



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização da Resposta Imune Periférica na Doença de Alzheimer

Milene Vieira Gonçalves

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização da Resposta Imune Periférica na Doença de Alzheimer

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Margarida Souto-Carneiro e a co-orientação do Doutor Rui de Carvalho (Universidade de Coimbra)

Milene Vieira Gonçalves

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, na pessoa da Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, pela recepção e disponibilidade demonstrada para a realização deste trabalho.

À Doutora Margarida Souto-Carneiro pela amizade, carinho e orientação científica demonstrada ao longo de todo este tempo. O apoio demonstrado vai mais além da elaboração deste trabalho e sem ela o meu mestrado não teria sido realizado. O meu mais sincero obrigada.

A toda a equipa do serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, na pessoa da Doutora Isabel Santana, pela colaboração, disponibilidade e ajuda.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa e à sua equipa do centro de Imunologia da FMUC – e em particular à Dr^a Vera Alves - pela disponibilização dos equipamentos de citometria da Faculdade de Medicina, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho e também por toda a simpatia e palavras de incentivo.

Ao Departamento de Ciências da Vida, em especial ao Doutor Rui de Carvalho pela co-orientação, disponibilidade e apoio demonstrado ao longo destes dois anos. Agradeço ainda, ao Mestre Manuel Matos e à Doutora Paula Veríssimo pelo apoio, recepção e esclarecimento de inúmeras dúvidas ao longo de todo o mestrado.

A todos os meus colegas do laboratório de Imunologia Valéria Bisio, Sandra Cardoso, David Antunes, Magno Garcia, Giuseppe Loiacco, Marco Heestermans, Geema Kondadaraman, Tiago Sousa, Gustavo Rossi e Vítor Gonçalves, muitos dos quais já não se encontram presentes mas de qualquer forma demonstraram todo um carinho e amizade ao longo da realização deste trabalho.

À colega e amiga Helena Carvalheiro, que me apoiou e esclareceu nas mais diversas alturas, tendo um contributo essencial na realização desta tese.

Ao Dr. Paulo Santos, a pessoa responsável pelo meu gosto pela ciência. Muito obrigada, não só pelo carinho amizade e palavras de apoio mas também pela disponibilidade demonstrada cada que vez que bati à sua porta.

Aos meus amigos, que representam um suporte pelo seu apoio incondicional em todos os momentos, independentemente da distância à qual se possam encontrar. Um obrigada muito especial à Susana Carmona, minha eterna companheira em Coimbra, à Joana Viegas pelo esforço, apoio e carinho prestado nos longos dias de escrita da tese, à Margarida Teixeira pela ajuda incondicional, à Magda Lemos pelos telefonemas encorajadores e à Liliana Lopes, por me acompanhar em cada segundo da minha vida.

A toda a minha família com um agradecimento especial à minha avó que representa um pilar fundamental na minha vida, uma fonte de amor e força; aos meus primos e eternos companheiros e à Otilia dos Santos pelas palavras de apoio e força.

Agradeço aos meus pais toda a ajuda, amor e carinho. Muito obrigada por acreditarem em mim, por respeitarem a minha escolha e me ajudarem a concretizar parte do meu sonho. Agradeço com todas as minhas forças à minha mãe, a pessoa que mais me apoia e que está sempre presente, sendo uma fonte de amor e força inesgotável e a quem devo tudo.

E por último, mas não menos importante, à pessoa que me deu força para continuar a cada momento, que me ensinou a amar e não desistir dos meus sonhos. Obrigada André Rafael pelo amor, apoio, carinho, força e por existires na minha vida.

Todo o esforço, momentos bons e menos bons que levaram à realização deste trabalho são dedicados a alguém que algures acredito que me continua a acompanhar, ao meu irmão Tiago Vieira Gonçalves.

ÍNDICE

RESUMO-ABSTRACT	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO	6
1. O IMPACTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	7
2. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	7
2.1 – <i>Mecanismos Moleculares da Doença de Alzheimer</i>	8
2.2 – <i>Hipótese da Cascata Amilóide</i>	11
3 – A GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	12
4 – IMPORTÂNCIA DA GENÉTICA DA INFLAMAÇÃO	14
5 - IMUNOLOGIA DA DA AO NÍVEL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	15
5.1 – <i>Microglia</i>	16
5.2 – <i>Astrócitos</i>	17
5.3 - <i>Citocinas</i>	18
5.4 - <i>Neurónios</i>	18
6 - RESPOSTA IMUNE E INFLAMAÇÃO CRÓNICA	19
7 – IMUNOLOGIA DA DA AO NÍVEL DO SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO	23
OBJECTIVOS	27
PROTOCOLO EXPERIMENTAL E METEDOLOGIAS	29
1 - GRUPOS EM ESTUDO	30
2 - ANÁLISE FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	30
3 - ENSAIO DE CITOMETRIA COM ESFERAS	32
4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
RESULTADOS	34
1 - ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
1.1 – <i>Análise de Células B (CD19+)</i>	37
1.1.1 – Doentes de Alzheimer vs Indivíduos Controlo.....	37
1.1.2 – Indivíduos com Défice Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo	39

1.1.2 – Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro	42
1.2 – Análise de Células T Auxiliares (CD3+CD4+)	43
1.3 – Análise de Células T Citotóxicas (CD3+CD8+).....	44
1.3.1 - Doentes de Alzheimer vs Indivíduos Controlo	44
1.3.2 - Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo.....	46
1.3.3 - Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro	46
1.4 – Análise de Células NK (CD3-CD56+)	47
1.4.1 – Indivíduos com a Doença de Alzheimer vs Indivíduos Controlo.....	47
1.4.2 – Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo.....	49
1.4.3 – Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro	50
2 – DETECÇÃO DE QUIMIOCINAS NO SORO.....	51
DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	55
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Clivagem da Proteína β -Amilóide pela via não amiloidogénica (esquerda) e pela via amiloidogénica (direita). Adaptado de LaFerla et al., <i>Nat. Rev. Neurosci.</i> 2007.	9
Figura 2 - Lesão oxidativa induzida pela proteína β -Amilóide. Adaptado de Mattson, <i>Nature</i> 2004.....	10
Figura 3 - Hipótese da Cascata da Proteína β -Amilóide. Adaptado de Hampel et al., <i>Exp Neurol</i> 2009.....	11
Figura 4 – Via exógena de apresentação de antígenos lipídicos mediada por ApoE. [1] ApoE secretada ou reciclada apreende antígenos lipídicos; [2] Libertação, por parte de macrófagos infectados, de ApoE associada a antígenos lipídicos; [3] Lipoproteínas do soro (VLDL) servem como depósito para antígenos lipídicos. Adaptado de Peter Van Den Elzen et al. 2005, <i>Nature Publishing group.</i>	14
Figura 5 - Neurotoxicidade com interação entre células da microglia e o neurónio. Adaptado de Block et al., <i>Nat Rev Neurosci</i> 2007.....	17
Figura 6 – A interface entre a imunidade inata e adquirida e as consequências do sucesso ou da falha da resposta imune. Uma comunicação eficaz entre a resposta imune inata e a resposta imune adquirida leva a uma erradicação do agente patogénico e imunidade do hospedeiro (assinalado a verde). A falha de uma eficiente discriminação entre o próprio e o não-próprio por parte do sistema imune inato e adaptativo leva a uma proliferação do agente patogénico e em último caso pode ocorrer sépsis (representado a vermelho). Esta falha está também associada ao desenvolvimento de doenças auto-imunes e alergias (assinalado a vermelho). Legenda: [DC] – célula dendrítica; [CD40L] – Ligando do CD40; [INF] – Interferão; [MHC] – complexo Major de Histocompatibilidade; [PMN] – células Polimorfonucleares, [TCR] – Receptor das células T; [NCR] – Receptor Natural de Citotoxicidade; [NCR-L] – Ligando do Receptor Natural de Citotoxicidade. Adaptado de Hoebe et al., 2004, <i>Nature Immunology.</i>	22
Figura 7 – As células da microglia e os monócitos tentam retardar a DA, agregando a proteína β A no SNC, sendo o seu recrutamento mediado por receptores do ligando 2 de	

quimiocinas CC (Ccr2). Estas células podem também servir como suporte neurotrófico a neurónios e astrócitos. Adaptado de Britschgi et al, 2007. *Nature Publishing Group*. 24

Figura 8 – Gráfico de dispersão tamanho vs complexidade de uma amostra de sangue periférico de um doente com Défice Cognitivo Ligeiro. A população circundada corresponde aos linfócitos. Legenda: [SSC-A] – Side Scatter Complexity; [FSC-A] – Forward scatter Size 35

Figura 9 – Subpopulações Celulares de células do sangue periférico definidas com base na expressão de moléculas de superfície [A] – Subpopulações de Células B (CD19+): Q1 – Células B *naive* (CD27-IgD+); Q2 – Células B de memória *unswitched* (CD27+IgD+); Q3 Células B de memória *switched* (CD27+IgD-); Q4 – Células B de memória duplas negativas (CD27-IgD-). [B] – Subpopulações de Células T Citotóxicas (CD3+CD8+): Q1 – Células CD27-CD62L+; Q2 – Células T de memória Central (CD27+CD62L+); Q3 – Células T de memória efectora (CD27+CD62L-); Q4 – Células T efectoras de curta duração (CD27-CD62L-). [C] – Subpopulações de células NK (CD3-CD56+): NK Reguladoras (CD3-CD56^{Elevado}CD16-); NK pró-inflamatórias (CD3-CD56^{Elevado}CD16+); NK Citotóxicas (CD3-CD56^{Baixo}CD16+) e NK Naive (CD3-CD56^{Baixo}CD16-). [D] – Subpopulações de Monócitos (CD11b+): Monócitos Clássicos (CD14+CD16^{Baixo}); Monócitos Intermediários (CD14+CD16^{Elevado}); Monócitos Inflamatórios (CD14^{Baixo}CD16^{Elevado}). FITC, PE; PE-Cy7, APC-H7 e PerCPCy5.5 representam fluorocromos. 36

Figura 10 – Diferenças na expressão de IgM em subpopulações de células B. [A] Subpopulação CD27+IgD-IgM+; [B] Subpopulação CD27+IgD-IgM-. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m(n=10). As diferenças estatisticamente significativas p<0,05 são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 37

Figura 11 – Percentagem de linfócitos CD27-IgD+IL-10+. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas p<0,05 e p<0,01 são representadas por um ou dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 37

Figura 12 – Os doentes de Alzheimer apresentam uma maior percentagem de células B em circulação expressando receptores de co-estimulação/ativação, *homing* e apoptose. [A] Expressão de CD69; [B] Expressão de CD40; [C] – Expressão de CD95 e [D] – Expressão do receptor CCR1. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$ são representadas por um, dois e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 38

Figura 13 - Diferente expressão de IL6R à superfície da população total de células B entre os diferentes grupos em estudo. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,001$ são representadas por um ou três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 39

Figura 14 – População Total de Células B. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo . 39

Figura 15 – Células B totais CD19+ que estão a produzir IL-10. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 40

Figura 16 - Expressão do receptor CXCR4 à superfície da população total de células B. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,001$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 40

Figura 17 – Aumento de subpopulações de células B em doentes com DCL. [A] Células B reguladoras [B] Percentagem de células CD27+IgD+ a produzir IL-10. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas

$p < 0,001$ são representadas por dois*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 41

Figura 18 - Produção de IL-10 nas Subpopulações de Células B. [A] IL-10 na Subpopulação CD27-IgD+; [B] IL-10 na Subpopulação CD27+IgD+. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ e $p < 0,001$ são representadas por um e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 41

Figura 19 - Produção de TGF- β nas Subpopulações de Células B. [A] TGF- β na Subpopulação CD27-IgD+; [B] TGF- β na Subpopulação CD27+IgD+ e [C] – TGF- β na Subpopulação CD27-IgD-. Os resultados estão expressos em percentagem celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 42

Figura 20 - Percentagem Total de células T auxiliares (CD4+) produtoras de IL-4. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células T CD4+ e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ e $p < 0,01$ são representadas por um e dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 43

Figura 21 - Total de células T auxiliares (CD4+) produtoras de IL-17A. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células T CD4+ e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 43

Figura 22 - Produção de IL-4 em células T auxiliares activadas (CD4+CD28+). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 44

Figura 23 – Percentagem de células T Citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L+) produtoras de IFN- γ . Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%)

relativa ao total de células T CD8+ e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 45

Figura 24 - Produção de IL-10 em células T Citotóxicas Totais (CD8+). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 45

Figura 25 - Produção de IFN- γ em células T Citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,01$ são representadas por um e dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 46

Figura 26 - Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas (CD3-CD56^{Low}CD16+). [A] – Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas CD62L+ e [B] – Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas CD62L-. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$ são representadas por um, dois e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 47

Figura 27 - Produção de INF- γ em células NK Totais (CD3-CD56+) Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 48

Figura 28 - Subpopulação de células NK denominada NK *naive* Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,001$ são representadas por três *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 48

Figura 29 - Expressão do receptor CRACC na subpopulação de células NK citotóxicas CD62L- Os resultados estão expressos em Intensidade média de fluorescência e

representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 49

Figura 30 - Produção de granzima B pela subpopulação de células NK Reguladoras (CD3-CD56^{Elevado}CD16-). Os resultados estão expressos Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo. 50

Figura 31 - Diferenças entre a produção de IFN- γ pelos monócitos inflamatórios do sangue periférico entre doentes com DCL e indivíduos controlo. [A] – Os resultados são expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de monócitos e representam a média±e.p.m (n=10) na subpopulação de monócitos inflamatórios; [B] – Subpopulação de monócitos inflamatórios produtora de IFN- γ . Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo..... 51

Figura 32 - Concentração da quimiocina G-CSF no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [G-CSF] - Factor Estimulador de Colónias Macrofágico..... 52

Figura 33 - Concentração da IL-8 no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [IL-8] – Interleucina 8..... 53

Figura 34 - Concentração de MIP-1 β no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice

Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [MIG] – Monocina Induzida pelo Interferão-gama. 53

Figura 35 - Concentração de MIP-1 β no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média \pm e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas p<0,01 são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [MIG] – Monocina Induzida pelo Interferão-gama 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Misturas de anticorpos usadas na análise por citometria de fluxo. A tabela mostra os anticorpos (Biolegend, San Diego, Califórnia) correspondentes a cada mistura e os respectivos fluorocromos. Os anticorpos assinalados com um * correspondem aos anticorpos intracelulares adicionados após o permeabilizante.	32
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DA – Doença de Alzheimer

β A – β -Amilóide

APP – Precursor da Proteína β -Amilóide

RE – Retículo Endoplasmático

sAPP – Fração extracelular do APP

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio

RNS – Espécies Reactivas de Nitogénio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FAD – Forma Familiar da Doença de Alzheimer

