve focar-se na inibição da deposição amilóide, apenas como forma preventiva de maior perda neuronal, pois as formas agregadas têm um efeito tóxico para estas células. Os estudos mais recentes revelam que a acumulação de proteína tau hiperfosforilada correlaciona-se melhor com o defeito cognitivo associado à DA. A dissociação desta dos microtúbulos com a consequente destabilização dos mesmos, conduz à perda do transporte axonal e a deposição da proteína sob a forma de novelos o qual vai perturbar mecanismos celulares essenciais ao metabolismo celular, que quando bloqueados, permitirão a acumulação de resíduos tóxicos e a perda neuronal. Assim sendo, a terapêutica para combater este mecanismo deveria merecer atenção. Por outro lado, a hipótese inflamatória também tem um grande peso na fisiopatologia desta doença. Primeiro porque as citocinas pró-inflamatórias são dos primeiros biomarcadores a aparecer, permitindo uma ação precoce, por fim, porque a inflamação crónica associada ao *stress* oxidativo tem uma forte influência na função de várias células, nomeadamente nas células da microglia que possuem uma ação protetora do SNC.

A proposta de esquema terapêutico apresentada resulta da reflexão sobre as diversas terapêuticas associadas aos mecanismos fisiopatológicos estudados. Apenas foram focadas duas fases da DA, a prodrómica e a MCI, pelo facto de ser a altura em que a terapêutica pode ser administrada com o intuito de evitar a progressão da doença.

A terapêutica disponível neste momento apenas atua nos sintomas da doença sendo urgente o desenvolvimento de fármacos que atuem a nível dos mecanismos fisiopatológicos discutidos ao longo do trabalho. Sendo a DA uma doença que

apresenta vários mecanismos fisiopatológicos que interagem, torna-se necessário que também a terapêutica seja abrangente, isto é, deve recorrer-se a uma associação de fármacos. Outro aspeto que parece importante será a avaliação da eficácia da terapêutica. Os estudos efetuados até à data apresentam resultados pouco satisfatórios nas fases finais dos testes clínicos que podem ser devidos à fase da doença em que os doentes se encontram ou ao uso de ferramentas de medição de eficácia não suficientemente sensíveis, pelo que parece fulcral o uso dos fármacos em fases precoces da doença e a otimização das medidas de eficácia estandardizadas para futuros ensaios clínicos.

Bibliografia

- [1]. **Roberson, Erik D.** Contemporary Approaches to Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Methods in Molecular Biology*. s.l. : Springer Science, 2011, Vol. 670.
- [2]. **Medina, Miguel and Avila, Jesús.** *New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy*. Madrid, Espanha : Elsevier Inc., 2014. pp. 540-547. 540-547.
- [3]. **Katsel, Pavel et al.** *Cycle Checkpoint Abnormalities during Dementia: A Plausible Association with the Loss of Protection against Oxidative Stress in Alzheimer's Disease*. Oregon, EUA : Hemachandra Reddy, 2013. 10.1371/journal.pon.0068361.
- [4]. **Cai, Zhiyou, Zhao, Bin and Ratka, Anna.** *Oxidative Stress and β -Amyloid Protein in Alzheimer's Disease*. Guangdong, República da China : Springer Science, 2011. 223-250.
- [5]. **Dubois, Bruno et al.** *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Paris, França : Position Paper, 2007. 734-46.
- [6]. —. *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. Paris, França : Position Paper, 2010. 1118-27.
- [7]. **Bright, Jessica et al.** *Human secreted tau increases amyloid-beta production*. São Francisco, EUA : Elsevier Inc., 2014. 0197-4580.
- [8]. **Krstic, Dimitrije and Knuesel, Irene.** *Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease*. Zurique, Suíça : Macmillan Publishers Limited, 2013.
- [9]. **Moghbel, Mateen C. et al.** *Amyloid- β imaging with PET in Alzheimer's disease: is it feasible with current radiotracers and technologies?* Filadélfia, EUA : Springer, 2011. 202–208.
- [10]. **Luque-Contreras, Diana et al.** *Oxidative Stress and Metabolic Syndrome: Cause or Consequence of Alzheimer's Disease?* Saltillo, México : Hindawi Publishing Corporation, 2014. 10.1155/2014/497802.