PS1 – Presenilina – 1

GSK3 β – Sintetase do Glicogénio 3 β

ApoE – Apolipoproteína E

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade

ApoA – Apolipoproteína A

SNC – Sistema Nervoso Central

CMH – Complexo Major de Histocompatibilidade

APC – Células Apresentadoras de Antígeno

CD – do Inglês *Cluster of Differentiation*

NO – Óxido Nítrico

IL-1 β – Interleucina 1 beta

NFκB – Factor Nuclear Kappa B

ERK – Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares

MAPK – Proteína Cinase activada por Mitogénio

M-CSF – Factor Estimulador de Colónias Macrofágico

GDNF – Factor Neurotrófico Derivado da Glia

BACE1 – Beta Secretase

iNOS – Síntetase do Óxido Nítrico

IL-6 – Interleucina-6

TNF-α – Factor de Necrose Tumoral-alfa

IL-8 – Interleucina-8

TGF-β – Factor Transformante do Crescimento beta

MIP-1α – Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 alfa

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

RANTES - regulada sob activação, expressa e secretada por células T normais

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões. Do inglês *pattern-recognition receptors*

TLRs – do Inglês *Toll like receptors*

PAMPs – do Inglês *Pathogen associated molecular patterns*

NK – Células *Natural Killer*

Th₂ – Células T auxiliares Tipo 2 (do Inglês *T helper 2*)

Th₁ - Células T auxiliares Tipo 1 (do Inglês *T helper 1*)

IL-4 - Interleucina-4

IL-5 - Interleucina-5

IFN- γ – Interferão-gama

IL-10 – Interleucina-10

IL-13 – Interleucina-13

AR – Artrite Reumatóide

LES – Lúpus Eritematoso Sistémico

NINCDS – Instituto Nacional de Desordens Neurológicas e Comunicativas e Choque

ADRDA – Associação da Doença de Alzheimer e Desordens Relacionadas

CDR – Racio de Demência Clínica

DCL – Défice Cognitivo Ligeiro

CTL – Grupo controlo

PBS – Tampão fosfato-salino (do Inglês *Phosphate Buffer Saline*)

BSA – Albumina Bovina Sérica

NH₄Cl – Cloreto de amónia

KHCO₃ – Bicarbonato de potássio

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

NaCl – Cloreto de Sódio

KCl – Cloreto de Potássio

Na₂HPO₄.2H₂O – Fosfato de Sódio di-hidratado

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio

CRACC – Receptor Activador das células Citotóxicas do Tipo CD2

CCR1 – Receptor de quimiocinas (motivo C-C) 1

CXCR3 – Receptor de quimiocinas (motivo C-X-C) 3

CXCR4 – Receptor de quimiocinas (motivo C-X-C) 4

BAFF-R – Receptor do Factor Activador de células B

CTLA-4 – Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico

CD62L – L-Lectina

G-CSF – Factor Estimulador de Colónias Granulocíticas

MCP-1 – Proteína Quimiotáctica de Monócitos

MIG – Monocina induzida pelo Interferão-gama

MIP-1 β – Proteína Inflamatória de Macrófagos-1beta

IMF – Intensidade Média de Fluorescência

SSC-A – *Side Scatter Complexity*. Parâmetro indicativo de complexidade celular

FSC-A – *Forward scatter Size*. Parâmetro indicativo de tamanho celular

IL6R – Receptor de IL-6

Bregs – Células B Reguladoras

Tregs – Células T Reguladoras

MCP-3 – Proteína Quimiotáctica de Monócitos 3

CCL – Ligandos de Quimiocinas CC

TCR – Receptor de Células T

BCR – Receptor das células B

KIR – Receptores de morte de células NK (do Inglês *Killer immunoglobulin-like receptors*)

IL-17A – Interleucina 17A

Th₁₇ – células T auxiliares produtoras de IL-17

MARCADORES IMUNOLÓGICOS E CITOCINAS

CD1d – Células apresentadoras de antígeno

CD3 – Linfócitos T e timócitos

CD4 – Linfócitos T auxiliares, monócitos, macrófagos e células dendríticas

CD8 – Linfócitos T citotóxicos mas também em timócitos corticais e células dendríticas.

CD11b – Superfície de várias células da imunidade inata, incluindo monócitos, granulócitos, macrófagos e células NK

CD14 – Macrófagos e neutrófilos e células dendríticas

CD16 – Células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos

CD19 – Células B e células dendríticas foliculares

CD25 – Células B e T activadas e monócitos

CD27 – Timócitos medulares, linfócitos T, células NK e células B de memória

CD28 – Subpopulações de células T e células B activadas

CD38 – Células B e T em estadios iniciais de maturação, célula T activadas, centros germinais de células B e plasmócitos

CD40 – Células B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais basais

CD45RA – Células B, subpopulações de células T (células T naive) e monócitos

CD56 – Neurónios, células da glia, células do músculo-esquelético e células NK

CD62L – Células B, Células T, monócitos e células NK

CD68 – Monócitos, macrófagos, neutrófilos e basófilos activados

CD69 – Células T, B, NK e macrófagos activados

CD95 – Grande variedade de linhas celulares; distribuição incerta *in vivo*

CD107a – Plaquetas activadas, células T activadas, células NK activadas, neutrófilos activados e endotélio activado

CD126 (IL-6R) – Expressão forte nas células B activadas e plasmócitos; expressão fraca na maioria dos leucócitos

CD183 (CXCR3) – Linfócitos T activados, em células NK e em células B

CD184 (CXCR4) – Células T auxiliares, Células B, e células hematopoiéticas

CD191 (CCR1) – células B, células T, neutrófilos, monócitos

CD244 – Células NK e em algumas células T

CD319 (CRACC) – Células NK, células T activadas e plasmócitos

BAFF-R – Células B

IgM – Células B

IgD – Células B

TGF- β – Produzido por condrócitos, monócitos e células T; anti-inflamatório

IL-10 – Células T e macrófagos; supressor potente das funções dos macrófagos

INF- γ - Produzido por células T e NK; activação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas de CMH e *switch* de imunoglobulinas

Granzima B – Linfócitos T citotóxicos e células NK

FOXP3 – Células T reguladoras

CTLA-4 – Células T

IL-17A – Células TCD4 de memória; induzem a produção de citocinas por células endotélias, epiteliais e fibroblastos

IL-4 – Células T; activação de células T, *switch* de IgE e supressão de células Th₁

TNF- α – Macrófagos, células T, células NK; inflamação local e activação endotelial

RESUMO-ABSTRACT

RESUMO

INTRODUÇÃO: A inflamação do sistema nervoso central é uma característica da Doença de Alzheimer (DA). Apesar do papel da inflamação não estar bem esclarecido no processo neurodegenerativo, existem evidências da relação desta processo com a toxicidade da proteína β -amilóide e a patologia da doença. Diferentes estudos sugerem que a inflamação não está presente apenas nos cérebros de doentes de Alzheimer mas também nas células imunes periféricas. Desta forma, o objectivo deste estudo é perceber se existem diferenças nas células do sistema imune periférico de doentes com défice cognitivo ligeiro (DCL) e de doentes de Alzheimer, de forma a perceber o envolvimento do sistema imune periférico no processo neurodegenerativo.

MÉTODOS: Foram usados três grupos constituídos por indivíduos com a mesma média de idades. Assim foram recrutados 10 indivíduos sem doenças cognitivas que constituem o grupo controlo; 10 indivíduos diagnosticados com DA através da classificação NINCDS-ADRDA (McKhann, 1984) e 10 indivíduos diagnosticados com DCL, segundo os critérios da escala do ratio da demência clínica (Critérios de Petersen, 2001). Estes indivíduos não eram portadores de doenças como Diabetes, inflamações crónicas ou doenças neoplásicas, nem tomavam medicações susceptíveis de influenciar as variáveis em estudo. A análise das subpopulações de células B, T, NK e macrófagos foi efectuada por citometria de fluxo. Para a detecção de quimiocinas foram recrutados 17 controlos sem doenças cognitivas, 21 indivíduos diagnosticados com doença de Alzheimer e 27 indivíduos com DCL, usando os mesmos critérios. A quantificação das quimiocinas G-CSF, IL-8; MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e MIG no soro dos indivíduos em estudo foi efectuada através de um ensaio *multiplex* que utiliza esferas que emitem fluorescência. Para amostras normais, a comparação entre os grupos foi realizada recorrendo à análise da variância ANOVA. Quando não existiu uma distribuição normal foi efectuado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com os valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS: Verificaram-se alterações significativas ao nível das células B, as quais nos doentes de Alzheimer apresentavam uma expressão aumentada do marcador CD69 e da molécula CD40 essencial para o *switch* de classe de imunoglobulinas, da

mesma forma que existia um aumento das células B que sofreram *switch* de imunoglobulinas. Também se verificou um aumento da expressão de CD95/Fas e do receptor de quimiocinas CCR1. Os doentes com DCL apresentam uma diminuição do *pool* de células B Totais, associado a um aumento da expressão do receptor CD95/Fas. Existe ainda um aumento do CXCR4, da subpopulação de células B reguladoras e da percentagem de células B a produzirem IL-10. Nos doentes com DCL parece existir uma diferenciação das células Th *naive* no sentido Th₂, dada a produção de IL-4 por parte destas células e no sentido Th₁₇, dada a elevada produção da IL-17A por parte destas células. Existe ainda um aumento da subpopulação CD4+CD28+ produtora de IL-4. As células T citotóxicas não efectoras parecem estar a produzir uma quantidade de IFN- γ mais elevada tanto nos doentes de Alzheimer como nos doentes com DCL e uma quantidade de IL-10 mais baixa que os indivíduos controlo. As células NK apresentam uma maior produção de CRACC pelas células CD62L+ e pelas células CD62L- em ambos os grupos de doentes, quando comparados com o grupo controlo. Pelo contrário, os indivíduos controlo apresentam uma maior percentagem de células *naive* que os dois grupos de doentes. Nos monócitos existe um aumento da produção de IFN- γ pela subpopulação de monócitos inflamatórios nos indivíduos com DCL quando comparados com o grupo controlo. Observou-se um aumento de G-CSF e MIG em ambos os grupos de doentes quando comparados com o grupo controlo e quando se compara doentes de Alzheimer com doentes com DCL existe um aumento significativo de IL-8 e MIP-1 β no soro de doentes com DCL.

CONCLUSÕES: Existem evidências claras da desregulação do sistema imune periférico na doença de Alzheimer, sendo urgente esclarecer a implicação dessas alterações ao nível do processo neurodegenerativo e, da mesma forma, perceber se a alteração do sistema imune periférico é simultânea ou surge como uma consequência do processo neurodegenerativo. Estes dados sugerem ainda perfis celulares diferentes entre os doentes. Doentes de Alzheimer parecem apresentar um perfil ligeiramente mais pró-inflamatório, enquanto os doentes com DCL parecem apresentar um perfil mais anti-inflamatório dada a maior percentagem de células a produzir a interleucina anti-inflamatória IL-10. As quimiocinas IL-8 e MIP-1 β surgem como potenciais biomarcadores para distinguir DCL de DA.

Palavras-Chave: Doença de Alzheimer, Défice Cognitivo ligeiro, Inflamação

ABSTRACT

BACKGROUND: Inflammation of the central nervous system is a feature of Alzheimer's Disease (AD). Even though the role of this inflammation in the neurodegenerative process is not clear, there are evidences of its relationship with amyloid toxicity and pathology. Different studies suggest that inflammation is not present only in the AD brain, but also as peripheral immune cells. Thus, in the present study we assessed whether there were any disease related changes in the peripheral immune cells of mild cognitive impairment (MCI) and AD patients, which could shed some light into their involvement in the neurodegenerative process

METHODS: Three age-matched subject groups were recruited: 10 cognitively healthy controls, 10 patients diagnosed as AD, using NINCDS-ADRDA criteria (McKhann, 1984), in mild to moderate stage using the Clinical Dementia Rating Scale (Rosen, 1984) and 10 with amnesic-MCI (Petersen criteria, 2001). None of these subjects had diabetes, chronic inflammatory or neoplastic diseases, or medications susceptible of influencing study variables. The analysis of the B, T, NK cells and macrophages subsets were performed by flow cytometry. For the chemokine detection again three age-matched subject groups were recruited: 17 cognitively healthy controls, 21 patients with mild to moderate AD and 27 with amnesic-MCI. The quantification of the chemokines G-CSF, IL-8, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b and MIG in the sera was performed by multiplex fluorescent bead array. Data were analyzed using non-parametric One Way-ANOVA for a normal distribution. When the distribution was not normal, the data were analyzed using a Kruskal-Wallis. A p-value <0.05 was considered significant.

RESULTS: B cells were significant altered. On DA patients these cells exhibited higher levels of the molecules CD69 and CD40, which is essential for immunoglobulin switch classes, the same way B cells that suffered immunoglobulin switch classes were higher in these patients. We also observed higher levels of the CD95/Fas expression and higher levels of the CCR1 chemokine receptor. MCI patients showed a decrease of total B cells in association with an increased expression of the receptor CD95/Fas. CXCR4, B regulatory cells and B cells producing IL-10 were increased on the patients. MCI patients appear to have Th naïve cells that differentiate into Th₂ cells because of their

production of IL-4, but also into Th17 cells as well because of their production of IL-17A. CD4+CD28+ cells producing IL-4 are also increased in these patients. Non effector cytotoxic T cells are producing a higher amount of IFN- γ in both groups, AD and MCI when compared with controls. However, total cytotoxic T cells from the controls are producing more IL-10 than total cytotoxic T cells of both groups of patients. NK cytotoxic cells show increased levels of CRACC by CD62L+ cells and CD62L- cells in AD and MCI when compared with controls. On the other hand, control group has a higher percentage of naïve NK cells than the patients. The inflammatory subpopulation of monocytes is producing more IFN- γ in MCI patients when compared with the control group. Both AD and MCI had significantly higher serum levels of G-CSF and MIG than healthy controls. Moreover, when comparing MCI versus AD patients, there was a significant increase in in the serum titers of IL-8 and MIP-1b in the MCI patients.

CONCLUSIONS: The peripheral immune system deregulation in Alzheimer's disease is clear which became urgent clarify how these alterations can influence the neurodegenerative process. In the same way is important to understand if this immune system alteration appears at the same time of the neurodegenerative process or if it is a consequence of this one. These data suggest different cellular profiles between AD and MCI. AD patients seems to have a profile lightly more pro-inflammatory while MCI patients appear to have an anti-inflammatory profile because they have a higher percentage of cells that are producing the anti-inflammatory interleukin IL-10. Overall, the present work produces evidence for the potential of IL-8 and MIP-1b as biological markers to distinguish MCI from early stage AD.

Keywords: Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, Inflammation

INTRODUÇÃO

1. O impacto da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurológica que afecta milhões de indivíduos em todo o mundo (Bateman *et al.*, 2011). Os graves impactos económicos e sociais transformam esta patologia num problema de saúde pública (Yamasaki *et al.*, 2011). A verdade é que nos países ditos desenvolvidos, a população envelhecida está a crescer significativamente em comparação com a população jovem, sendo esta população envelhecida a que necessita de maiores cuidados de saúde. A idade é o maior factor de risco associado à DA, levando a um maior impacto económico desta doença nos sistemas de saúde dos países em que a percentagem de idosos está em crescimento. Mais relevante que o factor financeiro, é a diminuição significativa da qualidade de vida dos doentes e dos familiares que lhes prestam cuidados tornando urgente a descoberta de novas terapias que controlem de forma mais efectiva ou parem a evolução do processo neurodegenerativo (Alloul *et al.*, 1998).

2. Fisiopatologia da Doença de Alzheimer

Na DA ocorre a degeneração de neurónios colinérgicos da zona frontal do encéfalo no septo medial e no núcleo basal de *Meynert* conduzindo a uma hipofunção do hipocampo e do córtex com conseqüente demência (Schliebs and Arendt, 2010). O cérebro de indivíduos com a DA apresenta dois aspectos característicos, os quais têm sido alvo de um estudo intensivo desde a primeira descrição da doença: a deposição extracelular de proteína β – Amilóide (β A), com formação de placas senis e a deposição intracelular de tranças neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada (Takata and Kitamura, 2012).

Clinicamente a doença de Alzheimer é caracterizada por um défice de memória e várias alterações na coordenação visual/espacial; na cognição; na linguagem; nas emoções e na personalidade, normalmente com um aumento da agressividade. Apesar da causa da doença permanecer uma incógnita, existem fortes evidências científicas que consideram a inflamação como um factor importante na progressão da doença (Flirski *et al.*, 2012).

2.1 – Mecanismos Moleculares da Doença de Alzheimer

São vários os mecanismos moleculares até agora caracterizados que tentam elucidar a origem desta doença que se acredita estar relacionada essencialmente com as placas senis e com os emaranhados de proteína tau hiperfosforilada (Schliebs and Arendt, 2010).

As placas senis podem ser encontradas em indivíduos sem qualquer indício de demência, no entanto, existe uma correlação clara entre estas placas e a doença de Alzheimer. As placas senis são constituídas por depósitos de proteína beta amilóide extracelular que deriva do precursor da proteína amilóide (APP) (Muller and Zheng, 2012). Este precursor pertence a uma família de proteínas que é expressa em vários tipos de células e apesar da sua função permanecer desconhecida tem sido sugerido que este funciona como uma factor neurotrófico e neuroprotector ou que está envolvido no tráfego de vesículas ao longo do axónio. O N-terminal do APP encontra-se projectado no domínio extracelular ou localizado no lúmen de vesículas intracelulares tais como o retículo endoplasmático (RE), o complexo de golgi ou endossomas intracelulares. Por sua vez, o C-terminal encontra-se no domínio citoplasmático. O APP pode ser clivado por diferentes proteases (α , β e γ secretases) responsáveis pela produção do peptídeo βA_{1-40} ou da variante βA_{1-42} os quais possuem uma capacidade elevada de se auto-agregarem (Figura 1). Em neurónios normais as secretases levam à produção de fragmentos βA e do polipéptido sAPP, o qual corresponde à fracção extracelular do APP. A βA é constitutivamente secretada por células neuronais e pode ser encontrada no líquido cefalorraquídeo, no sangue ou depositada em capilares cerebrais, arteríolas e vénulas. A βA_{1-42} acumula-se em algumas regiões cerebrais nomeadamente no cerebelo, no estriado e no tálamo e é claramente implicada na doença de Alzheimer (LaFerla *et al.*, 2007).

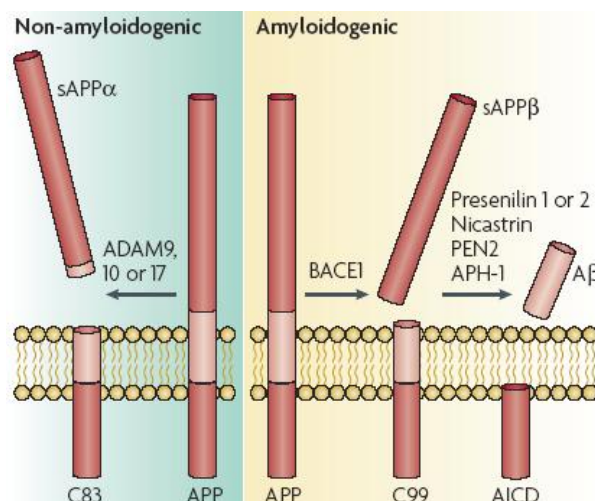


Figura 1 - Clivagem da Proteína β-Amilóide pela via não amiloidogénica (esquerda) e pela via amiloidogénica (direita). Adaptado de LaFerla et al., *Nat. Rev. Neurosci.* 2007.

Os emaranhados neurofibrilares, são compostos essencialmente por proteína tau hiperfosforilada e normalmente estão presentes no hipocampo, no córtex entorrinal e na amígdala. Estes emaranhados são estruturas anómalas geradas pela hiperfosforilação e auto-agregação da proteína tau em filamentos compactos. Num cérebro normal, esta proteína encontra-se associada a microtúbulos estabilizando-os. Assim, um equilíbrio entre fosforilações e desfosforilações da tau confere estabilidade ao citoesqueleto e mantém a morfologia dos axónios. No cérebro de doentes de Alzheimer verifica-se uma hiperfosforilação da tau pela acção de diferentes proteínas cinases, estando o sistema de fosfatases alterado a nível da sua estrutura e conformação, o que afecta a ligação com a tubulina e a capacidade de manter a arquitectura do citoesqueleto (Lee *et al.*, 2012).

Todos estes mecanismos moleculares juntamente com outras alterações celulares são responsáveis pelo desenvolvimento de um mecanismo patogénico fulcral na DA – o stress oxidativo (Resende *et al.*, 2008). Este caracteriza-se como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e anti-oxidantes que pode ocorrer por um excesso de agentes oxidantes, um défice de agentes anti-oxidantes e/ou a combinação de ambos. A sobreprodução de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) como o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio, o óxido nítrico e o peroxinitrito são responsáveis pelos danos celulares e sinais de apoptose, pois iniciam uma série de reacções secundárias entre radicais livres e outras biomoléculas. A presença de radicais livres em excesso é responsável pela indução de uma entrada massiva de cálcio no neurónio (Mecocci and Polidori, 2011). O excesso de βA induz a formação de

concentrações elevadas e não usuais de ROS bem como a depleção de anti-oxidantes endógenos, o que causa dano celular e morte neuronal. Como factor agravante as placas de β -amilóide contêm metais como cobre, zinco e ferro que para além de facilitarem a agregação promovem uma reacção com o peróxido de hidrogénio, formando um oxidante forte e o radical hidroxilo. As alterações no metabolismo do ferro nas células cerebrais são responsáveis por alterações de mecanismos de transdução nessas mesmas células com consequente neurodegeneração. As células neuronais não são as únicas intervenientes neste processo e a activação da microglia é fundamental para a formação de stress oxidativo. É então comum, no cérebro de doentes de Alzheimer, encontrar um aumento de marcadores de stress oxidativo nos quais se incluem proteínas oxidadas, lípidos membranares oxidados, ácido desoxirribonucleico (DNA) oxidado e imunoreactividade da nitro tirosina (Figura 2). O stress oxidativo é considerado responsável por uma grande parte da patologia da doença e tendo como consequências a toxicidade do cálcio e o aumento da vulnerabilidade dos neurónios à excitotoxicidade, o que em conjunto, contribui para mecanismos de morte neuronal (Mattson, 2004).

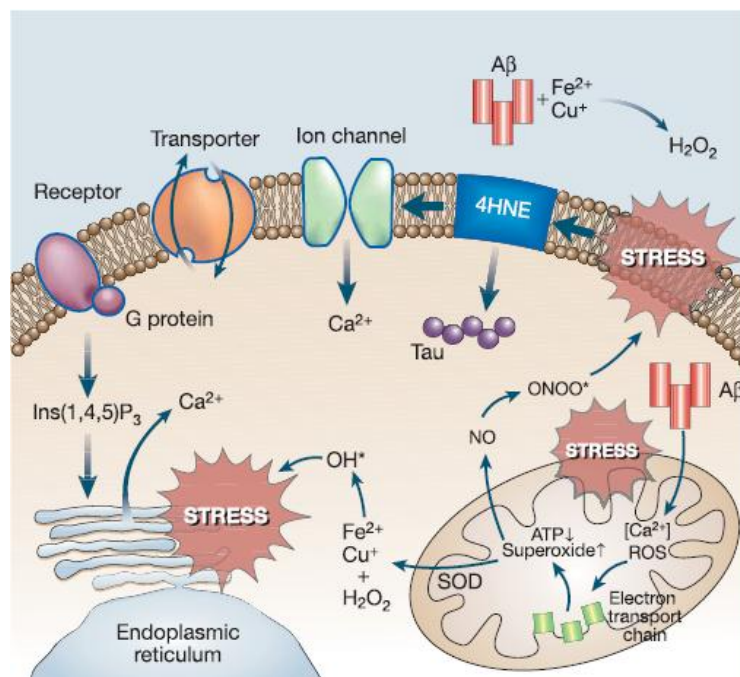


Figura 2 - Lesão oxidativa induzida pela proteína β -Amilóide. Adaptado de Mattson, *Nature* 2004

2.2 – Hipótese da Cascata Amilóide

A hipótese da cascata amilóide (Figura 3) coloca a formação de oligómeros de β A tóxicos e a acumulação destes oligómeros em placas de β A no centro de toda a patogénese da doença de Alzheimer. Esta hipótese refere que com o avançar da idade, ocorre um desequilíbrio entre a produção de β A e/ou os mecanismos de remoção desta proteína, o que origina uma acumulação gradual e uma agregação desta no cérebro, iniciando uma cascata neurodegenerativa que envolve a deposição de β A, a inflamação e o stress oxidativo com dano e perda neuronal. Desde a apresentação desta hipótese à comunidade científica que os estudos desenvolvidos na doença de Alzheimer se baseiam em tentar perceber qual o verdadeiro papel da proteína β A na patogénese desta doença (Hampel *et al.*, 2009).

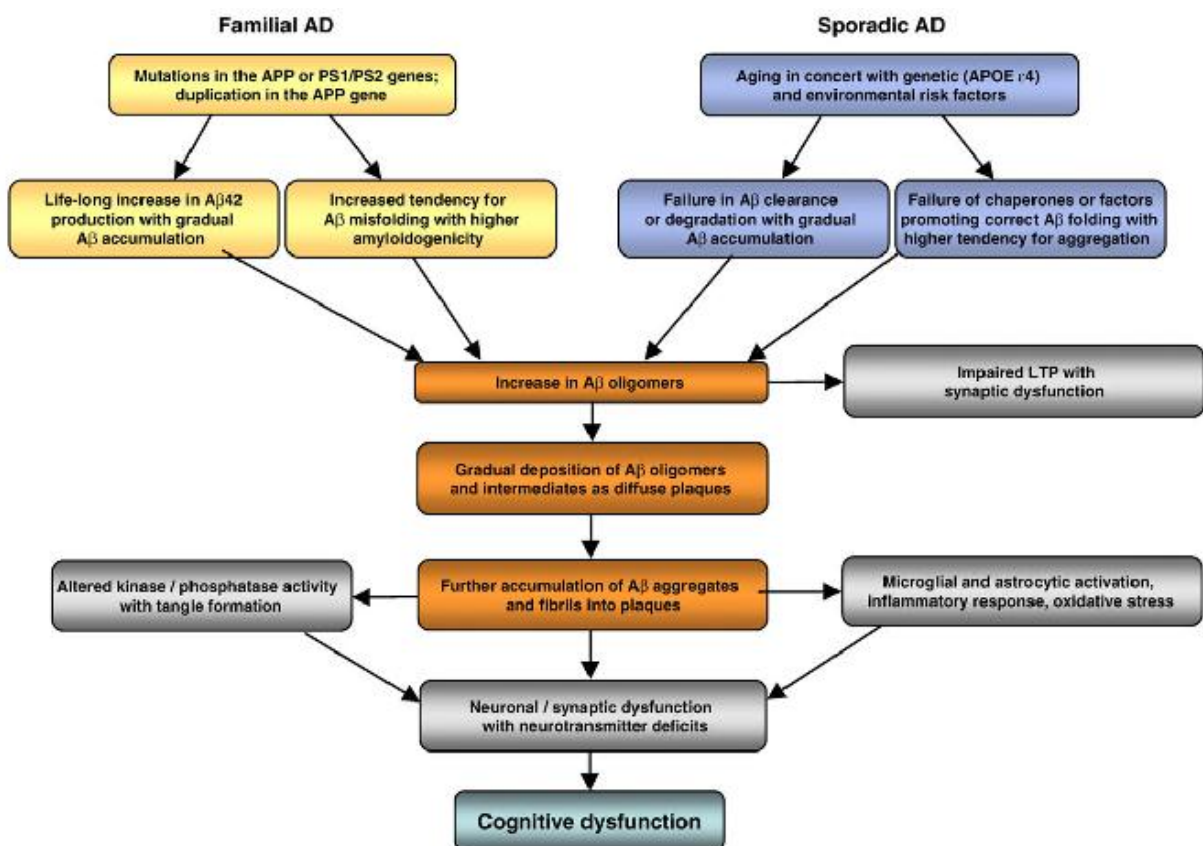


Figura 3 - Hipótese da Cascata da Proteína β -Amilóide. Adaptado de Hampel *et al.*, *Exp Neurol* 2009

3 – A Genética da Doença de Alzheimer

A forma familiar da doença de Alzheimer (FAD) constitui cerca de 5-10% de todos os casos desta doença e é caracterizada por manifestações de demência precoces em adultos. Os principais genes implicados nestas formas familiares da doença são os que codificam para o APP, presenilinas 1 e 2 e α -2 macroglobulinas (Maccioni *et al.*, 2001).

O gene APP está localizado no cromossoma 21 e tem um interesse particular devido ao facto de terem sido encontrados depósitos de proteína β -amilóide e neurodegeneração em indivíduos com síndrome de Down. Mutações ao nível da sequência que codifica a β A no gene do APP resultam numa elevada produção de β A ou na auto-agregação de β A depositada em placas (Ertekin-Taner, 2007).

A Presenilina-1 (PS1) está envolvida no processamento normal do APP, de forma que mutações no gene da PS1 levam a alterações na clivagem do APP com aparecimento de $A\beta_{1-42}$, a variante amilóide mais agressiva para a deposição de placas no cérebro humano. Da mesma forma esta proteína pode estar envolvida em mecanismos de fosforilação (por interacção com a sintetase do glicogénio – GSK3 β) podendo contribuir para a hiperfosforilação da tau. Têm sido demonstradas mutações noutra Presenilinas, nomeadamente na Presilina-2 (Haapasalo and Kovacs, 2011).