- [11]. **Zheng, Hui and Koo, Edward H.** *Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein*. Houston, EUA : BioMed Central Ltd., 2011. 6:27.
- [12]. **Serpell, Louise C.** *Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly*. Cambridge, Reino Unido : Elsevier Science B.V., 2000. 00925-4439.
- [13]. **Ahmed, Mahiuddin et al.** *Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1-42 oligomers to fibrils*. Nova Iorque, EUA : Nature America Inc., 2010. 10.1038/nsmb.1799.
- [14]. **Pan, et al.** *Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease*. Fuzhou, China : BioMed Central Ltd., 2011. 6:45.
- [15]. **Lei, Hongxing.** *Amyloid and Alzheimer's disease*. Pequim, China : Higher Education Press and Springer-Verlag, 2010. 312-314.
- [16]. **Lambracht-Washington, Doris and Rosenberg, Roger N.** *Anti-amyloid beta to tau-based immunization: Developments in immunotherapy for Alzheimer disease*. Dallas, Texas : Immunotargets Ther, 2013. 105–114.
- [17]. **Sandberg, Anders et al.** *Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid- β oligomers by protein engineering*. Cambridge, United Kingdom : Alan R. Fersht, Medical Research Council Centre for Protein Engineering, 2010.
- [18]. **Gunther, Erik C. and Strittmatter, Stephen M.** *β -amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease*. New Haven, EUA : Springer-Verlag, 2009. 331-338.
- [19]. **Minter, Myles et al.** *Amyloid- β drives a type-1 interferon mediated neuro-inflammatory response in Alzheimer's disease*. Cannes, França : BioMed Central Ltd., 2013. 1750-1326.
- [20]. **Morales, Inelia et al.** *Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches*. Santiago, Chile : Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014. 10.3389/fncel.2014.00112.
- [21]. **Sachse, Carsten, Grigorieff, Nikolaus and Fändrich, Marcus.** *Nanoscale Flexibility Parameters of Alzheimer Amyloid Fibrils Determined by Electron*

Cryo-Microscopy. Cambridge, Reino Unido : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010. 1321 –1323.

[22]. Pathological changes in the brain en Alzheimer's disease. [book auth.] Bruce E. Murdoch. *Language disturbances in dementia syndromes*. 2º. West Sussex, Reino Unido : John Wiley and Sons Ltd., 2010.

[23]. **Sereniki, Adriana and Vital, Maria Aparecida Barbato Frazão.** *Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features*. Curitiba, Paraná : Universidade Federal do Paraná, 2008.

[24]. **Nogueira, R. et al.** *Angiopatia Amiloide Cerebral*. Goiás, Brasil : Rev Med Saude Brasilia, 2012. 105-12.

[25]. **Franco, Rafael and Cedazo-Minguez, Angel.** *Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans?* Pamplona, Espanha : Marianthi Papakosta, Pfizer, 2014. 10.3389-fphar.2014.00146.

[26]. **Villemagne, Vactor L. and Okamura, Nobuyuki.** *In vivo tau imaging: Obstacles and progress*. Melbourne, Austrália : Elsevier Inc., 2014. 254-264.

[27]. **Tepper, K. et al.** *Oligomer formation of tau hiperfosforilated in cells*. Alemanha : The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2014. 25339173.

[28]. **Han, Sun-Ho and Mook-Jung, Inhee.** *Diverse Molecular Targets for Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease*. Seoul, Coreia : The Korean Academy of Medical Sciences, 2014. 1011-8934.

[29]. **Majerova, Petra et al.** *Microglia display modest phagocytic capacity for extracellular tau oligomers*. Bratislava, Eslováquia : BioMed Central Ltd., 2014. 11:116.

[30]. **Longo, Frank M. and Massa, Stephen M.** *Neuroprotective Strategies in Alzheimer's Disease*. São Francisco, Califórnia : The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc., 2004. 117-127.

[31]. **Wischik, Claude M., Harrington, Charles R. and Storey, John M.D.** *Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease*. Escócia, Reino Unido : Elsevier Inc., 2013. 529–539.