A genética da DA não se restringe apenas à forma familiar. Assim, na forma tardia desta doença também se encontram alterações genéticas e considera-se que os factores ambientais também contribuem para a fisiopatologia desta doença. A par com a idade, a presença do polimorfismo da Apolipoproteína E (ApoE) ϵ 4 é reconhecida como um importante factor de risco na forma tardia da doença. A ApoE é uma proteína transportadora de colesterol que pode existir sob a forma de três alelos: ϵ 2 (E2), ϵ 3 (E3) e ϵ 4 (E4) (Ward *et al.*, 2011). A presença do alelo ApoE ϵ 4 leva a uma desregulação lipídica na doença de Alzheimer uma vez que a principal função da proteína ApoE é a redistribuição de lípidos e a manutenção da homeostasia do colesterol. A presença deste alelo parece alterar o processamento de β A, que é um elemento chave na patologia da doença. Apesar da análise genética para detecção da presença deste polimorfismo da ApoE nos doentes de Alzheimer não ser usada como método de diagnóstico é referido na prática clínica como um factor para um pior prognóstico (Elias-Sonnenschein *et al.*, 2011). Indivíduos portadores deste alelo também têm sido associados a um maior risco

de desenvolvimento de hipertensão, hipercolesterolemia e doença arterial coronária. Doentes de Alzheimer apresentam um perfil de lipoproteínas típico de doentes com aterosclerose, com elevados níveis de colesterol plasmático total e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e níveis reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Carter, 2007).

A maior parte do transporte lipídico no sistema nervoso central (SNC) é feito por lipoproteínas constituídas por ApoA e ApoE (Martins *et al.*, 2009).

A ApoE é principalmente sintetizada pelo fígado, embora possa ser produzida por outro tipo de células tais como neurónios, astrócitos e macrófagos (Duan *et al.*, 2007). Esta glicoproteína está envolvida na mobilização e redistribuição do colesterol durante o crescimento neuronal. Pode também estar envolvida na regeneração nervosa, imunoregulação e activação de várias enzimas lipolíticas. Assim, a regeneração neuronal e a remodelação plástica das dendrites são severamente afectadas num elevado número de doentes de Alzheimer que apresentam o polimorfismo Apoε4. O alelo ε4 está fortemente associado com o aumento das placas neuríticas e a angiopatia amilóide cerebral na doença de Alzheimer (Rocchi *et al.*, 2003).

As apolipoproteínas do soro, entre as quais se encontra a ApoE, também são mediadoras do transporte lipídico extracelular para satisfazer as necessidades metabólicas do organismo. Além disso, as apolipoproteínas estão envolvidas na apresentação de antígenos lipídicos exógenos às células T. Enquanto que os antígenos peptídicos são apresentados às células T por moléculas do complexo major de histocompatibilidade (CMH), sendo os péptidos endógenos apresentados pelo CMH classe I e os péptidos exógenos pelo CMH classe II, a apresentação de antígenos lipídicos às células T é feita por moléculas CD1 (do Inglês *Cluster of Differentiation*) na superfície de células apresentadoras de antígeno (APC). A ApoE liga-se a antígenos lipídicos transportando-os até um compartimento endossomal que contém células apresentadoras de antígeno associadas a moléculas CD1 (Figura 4)(van den Elzen *et al.*, 2005). A importância da ApoE na criação de respostas imunes eficientes contra micróbios tem sido demonstrada através de estudos que usam ratinhos deficientes nesta apolipoproteína, os quais demonstram uma elevada susceptibilidade para infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (Martens *et al.*, 2008)

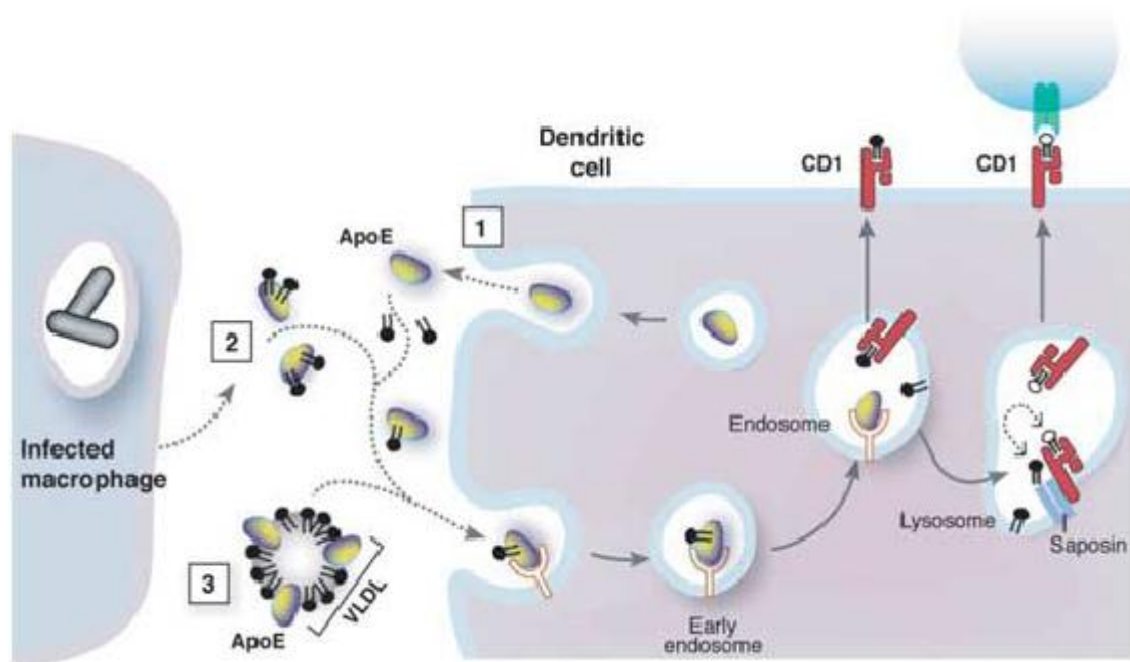


Figura 4 – Via exógena de apresentação de antígenos lipídicos mediada por ApoE. [1] ApoE secretada ou reciclada apreende antígenos lipídicos; [2] Liberação, por parte de macrófagos infectados, de ApoE associada a antígenos lipídicos; [3] Lipoproteínas do soro (VLDL) servem como depósito para antígenos lipídicos. Adaptado de Peter Van Den Elzen *et al.* 2005, *Nature Publishing group*.

4 – Importância da Genética da Inflamação

Existem vários estudos que sugerem que as doenças neurodegenerativas crônicas, entre as quais se encontra a DA, são causadas por uma série de eventos que culminam na morte neuronal. Para além da componente genética, acredita-se que a influência do meio ambiente e a epigenética podem contribuir para os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela neurodegeneração e cronicidade desta doença. Existe ainda uma grande dificuldade em distinguir eventos primários de eventos secundários, de forma, que toda a cascata de acontecimentos se torna um ciclo vicioso com início e fim desconhecidos (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004). Nesta linha de pensamento pode afirmar-se com toda a certeza que a inflamação se encontra associada aos mecanismos patológicos da DA, no entanto, não se sabe se esta inflamação é a causa ou um fenómeno secundário no percurso desta neurodegeneração crónica. Existem evidências claras da activação de vias inflamatórias importantes na fisiopatologia da doença, uma vez que o uso prolongado de anti-inflamatórios está associado a um menor risco de

desenvolvimento da patologia (Wyss-Coray and Rogers, 2012). Estes factores inflamatórios, como a Interleucina-1 β (IL-1 β), produzidos no decorrer da DA podem regular determinados factores de transcrição, o que indica que podem existir alterações da expressão génica em doenças do sistema nervoso central (Citron *et al.*, 2008).

5 - Imunologia da DA ao nível do Sistema Nervoso Central

O cérebro foi considerado durante muito tempo como um órgão imunologicamente privilegiado devido à existência de uma barreira hematoencefálica constituída por um sistema de *tight junctions*, entre os capilares do sistema nervoso central, que impede a entrada de células inflamatórias, agentes patogénicos e algumas macromoléculas para o espaço subaracnóide (Larochelle *et al.*, 2011).

Actualmente já é referida a existência de um sistema imune endógeno coordenado por células imunocompetentes, como a microglia, que apresenta um processo inflamatório distinto daquele que é encontrado à periferia, até porque o facto de o cérebro não conter fibras de dor torna difícil o reconhecimento da ocorrência de inflamação e dos seus sinais clássicos como o rubor, o edema, o calor e a dor (Finsen and Owens, 2011).

Este processo inflamatório a nível central pode estar envolvido na patogénese da DA. Tem sido sugerido que as protofibrilhas de β A activam a microglia iniciando uma resposta inflamatória com libertação de neurotoxinas e citocinas neurotóxicas. Esta resposta inflamatória associada à presença de placas senis é considerada secundária à acumulação de β A e pode estar envolvida no dano neuronal e na progressão da doença. A microglia activada e os astrócitos reactivos circundam depósitos extracelulares de proteína β -amilóide, iniciam uma resposta inflamatória caracterizada por uma resposta aguda local mediada por citocinas inflamatórias que activam a cascata do complemento com consequente dano celular (Johnston *et al.*, 2011).

5.1 – Microglia

Em condições patológicas, como é o caso das doenças neurodegenerativas, a microglia torna-se activa, circunda as células lesadas e remove os restos celulares, tal como os macrófagos do sistema imune periférico (Johnston *et al.*, 2011). A microglia activada sobrerregula uma variedade de receptores à superfície incluindo o CMH e receptores do complemento e sofre modificações morfológicas apresentando uma maior ramificação. Quando estimulada em doenças neurodegenerativas a microglia liberta uma série de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, ROS, factores do complemento, produtos neurotóxicos, radicais livres, óxido nítrico (NO) que em conjunto contribuem para a disfunção e morte celular, criando um círculo vicioso (Figura 5) (Block *et al.*, 2007).

Peptídeos amilóides e o seu precursor são potenciais activadores da microglia, de forma que a deleção do gene que codifica o APP leva a uma diminuição da activação da microglia. A β A tem a capacidade de estimular a via dependente de NF κ B (Factor Nuclear Kappa B) que é necessária para a produção de citocinas. A subsequente activação das vias ERK (Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares) e MAPK (Proteína Cinase Activada por Mitogénios), também pela ligação de β A à superfície celular da microglia, induz a expressão de genes pró-inflamatórios ligados à produção de citocinas e quimiocinas. A β A pode ainda ligar-se ao receptor do factor estimulador de colónias macrófagico (M-CSF) levando à emissão de sinais de activação celular que induzem quimiotaxia da microglia, proliferação e aumento da expressão deste mesmo receptor reforçando a sobrevivência celular. Para além disso a β A induz os macrófagos da circulação periférica a atravessar a barreira hematoencefálica devido ao recrutamento quimiotáctico levando a um aumento do processo inflamatório (Koistinaho *et al.*, 2011).

Existe uma enorme controvérsia que circunda o papel da microglia neste tipo de doenças, tendo-se verificado em alguns casos que a microglia tem um papel benéfico, uma vez que a sua activação pode reduzir a acumulação de β A devido à sua acção fagocitária e secretar uma série de factores solúveis tais como o factor neurotrófico derivado da glia (GDNF) o qual é potencialmente benéfico para a sobrevivência dos neurónios (Neher *et al.*, 2012).

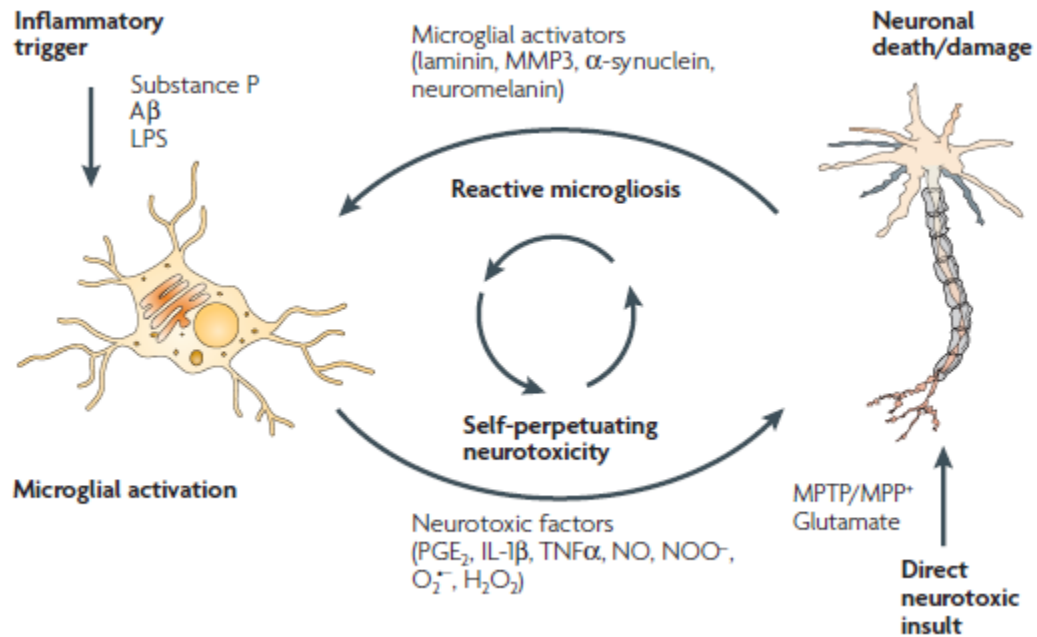


Figura 5 - Neurotoxicidade com interação entre células da microglia e o neurónio. Adaptado de Block *et al.*, *Nat Rev Neurosci* 2007.

5.2 – Astrócitos

O papel dos astrócitos no processo inflamatório da DA não é tão claro como o da microglia, no entanto, ganham ênfase devido à possível capacidade de degradação e depuração de β A, ao facto de fornecerem um suporte trófico aos neurónios e por formarem uma barreira protectora entre os depósitos de β A e os neurónios. A presença de um elevado número de astrócitos associados a depósitos de β A na DA sugere que as lesões causadas por essas placas levem à formação de moléculas quimiotácticas que medeiam o recrutamento de astrócitos. Esses astrócitos no córtex entorrinal de doentes com DA acumulam de forma gradual β A₄₂. Tem sido demonstrado que estas células secretam várias moléculas pró-inflamatórias como interleucinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulação, factores do complemento, proteases e inibidores de proteases que são similares e se podem sobrepor aos libertados pela microglia (Wegrzynowicz *et al.*, 2010). No entanto, tal como no caso da microglia nem sempre os astrócitos são considerados benéficos no decorrer da doença e o seu recrutamento para junto das placas de β A pode prolongar a inflamação e contribuir para a neurotoxicidade mediada por NO por expressarem a síntetase do óxido nítrico (iNOS) (Li *et al.*, 2010).

Segundo *Rossner et al., 2005*, os próprios astrócitos podem ser uma fonte de β A devido ao facto de aumentarem a produção de β -secretase (BACE1) que é uma enzima essencial para a formação de β A.

5.3 - Citocinas

De uma forma geral, parece ocorrer um aumento de citocinas e quimiocinas na DA, nomeadamente de IL-1 β , Interleucina-6 (IL-6), Factor de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina-8 (IL-8), Factor Transformante do Crescimento- β (TGF- β) e Proteína Inflamatória Macrofágica 1 α (MIP-1 α) (*Sastre et al., 2006*). Para além disso, tem sido descrita uma associação entre DA e polimorfismos em vários genes de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente para a IL-1, a IL-6, o TNF- α e a α 1-antiquimiotripsina, uma proteína de fase aguda (*Tuppo and Arias, 2005*). A produção de interleucinas e quimiocinas pode estar ligada à activação da microglia, à astrogliose e levar a uma maior secreção de moléculas pró-inflamatórias e de amiloide, o que origina um ciclo vicioso. Desta forma, as citocinas podem afectar a formação de β A por aumentar a susceptibilidade para a deposição e agregação de β A, por terem a capacidade de transcricionalmente sobreexpressar a BACE1 e por elevarem os níveis de mRNA (RNA mensageiro) do APP (*Blasko et al., 2004*).

5.4 - Neurónios

Os neurónios, por si só, parecem ter um papel inflamatório no decorrer da DA e têm sido implicados na produção de componentes inflamatórios nomeadamente citocinas e aumento da expressão de níveis de proteínas do complemento, pentraxinas, proteína C-reativa e proteína β A. A produção destes componentes pró-inflamatórios pelos neurónios pode aumentar o processo inflamatório e piorar o ambiente celular causando toxicidade e morte neuronal (*Britschgi and Wyss-Coray, 2007*).

6 - Resposta Imune e Inflamação Crónica

O sistema imune é dividido em inato e adquirido. A imunidade inata tem como característica principal uma inespecificidade da resposta imune e ocorre essencialmente pela digestão de microorganismos e substâncias estranhas ao organismo sendo os macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e neutrófilos as principais células envolvidas. A imunidade adquirida é mediada por células B e T, sendo caracterizada por uma especificidade da resposta imune e formação de memória, a qual permite uma resposta mais rápida num segundo contacto com o antígeno (Akira *et al.*, 2001).

Para que se inicie uma resposta imune é necessário que ocorra um comprometimento das barreiras de defesa primárias (pele, mucosas). Desta forma o agente patogénico tem entrada no organismo e receptores PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) presentes nas células do sistema imune inato, tais como TLRs (*Toll like receptors*) reconhecem pequenas sequências moleculares designadas de PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*). As vias de sinalização activadas através destes receptores activam o processo inflamatório. No entanto, estes receptores não são a única forma que o sistema imune tem de reconhecer microorganismos patogénicos (Takeda and Akira, 2001). O sistema do complemento e os receptores especializados das células *Natural Killer* (NK) são dois mecanismos que participam no reconhecimento e distinção daquilo que é ou não próprio (Hall *et al.*, 2010). Inicia-se, assim, um processo de inflamação aguda no qual ocorre recrutamento de leucócitos. Inicialmente são recrutados granulócitos polimorfonucleares e depois monócitos, os quais se diferenciam em macrófagos no local da inflamação. Neste processo ocorre desgranulação, libertação de uma série de factores inflamatórios e libertação de citocinas pró-inflamatórias. Todo este processo leva ao recrutamento de mais células para o local da inflamação (Medzhitov and Janeway, 1997).

A ligação entre imunidade inata e imunidade adquirida é efectuado pelas células dendríticas, as quais captam o antígeno e o levam até aos órgãos linfóides secundários onde podem despoletar respostas imunes antígeno-específicas. A migração e maturação destas células é dependente de moléculas do CMH I e II, de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e da produção de citocinas. Todas estas moléculas permitem uma óptima interacção entre as células dendríticas e as células T auxiliares (Th) *naive* e T citotóxicas. As células Th *naive* são estimuladas por células APC e consequentemente

diferenciam-se em duas subpopulações de células Th: células Th tipo 1 (Th₁) e células Th tipo 2 (Th₂). As células Th₁ secretam interferão-gama (IFN- γ) e promovem uma resposta imune mediada por células enquanto que as células Th₂ secretam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), promovendo uma resposta essencialmente humoral, isto é através da produção de anticorpos pelas células B. Um desequilíbrio entre as células Th₁/Th₂ está envolvido no desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo doenças auto-imunes e doenças alérgicas (Akira *et al.*, 2001).

Para além dos TLRs, a interacção entre células dendríticas e as células NK, também é essencial para o início da resposta imune adaptativa. As células NK expressam à sua superfície receptores capazes de distinguir proteínas de superfície próprias das não-próprias e a sua principal função é detectar células infectadas por agentes patogénicos intracelulares. As células NK também podem ser activadas directamente pelas células dendríticas ou por moléculas de superfície e indirectamente através de citocinas. Quando estas células estão activas libertam IFN- γ que leva à maturação das células dendríticas e activam a resposta imune por parte das células T (Hoebe *et al.*, 2004).

A interacção entre imunidade inata e adquirida não se fica por aqui. Desta forma, o sistema do complemento também pode levar à activação das células B e T. O sistema do complemento é constituído por um grupo de proteínas plasmáticas cuja principal função é reconhecer e eliminar microorganismos. A activação deste sistema pode ser efectuada pela via clássica (quando o “alvo” se encontra opsonizado por anticorpos); pela via da lectina (estruturas polissacarídeas de reconhecimento de microorganismos) ou pela via alternativa (estruturas de reconhecimento de superfícies estranhas ainda não identificadas). O complemento participa na imunidade humoral através da ligação do factor C3 às moléculas expressas à superfície das células B e células dendríticas (receptor CD21-CD35), o que resulta na regulação de respostas mediadas por células B a diferentes níveis (Blasko *et al.*, 2004).

Em condições normais a inflamação aguda é limitada e após alguns dias encontra-se resolvida com eliminação do antigénio e com formação de células B e T de memória, capazes de efectuar uma resposta imune bastante mais rápida e eficaz num segundo contacto com o mesmo antigénio (Medzhitov and Janeway, 1997).

Enquanto os mediadores e mecanismos de sinalização que iniciam e promovem a resposta inflamatória são bem conhecidos, pouco se sabe acerca dos mecanismos de

resolução da inflamação. Já foram identificados vários mediadores anti-inflamatórios, nomeadamente citocinas (IL-10 e TGF- β), mediadores lipídicos (lipoxinas e prostaglandinas) e também receptores anti-inflamatórios em células do sistema imune (CD200 em macrófagos).

O problema surge quando não há um equilíbrio entre os sistemas pró e anti-inflamatório. Numa inflamação crónica não ocorre resolução da inflamação, permanecendo os mecanismos pró-inflamatórios e as células do sistema imune constantemente activos. As doenças auto-imunes tais como a artrite reumatóide (AR) e o lúpus eritematoso sistémico (LES) são exemplos de uma inflamação crónica e constituem um dos grandes mistérios da imunobiologia. Assim uma inflamação crónica caracteriza-se por uma falha do sistema anti-inflamatório endógeno o que leva à persistência da inflamação e de alguma forma está ligado à auto-imunidade (Figura 6)(Karin *et al.*, 2006).

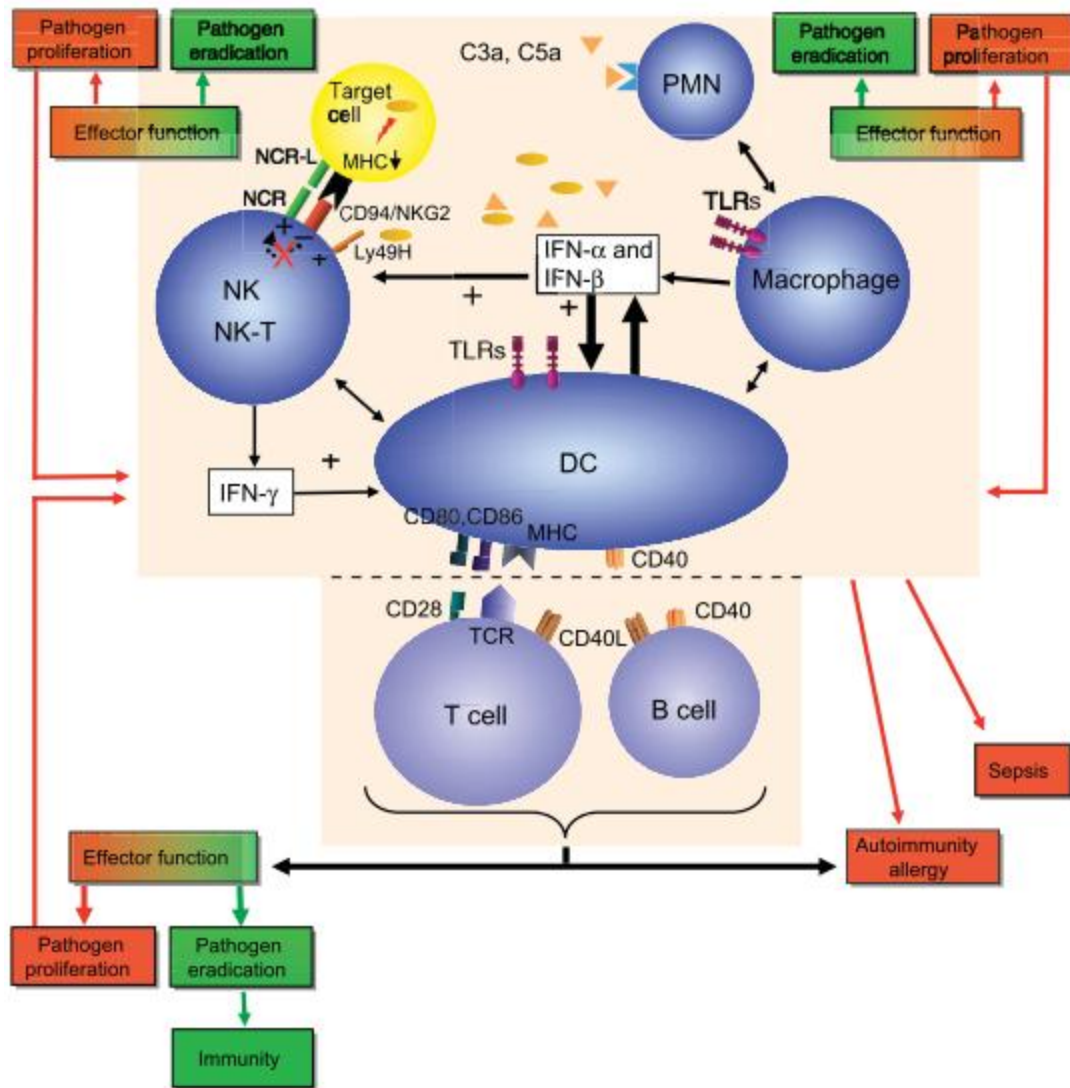


Figura 6 – A interface entre a imunidade inata e adquirida e as consequências do sucesso ou da falha da resposta imune. Uma comunicação eficaz entre a resposta imune inata e a resposta imune adquirida leva a uma erradicação do agente patogénico e imunidade do hospedeiro (assinalado a verde). A falha de uma eficiente discriminação entre o próprio e o não-próprio por parte do sistema imune inato e adaptativo leva a uma proliferação do agente patogénico e em último caso pode ocorrer sépsis (representado a vermelho). Esta falha está também associada ao desenvolvimento de doenças auto-ímmunes e alergias (assinalado a vermelho). Legenda: [DC] – célula dendrítica; [CD40L] – Ligando do CD40; [INF] – Interferão; [MHC] – complexo Major de Histocompatibilidade; [PMN] – células Polimorfonucleares, [TCR] – Receptor das células T; [NCR] – Receptor Natural de Citotoxicidade; [NCR-L] – Ligando do Receptor Natural de Citotoxicidade. Adaptado de Hoebe et al., 2004, Nature Immunology.

7 – Imunologia da DA ao nível do Sistema Imune Periférico

A complexidade do sistema imune associada à complexidade do SNC fez com que, durante muitos anos poucos se aventurassem no estudo da possível conexão entre estes dois sistemas, em parte devido à ideia de que o sistema nervoso central seria um órgão imunologicamente privilegiado. O reconhecimento de um sistema imune endógeno cerebral constituído por células imunocompetentes produtoras de citocinas abriu uma nova perspectiva acerca da comunicação entre estes dois sistemas, existindo evidências de uma correlação entre a função imune periférica e a DA (Mrak and Griffin, 2005). Assim, para além da produção local de moléculas imunes, existem evidências de que o SNC é acessível a uma pequena percentagem de linfócitos e monócitos (Britschgi and Wyss-Coray, 2007). Na mesma ordem de ideias, alguns estudos demonstram que uma resposta neuroinflamatória envolve células do sistema imune periférico (macrófagos, linfócitos T, B e células dendríticas), células residentes do SNC (microglia, astrócitos e neurónios) moléculas proteicas (moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e factores do complemento) e substâncias citotóxicas (ROS e RNS) (Reale *et al.*, 2009).

A DA é caracterizada pela formação de emaranhados neurofibrilares e acumulação de proteína β A, fenómenos que desencadeiam uma resposta inflamatória. O sistema imune tem como principal objectivo eliminar o organismo estranho que desencadeia essa resposta. Já foi demonstrado que para além de a microglia exercer as capacidades fagocíticas que lhe são reconhecidas existe também migração dos monócitos derivados do sangue periférico, os quais circundam a proteína β A e procedem à sua remoção. Para além disso, estas células podem servir como suporte de factores tróficos aos neurónios e astrócitos, os quais limitam a acumulação de proteína β A (Figura 7) (Britschgi and Wyss-Coray, 2007).

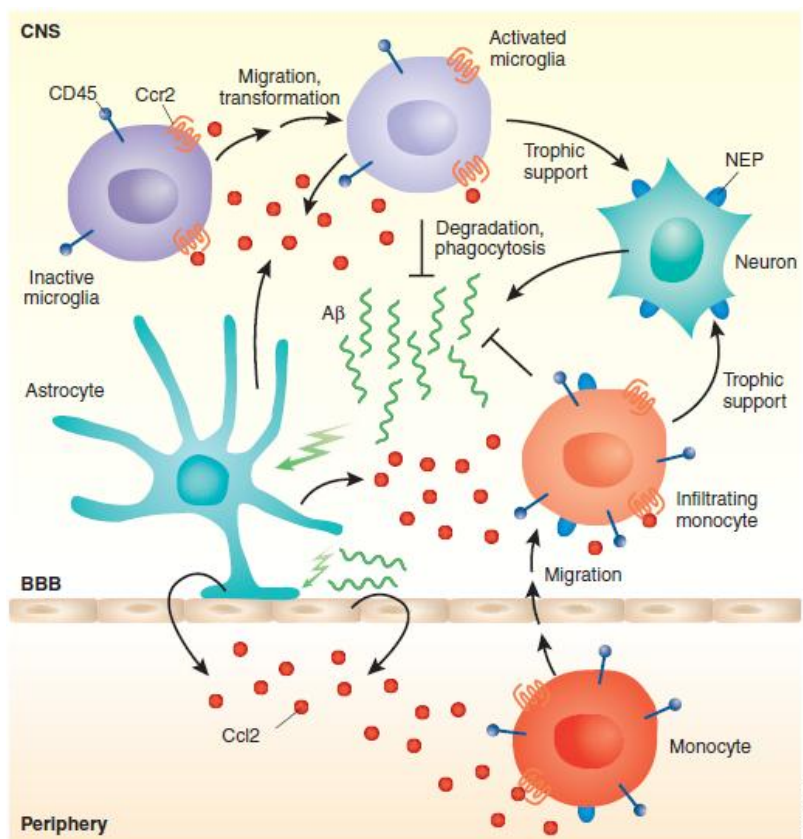


Figura 7 – As células da microglia e os monócitos tentam retardar a DA, agregando a proteína β A no SNC, sendo o seu recrutamento mediado por receptores do ligando 2 de quimiocinas CC (Ccr2). Estas células podem também servir como suporte neurotrófico a neurónios e astrócitos. Adaptado de Britschgi et al, 2007. *Nature Publishing Group*.