- [32]. **Nisbet, Rebecca M. et al.** *Tau aggregation and its interplay with amyloid- β* . Brisbane, Austrália : Springer, 2014. 10.1007/s00401-014-1371-2.
- [33]. **Mosher, Kira Irving and Wyss-Coray, Tony.** *Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease*. Califórnia, EUA : Elsevier Inc., 2014. pp. 594-604. 594-604.
- [34]. **Christen, Yves.** *Oxidative stress and Alzheimer disease*. Paris, França : American Society for Clinical Nutrition, 2014.
- [35]. **Castellani, Rudy J. et al.** Oxidative Stress and Alzheimer's Disease. [book auth.] D. Praticò and P. Mecocci. *Studies on Alzheimer's Disease*. Nova Iorque, EUA : Springer Science, 2013.
- [36]. **Wang, Xinglong et al.** *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. Cleveland, EUA : Elsevier B.V., 2013.
- [37]. **Di Domenico, Fabio and Perluigi, Marzia.** Peripheral Biomarkers of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. [book auth.] D. Praticò and P. Mecocci. *Studies on Alzheimer's Disease*. Nova Iorque, EUA : Springer Science, 2013.
- [38]. **Smith, Mark A. et al.** *Amyloid- β Deposition in ALzheimer Transgenic Mice is Associated with Oxidative Stress*. Filadélfia, EUA : Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- [39]. **Michaelson, Daniel M.** *APOE ϵ 4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease*. Tel Aviv, Israel : The Alzheimer's Association, 2014. 1552-5260.
- [40]. **Lannfelt, Lars et al.** *Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- β protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease*. Uppsala, Suécia : BioMed Central Ltd., 2014. 6:16.
- [41]. **Sabharwal, Priyanka and Wisniewski, Thomas.** *Novel immunological approaches for the treatment of Alzheimer's disease*. Nova Iorque, EUA : National Institute of Health, 2014. 139-151.
- [42]. **Vellas, B. et al.** *Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders*. Toulouse, França : Bentham Science Publishers, 2009. 1875-5828.

- [43]. **Doody, Rachelle S. et al.** *Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. Houston, EUA : Massachussts Medical Society, 2014. 311-21.
- [44]. **Goure, William F. et al.** *Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics*. Livermore, EUA : BioMed Central Ltd., 2014. 6:42.
- [45]. **Castello, Michael A. et al.** *Moving beyond anti-amyloid therapy for the prevention and treatment of Alzheimer's disease*. Loma Linda, EUA : BioMed Central Ltd., 2014. 1471-2377.
- [46]. **Salloway, Stephen et al.** *Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. Boston, EUA : Massachusetts Medical Society, 2014. 322-23.
- [47]. **Karran, Eric and Hardy, John.** *Antiamyloid Therapy for Alzheimer's Disease - Are We on the Right Road?* Londres, Inglaterra : Massachusetts Medical Society, 2014.
- [48]. **Laske, Christoph.** *Phase 3 Trials of Solanezumab and Bapineuzumab for Alzheimer's Disease*. Tübingen, Alemanha : Massachusetts Medical Society, 2014.
- [49]. **Zhao, Lei et al.** *Beneficial synergistic effects of microdose lithium with pyrroloquinoline in an Alzheimer's disease mouse model*. Xangai, China : Elsevier Inc., 2013. 0197-4580.
- [50]. **Nunes, Paula V. et al.** *Lithium and risk for Alzheimer's disease*. São Paulo, Brasil : BJPhych, 2007. 359-360.
- [51]. **Del Ser, T. et al.** *Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: A pilot study*. Madrid, Espanha : Elsevier B.V., 2013. 13872877.
- [52]. **Kontsekova, Eva et al.** *First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model*. Bratislava, Eslováquia : BioMed Central Ltd., 2014. 6:44.

[53]. **Askarova, Sholpan, Tsoy, Andrey and Lee, James C-M.** *RAGE targeted strategies for Alzheimer's amyloid β peptide induced blood brain barrier dysfunctions*. Astana, Cazaquistão : BioMed Central Ltd., 2013. 1750-1326.

[54]. **Giraldo, E. et al.** *A β and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: Protective role of vitamin E*. Vlencia, Espanha : Elsevier B.V., 2014.

[55]. **Lloret, Ana et al.** *Vitamin E Paradox in Alzheimer's Disease: It Does Not Prevent Loss of Cognition and May Evven Be Detrimental*. Valencia, Espanha : IOS Press, 2009. 143-149.

[56]. **Li, Ming et al.** *Stem Cell Treatment for Alzheimer's Disease*. Osaka, Japão : Katalin Prokai-Tatrai, 2014. 1422-0067.

[57]. **Grove, Richard A. et al.** *A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, 16-Week Study of the H3 Receptor Antagonist, GSK239512 as a Monotherapy in Subjects with Mild-to Moderate Alzheimer's Disease*. Reino Unido : Bentham Science Publishers, 2014. 1875-5828.

[58]. **Haig, George M. et al.** *A Randomized Study of H3 Antagonist ABT-288 in Mild-To-Moderate Alzheimer's Dementia*. Cairo, Egito : IOS Press, 2014. 1387-2877.