Um sinal evidente da existência de inflamação crónica sistémica é a produção massiva de citocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares do sangue periférico, que podem contribuir para alterar a resposta imune e exacerbar a neurodegeneração. Na DA são produzidas citocinas como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 a nível central, que também podem ser encontradas a nível periférico aquando da passagem pela barreira hematoencefálica ou aquando da própria produção pelas células do sangue periférico. Estas células periféricas também têm sido apontadas como produtoras da quimiocina RANTES (regulada sob activação, expressa e secretada por células T normais) a qual pode ter um efeito neuroprotector e no aumento da sobrevivência celular (Couturier *et al.*, 2012). Porém, a produção de citocinas não se apresenta como o único sinal inflamatório na DA, na qual ocorre também alteração do perfil linfocitário normal. (Mrak and Griffin, 2005). Apesar de não existir um consenso acerca das verdadeiras alterações celulares que ocorrem a nível periférico, parece existir uma

diminuição do número de linfócitos T, bem como uma diminuição da proliferação das células mononucleares sanguíneas. Estas alterações têm sido ligadas aos processos patológicos que ocorrem na DA, tendo sido demonstrado que a proliferação linfocitária é estimulada pelo precursor da proteína amilóide e que os leucócitos podem expressar mRNA para APP e para a proteína β A sendo a expressão destes componentes activada por mecanismos de sinalização (Fiala and Veerhuis, 2010). Os níveis de mRNA e de APP das células mononucleares e de linfócitos do sangue periférico têm sido encontrados elevados em doentes de Alzheimer. Alterações funcionais na produção de APP e no processamento de células imunes periféricas reflectem uma desregulação do metabolismo do APP no cérebro. O facto de estas alterações serem reportadas não só na DA mas também em indivíduos com défices cognitivos ligeiros ou moderados pode ser um dado importante para definir biomarcadores precoces (Magaki *et al.*, 2008).

Na tentativa de se encontrar uma estratégia terapêutica eficaz no combate da doença tem-se verificado que após imunização com o péptido β A existe um aumento do número de anticorpos contra β A₁₋₄₂ e uma pequena parte desses anticorpos atravessam a barreira hematoencefálica opsonizando a β A e promovendo a sua fagocitose mediada por células da microglia, conduzindo à eliminação das placas de β A (Janus, 2003). Para além do envolvimento das células B através da produção de anticorpos, também tem sido reportado uma expansão das células T após imunização com β A₁₋₄₂. Como as células Th₂ são mais eficientes que as células Th₁ a estimular as células B a produzirem anticorpos supõe-se que haja uma resposta mediada essencialmente por células Th₂ após imunização (Town *et al.*, 2002).

Outros estudos apontam para que a resposta imune a nível do SNC possa estar envolvida na transição de défices cognitivos ligeiros para o estado de demência que se atinge na DA. O facto é que foi demonstrado que as moléculas inflamatórias, na sua maioria pertencentes ao CMH II e marcadoras da activação da microglia, estão aumentadas em doentes na fase inicial da DA, sendo uma das consequências do aumento destas moléculas CMH II, uma maior apresentação de antígenos às células T, induzindo uma resposta imune adaptativa. É sugerida uma disfunção nesta resposta imune nos estados iniciais da doença que pode contribuir para o declínio cognitivo (Parachikova *et al.*, 2007).

Apesar da DA ser associada a uma resposta imune inata, a indução de uma resposta imune sistémica adaptativa encontrada em modelos animais de DA tem sido considerada benéfica a nível de alterações neuropatológicas e comportamentais. No

entanto, ensaios clínicos em humanos, nos quais foi usado o péptido βA_{1-42} levaram a que 5 a 6% dos pacientes tratados com este péptido desenvolvessem meningoencefalite. A causa desta reacção é desconhecida mas uma reacção imune à βA apresenta-se como a principal hipótese (Lemere *et al.*, 2007). Células T auto-reactivas com uma menor ou maior afinidade de ligação não são necessariamente eliminadas no timo e podem mediar doenças auto-imunes. Sabe-se, também, que células T activadas podem penetrar no SNC. Sendo o antigénio βA progressivamente depositado no SNC com o avanço da idade na DA, há autores que sugerem que pode ocorrer um aumento ou diminuição da reactividade das células T à βA (também com o aumento da idade) em função do peptídeo ser tolerogénico ou imunogénico (Monsonogo *et al.*, 2003).

OBJECTIVOS

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva cujo início ocorre muito antes do aparecimento de qualquer sintoma, o que dificulta um diagnóstico precoce capaz de retardar a progressão da doença. Doentes com défice cognitivo ligeiro (DCL) apresentam um risco aumentado de desenvolver a doença. Desta forma a detecção de biomarcadores no sangue periférico, para além de tornar menos complexo o diagnóstico actual, poderia servir de auxílio para um diagnóstico precoce. O sangue periférico constitui o material biológico que mais facilmente se obtém. Desta forma pretendeu-se com este estudo:

1º - Caracterizar fenotipicamente as subpopulações das células imunes periféricas (linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares e células NK) em três grupos diferentes: grupo controlo, grupo de doentes com DCL e grupo de doentes em estágio inicial a moderado de DA.

2º - Avaliar a presença de quimiocinas inflamatórias no soro de indivíduos dos 3 grupos em estudo.

3º - Encontrar possíveis biomarcadores no sangue periférico característicos de indivíduos com DCL e/ou DA.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL E METEDOLOGIAS

1 - Grupos em Estudo

Sendo um dos objectivos deste estudo a detecção precoce de biomarcadores para a doença de Alzheimer, foram constituídos três grupos de estudo. Um grupo de indivíduos com DCL cuja caracterização foi efectuada segundo os critérios de Petersen (Petersen criteria, 2001), um segundo grupo de indivíduos diagnosticados com DA, de acordo com a classificação NINCDS-ADRDA (Mckhann, 1984) em estadios inicial ou moderado (Critério/CDR=1 ou 2; Rosen, 1984) e, por último, um grupo controlo, no qual todos os indivíduos efectuaram os testes neurológicos igualmente realizados aos doentes, de forma a excluir qualquer tipo de demência. O grupo controlo apresenta uma média de idades semelhante aos grupos de estudo. Não foram incluídos indivíduos com diabetes, inflamações crónicas, doenças neoplásicas ou sujeitos a medicação/tratamento que pudessem alterar as variáveis deste estudo. A recolha das amostras efectuou-se nos Hospitais da Universidade de Coimbra sob a coordenação da equipa do serviço de neurologia. O número de indivíduos em cada grupo variou em função do ensaio realizado. Para a análise fenotípica por citometria de fluxo foram usadas amostras de 10 indivíduos controlo com uma média de idades de 75 anos (5 indivíduos do sexo feminino e 5 do sexo masculino), 10 indivíduos com DCL (6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino) com uma média de idades de 77 anos e 10 indivíduos com DA (6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino) com uma média de idades de 71,5 anos. Para a análise das citocinas do soro foram analisados 18 indivíduos do grupo controlo (10 do sexo feminino e 8 do sexo masculino), 27 indivíduos do grupo com DCL (15 do sexo feminino e 12 do sexo masculino) e 21 indivíduos do grupo de doentes de Alzheimer (14 do sexo feminino e 7 do sexo masculino).

2 - Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de analisar múltiplos parâmetros de células individuais dentro de uma população heterogénea. Esta análise é efectuada através da passagem de milhares de células por segundo por um feixe de luz onde a luz emitida por cada célula é capturada. Os dados recolhidos podem ser analisados por um *software* apropriado de forma a determinar as diferentes características celulares, tais como tamanho, complexidade e fenótipo. O fenótipo das células é definido em função

das moléculas de superfície celular que apresentam. Cada molécula é definida por um CD que apresenta à sua superfície. Essas moléculas expressas à superfície podem indicar linhagens celulares, definindo o tipo de célula em análise ou podem ser indicativas de activação celular, adesão, *homing*, memória ou outros estádios de diferenciação celular.

Recorrendo a esta técnica foi possível fenotipar as populações linfocitárias do sangue periférico. Assim para além destas populações serem identificadas também é possível determinar se estão activas através de marcadores de activação; se estão a produzir citocinas intracelulares; se expressam à sua superfície moléculas de *homing* ou de adesão e para além disso é possível determinar as percentagens das subpopulações linfocitárias.

Com o objectivo de fenotipar as células do sistema imune periférico de indivíduos diagnosticados com DA, de doentes com DCL e de indivíduos de um grupo controlo, foram recolhidos 10 mL de sangue total a cada indivíduo aos quais foi adicionado, numa proporção de 1mL para 100 μ L de sangue total, um tampão de lise de glóbulos vermelhos constituído por: NH_4Cl (0.15M); KHCO_3 (10 mM) e EDTA (0.1mM). Seguiu-se uma lavagem com um tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline* – PBS) com 0.5% albumina bovina sérica (BSA) (AppliChem® - Darmstadt, Alemanha) cuja constituição apresentava NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) e KH_2PO_4 (2.0 mM) a pH 7.4 e a ressuspensão das células polimorfonucleares nesse mesmo tampão. Foram preparadas misturas de anticorpos (Tabela I) em função da análise fenotípica que se pretendeu efectuar, numa proporção de 2 μ L de anticorpo por 100 μ L de mistura. 100 μ L de células foram incubadas com 50 μ L de mistura de anticorpos (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e eBioscience, San Diego, Califórnia) durante um período de 45 minutos à temperatura ambiente e com protecção da luz. Seguiu-se a adição de 250 μ L de formalina e uma lavagem com PBS 0.5% BSA. As amostras às quais se efectuou apenas marcação extracelular foram ressuspendidas em 200 μ L de PBS 0.5% BSA ficando preparadas para a leitura no citómetro BD FACSCanto II (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). As amostras que necessitaram de marcação intracelular foram incubadas durante a noite com 2 μ L de anticorpo (Tabela I) e 200 μ L de tampão de permeabilização constituído por 1% saponina (AppliChem® - Darmstadt, Alemanha) e 1% BSA. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS 0.5% BSA e ressuspendidas em 200 μ L desta mesma solução efectuando-se a leitura no mesmo citómetro.

Todos os resultados obtidos no citómetro foram analisados recorrendo ao *software* FlowJo versão 7.6.5. (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, EUA)

Tabela I – Misturas de anticorpos usadas na análise por citometria de fluxo. A tabela mostra os anticorpos (Biolegend, San Diego, Califórnia) correspondentes a cada mistura e os respectivos fluorocromos. Os anticorpos assinalados com um * correspondem aos anticorpos intracelulares adicionados após o permeabilizante.

Mistura	Fluorocromos						
	Pacific Blue	FITC	PE	PercepCy 5.5	PECy7	APC	APCCy7
B₁	IgM	IgD	CD27	IL-6R	CD69	CD38	CD19
B₂	IgM	TGF-β*	CD1d	IgD	CD27	IL-10*	CD19
B₃	IgM	CD40	BAFF-R	IgD	CD27	CD95	CD19
B₄	IgM	CXCR3	CXCR4	IgD	CD27	CCR1	CD19
NK₁		CD56	CD244	CD16	IFN-γ*	CD107a	CD3
NK₂		GranzB*	CRACC	CD16	CD56	CD62L	CD3
CD4₁	CD3	CD25	FOXP3*	CTLA-4	CD45RA	CD28	CD4
CD4₂	CD3	IL-17A*	IL-4*	CTLA-4	IFN-γ*	CD28	CD4
CD8₁	CD3	CD62L	GranzB*	CTLA-4	CD27	CD28	CD8
CD8₂	CD3	CD62L	IL-10*	CTLA-4	IFN-γ*	CD28	CD8
Monócitos	CD11b	TNF-α*	IL-4*	CD16	IFN-γ*	CD68*	CD14

3 - Ensaio de Citometria com esferas

A técnica de citometria utilizando esferas foi usada para a detecção de quimiocinas no soro. Para tal utilizou-se o *kit Human Chemokine 6plex FlowCytomix* (eBioscience, San Diego, CA), o qual contém esferas revestidas com anticorpos específicos para reagirem com as quimiocinas a detectar pelo sistema *multiplex*. As esferas podem ser diferenciadas em função do seu tamanho e localização no espectro. Neste caso, o uso do kit em questão permite detectar seis quimiocinas diferentes em soros humanos: G-CSF (Factor estimulador de colónias granulocíticas); IL-8; MCP-1 (Proteína quimiotáctica de monócitos-1); MIG (Monocina induzida pelo interferão-gama); MIP-1α e MIP-1β (Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 beta). Após efectuado todo o protocolo de acordo com as instruções do *kit*, a leitura das amostras foi feita num citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA).

A análise foi efectuada recorrendo ao *software* FlowJo versão 7.6.5. (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, EUA).

4 - Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o *software* GraphPad Prism, Versão 5.0, sendo apresentados sob a forma de valor médio \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de experiências (n) indicado.

Nas amostras obtidas por citometria de fluxo a normalidade das amostras foi testada através do teste Shapiro-Wilk. Quando se verificava a normalidade da distribuição, a comparação entre os grupos foi realizada recorrendo à análise da variância ANOVA e para este usou-se o teste *post-hoc* Bonferroni. Quando não existiu uma distribuição normal foi efectuado o teste de Kruskal-Wallis e o teste *post-hoc* Dunns. Os resultados com os valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS

1 - Análise por citometria de Fluxo

O primeiro passo da análise dos dados de citometria de fluxo foi determinar a população de linfócitos recorrendo a um gráfico de dispersão do tamanho vs complexidade (Figura 8). Dentro da população de linfócitos, e em função das moléculas de superfície celular (definidas por um CD específico) é possível determinar o tipo de célula a analisar, isto é, célula B, T ou NK bem como os diferentes estádios de maturação ou activação (subpopulações) de cada um destes tipos de célula (Figura 9)

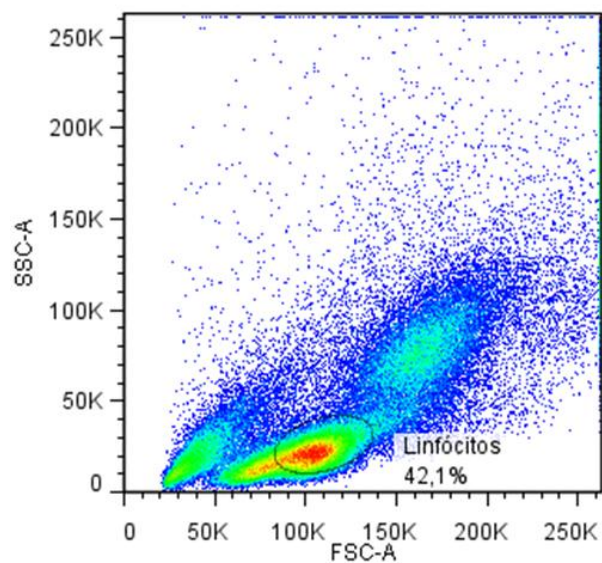


Figura 8 – Gráfico de dispersão tamanho vs complexidade de uma amostra de sangue periférico de um doente com Défice Cognitivo Ligeiro. A população circundada corresponde aos linfócitos. Legenda: [SSC-A] – Side Scatter Complexity; [FSC-A] – Forward scatter Size

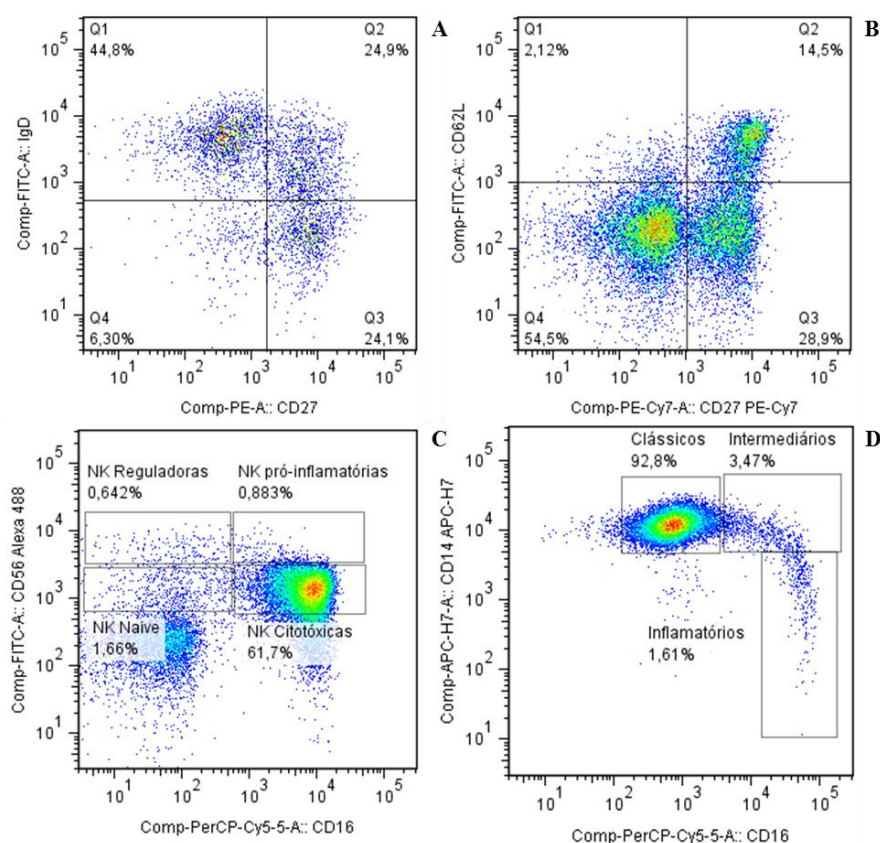


Figura 9 – Subpopulações Celulares de células do sangue periférico definidas com base na expressão de moléculas de superfície [A] – Subpopulações de Células B (CD19+): Q1 – Células B *naive* (CD27-IgD+); Q2 – Células B de memória *unswitch* (CD27+IgD+); Q3 Células B de memória *switched* (CD27+IgD-); Q4 – Células B de memória duplas negativas (CD27-IgD-). [B] – Subpopulações de Células T Citotóxicas (CD3+CD8+): Q1 – Células CD27-CD62L+; Q2 – Células T de memória Central (CD27+CD62L+); Q3 – Células T de memória efectora (CD27+CD62L-); Q4 – Células T efectoras de curta duração (CD27-CD62L-). [C] – Subpopulações de células NK (CD3-CD56+): NK Reguladoras (CD3-CD56^{Elevado}CD16-); NK pró-inflamatórias (CD3-CD56^{Elevado}CD16+); NK Citotóxicas (CD3-CD56^{Baixo}CD16+) e NK Naive (CD3-CD56^{Baixo}CD16-). [D] – Subpopulações de Monócitos (CD11b+): Monócitos Clássicos (CD14+CD16^{Baixo}); Monócitos Intermediários (CD14+CD16^{Elevado}); Monócitos Inflamatórios (CD14^{Baixo}CD16^{Elevado}). FITC, PE; PE-Cy7, APC-H7 e PerCPCy5.5 representam fluorocromos.

Foi realizada uma caracterização fenotípica bastante completa das diferentes populações de células do sistema imune periférico. Dentro de cada população procedeu-se também à análise das diferentes subpopulações, da expressão de receptores e da produção de citocinas. Para além destas comparações entre os três grupos de trabalho, também é analisada a quantidade da expressão de determinada citocina ou marcador pela determinação da Intensidade Média de Fluorescência (IMF).

1.1 - Análise de Células B (CD19+)

1.1.1 – Doentes de Alzheimer vs Indivíduos Controlo

Ao compararmos os doentes de Alzheimer com os indivíduos que integram o grupo controlo verificou-se um aumento da subpopulação de linfócitos B CD27+IgD-IgM- nos doentes de Alzheimer. Por outro lado, a subpopulação de linfócitos B CD27+IgD-IgM+ apresenta-se mais elevada no grupo controlo do que no grupo de doentes de Alzheimer (Figura 10).

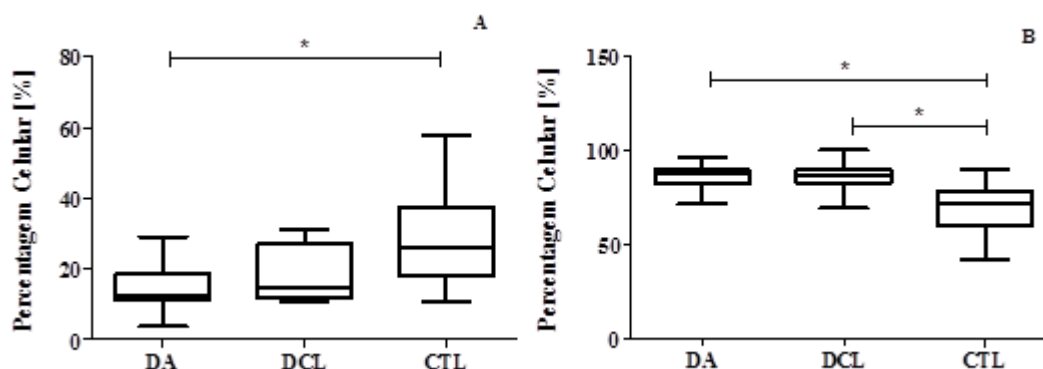


Figura 10 – Diferenças na expressão de IgM em subpopulações de células B. [A] Subpopulação CD27+IgD-IgM+; [B] Subpopulação CD27+IgD-IgM-. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m(n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Como se pode observar na Figura 11, os doentes de Alzheimer apresentam ainda um aumento significativo em relação aos controlos no que diz respeito à percentagem de linfócitos B CD27-IgD+ que estão a produzir IL-10.

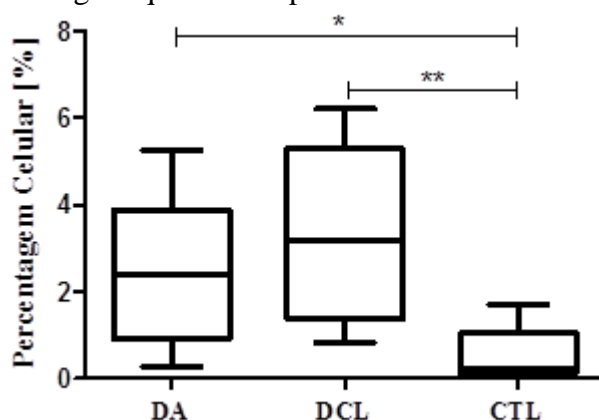


Figura 11 – Percentagem de linfócitos CD27-IgD+IL-10+. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,01$ são representadas por um ou dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Ao analisar a expressão de marcador de activação CD69, da molécula co-estimulatória CD40, do receptor Fas CD95 e do receptor de quimiocinas C-C tipo 1 (CCR1) verifica-se um aumento significativo na percentagem das células que expressam estas moléculas nos doentes de Alzheimer em relação aos indivíduos controlo (Figura 12).

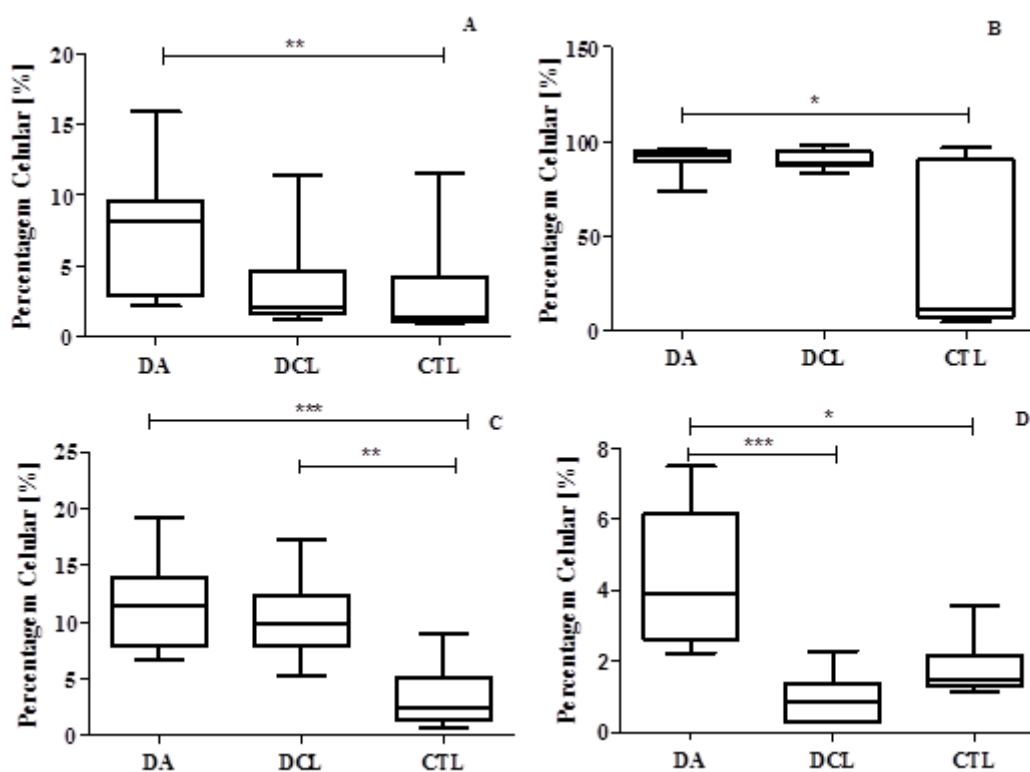


Figura 12 – Os doentes de Alzheimer apresentam uma maior percentagem de células B em circulação expressando receptores de co-estimulação/activação, *homing* e apoptose. [A] Expressão de CD69; [B] Expressão de CD40; [C] – Expressão de CD95 e [D] – Expressão do receptor CCR1. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ são representadas por um, dois e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.1.2 – Indivíduos com Défice Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo

Quando comparamos o grupo de indivíduos com DCL e o grupo de indivíduos controlo, pode observar-se que a IMF do receptor da IL-6 (Figura 13) se encontra significativamente aumentada no grupo controlo em relação aos indivíduos com DCL.

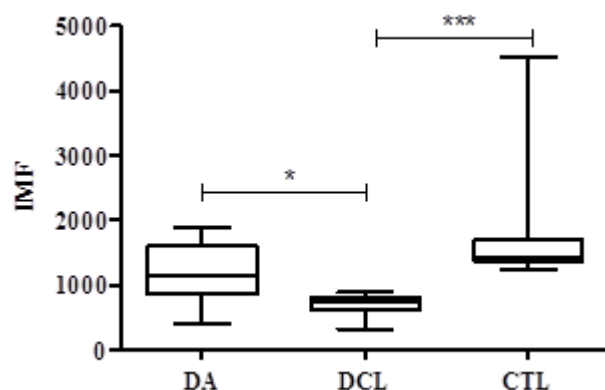


Figura 13 - Diferente expressão de IL6R à superfície da população total de células B entre os diferentes grupos em estudo. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,001$ são representadas por um ou três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

De igual modo, a percentagem de células B totais (Figura 14) que se designam como CD19+ também se encontra aumentada nos indivíduos controlo, quando comparados com os doentes com DCL.

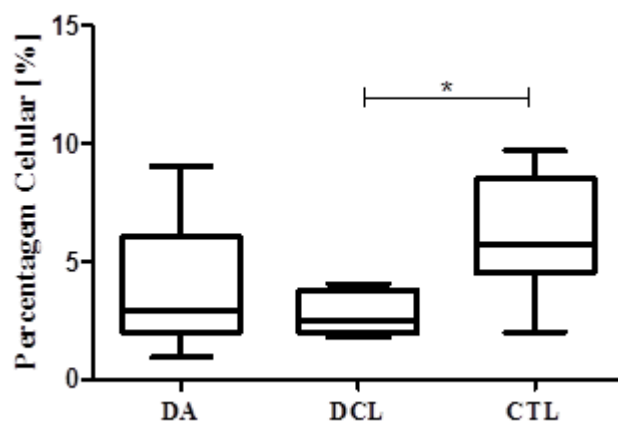


Figura 14 – População Total de Células B. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Tal como acontece no grupo de indivíduos diagnosticados com a doença de Alzheimer, as células com expressão do receptor Fas CD95 (Figura 12 C) estão aumentadas no grupo de indivíduos com DCL quando comparadas com o grupo controlo. Estes indivíduos apresentam ainda um aumento da produção de interleucina-10 (IL-10) Total, ou seja, produzida pelas células B totais (CD19+) (Figura 15).

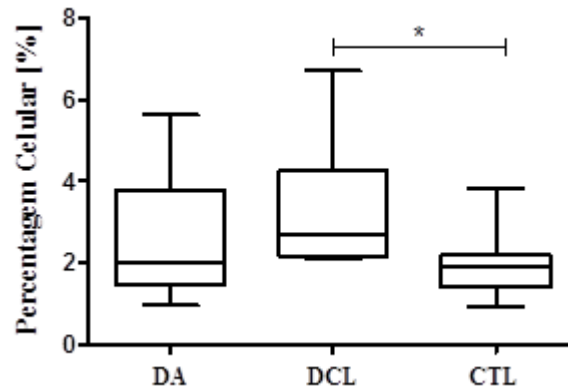


Figura 15 – Células B totais CD19+ que estão a produzir IL-10. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Nos indivíduos com DCL a percentagem de células B a expressar o receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4), o qual tem a capacidade de atrair linfócitos, encontra-se significativamente elevado em comparação com o grupo controlo, tal como se pode observar na Figura 16.

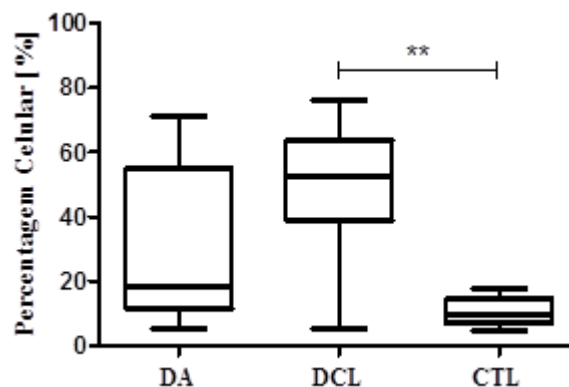


Figura 16 - Expressão do receptor CXCR4 à superfície da população total de células B. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,001$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Os doentes com DCL apresentam também um aumento da percentagem de células que constituem as subpopulações de células B reguladoras e a subpopulação CD27+IgD+ que se encontra a produzir IL-10 (Figura 17).

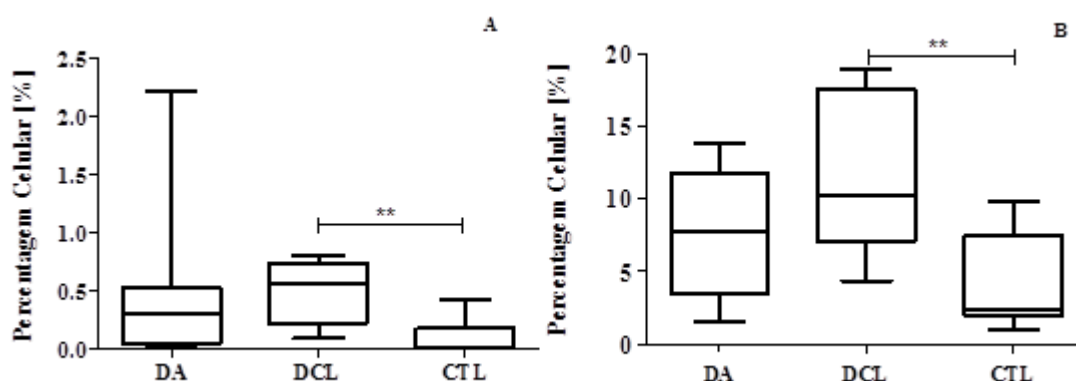


Figura 17 – Aumento de subpopulações de células B em doentes com DCL. [A] Células B reguladoras [B] Percentagem de células CD27+IgD+ a produzir IL-10. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células B e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,001$ são representadas por dois*. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Apesar da subpopulação CD27-IgD+ não se encontrar alterada no que diz respeito à percentagem de células desta subpopulação a produzir IL-10, estas células apresentam uma IMF significativamente mais alta, o que faz com que haja uma expressão mais elevada de IL-10 nesta subpopulação. Por sua vez, a subpopulação CD27+IgD+ apresenta um aumento significativo da percentagem de células a expressar IL-10 em doentes com DCL, o qual é acompanhado por um aumento significativo da IMF, sugerindo uma elevada produção de IL-10 (Figura 18).

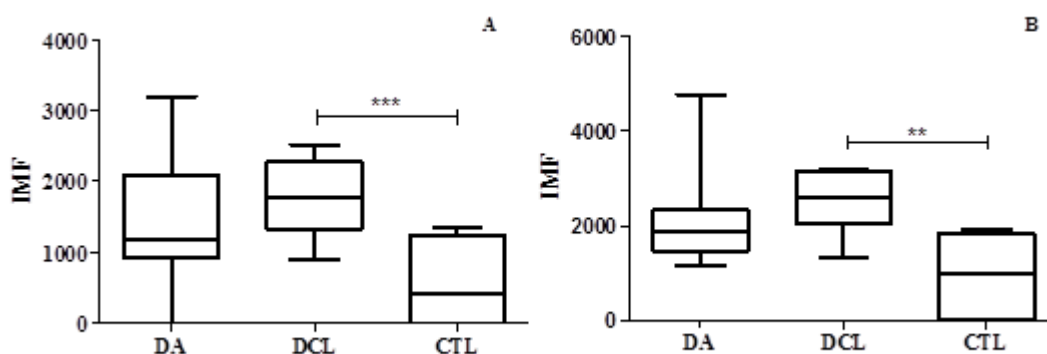


Figura 18 - Produção de IL-10 nas Subpopulações de Células B. [A] IL-10 na Subpopulação CD27-IgD+; [B] IL-10 na Subpopulação CD27+IgD+. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,001$ são representadas por um e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

A produção de TGF- β encontra-se alterada em algumas subpopulações de células B. Assim, há um aumento da percentagem de células produtoras desta citocina nas subpopulações: CD27-IgD+; CD27+IgD- e CD27-IgD- (Figura 19).

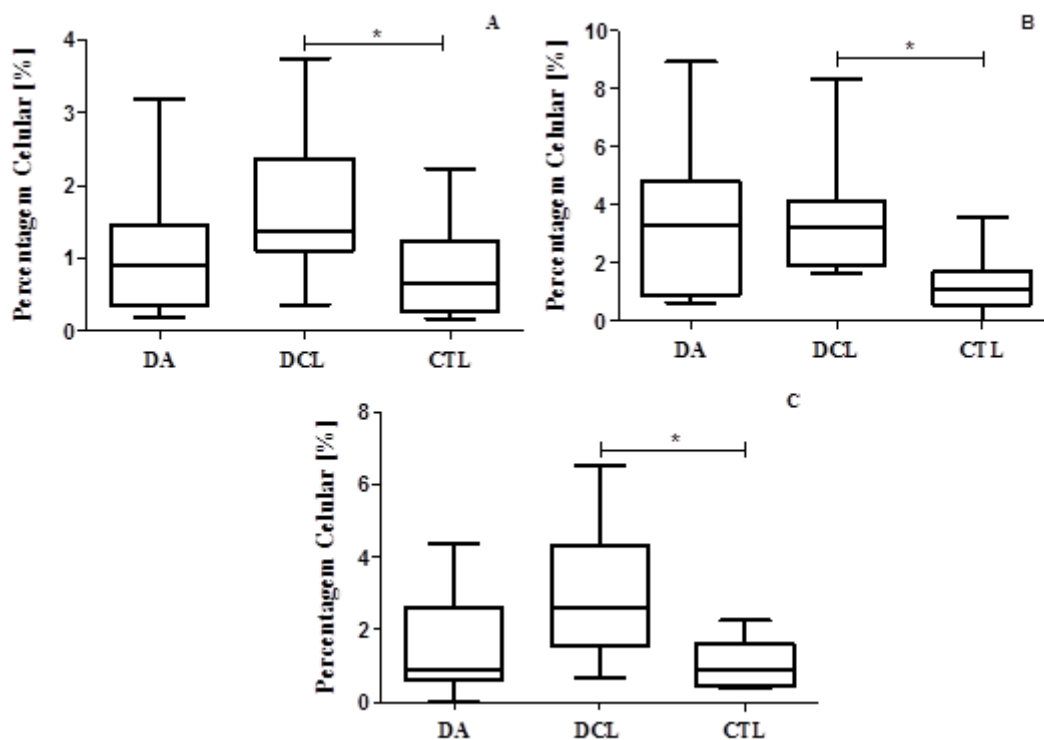


Figura 19 - Produção de TGF- β nas Subpopulações de Células B. [A] TGF- β na Subpopulação CD27-IgD+; [B] TGF- β na Subpopulação CD27+IgD+ e [C] – TGF- β na Subpopulação CD27-IgD-. Os resultados estão expressos em percentagem celular (%) relativa ao total de células B e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.1.2 – Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Défice Cognitivo Ligeiro

As diferenças significativas quando se compara o grupo de indivíduos com doença de Alzheimer e o grupo de indivíduos com DCL não são muitas. No entanto, é possível identificar essas diferenças no aumento da percentagem de células B produtoras de receptor CCR1 (Figura 12 D) e no aumento da IMF do receptor da IL-6 no grupo de doentes de Alzheimer (Figura 13).

1.2 – Análise de Células T Auxiliares (CD3+CD4+)

As diferenças significativas verificadas neste grupo de células ocorreram essencialmente na produção de citocinas.

Verificou-se um aumento significativo na percentagem de células T CD4+ produtoras de IL-4 nos indivíduos com DCL e doença de Alzheimer em relação aos controlos como é demonstrado na Figura 20. Esta citocina normalmente é produzida por células Th₂.

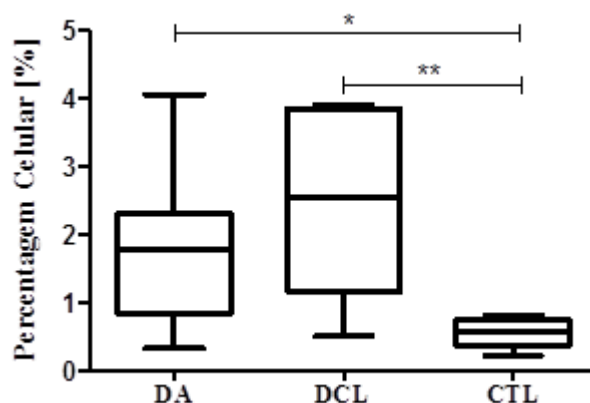


Figura 20 - Percentagem Total de células T auxiliares (CD4+) produtoras de IL-4. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células T CD4+ e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ e $p<0,01$ são representadas por um e dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

A citocina pró-inflamatória interleucina 17-A (IL-17A) também se encontra elevada nas células CD4+ de doentes com DCL quando comparados com os indivíduos controlo (Figura 21).

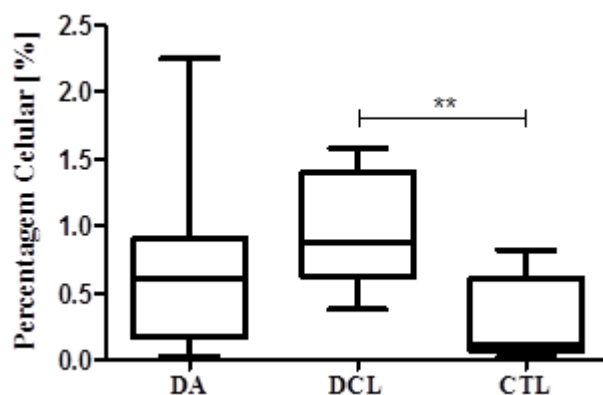


Figura 21 - Total de células T auxiliares (CD4+) produtoras de IL-17A. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células T CD4+ e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Para além do aumento da percentagem de células T CD4+ produtoras de IL-4, também se verificou um aumento significativo na IMF da IL-4 em células T CD4+CD28+ activadas, o qual indica uma maior quantidade de IL-4 produzida nos indivíduos com DCL em comparação com os indivíduos controlo (Figura 22).

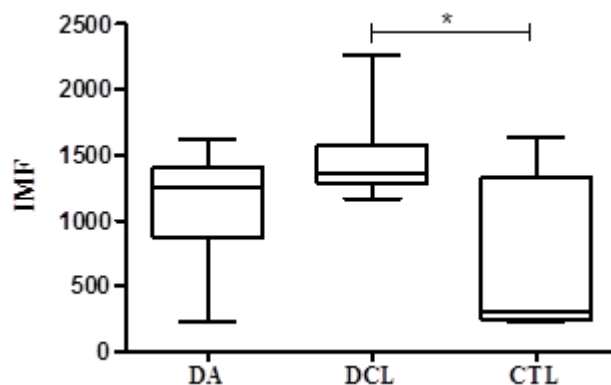


Figura 22 - Produção de IL-4 em células T auxiliares activadas (CD4+CD28+). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.3 – Análise de Células T Citotóxicas (CD3+CD8+)

1.3.1 - Doentes de Alzheimer vs Indivíduos Controlo

As diferenças significativas verificadas nas células T Citotóxicas foram reduzidas. As poucas diferenças consistiram essencialmente na produção da citocina pró-inflamatória IFN- γ por parte das células T efectoras, isto é, células T que expressam à sua superfície a molécula de adesão celular CD62L da família das proteínas selectinas. Observou-se um aumento da percentagem de células T citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L+) a produzir IFN- γ nos doentes de Alzheimer (Figura 23).

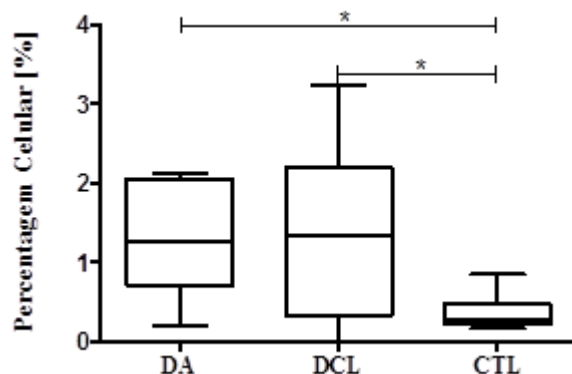


Figura 23 – Percentagem de células T Citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L+) produtoras de IFN- γ . Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células T CD8+ e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Existem ainda alterações ao nível da IMF da IL-10 nas células T CD8+ totais nos doentes de Alzheimer, o que significa que estas células apresentam uma produção de IL-10 significativamente mais baixa que os indivíduos controlo (Figura 24).

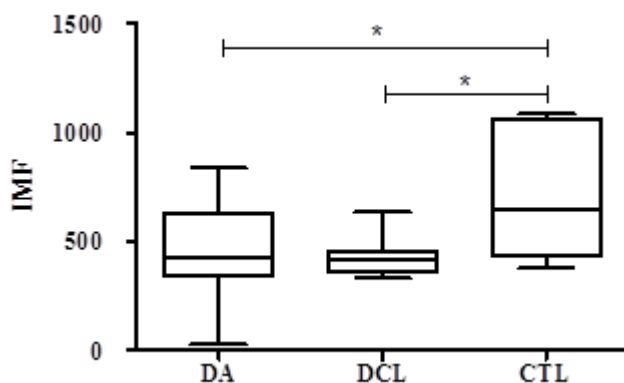


Figura 24 - Produção de IL-10 em células T Citotóxicas Totais (CD8+). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.3.2 - Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo

Os indivíduos com DCL apresentaram diferenças significativas em relação aos controlos no que diz respeito à quantidade da produção de citocinas. Desta forma, apresentaram uma menor IMF da IL-10 produzida pelas células T citotóxicas totais (CD8+) (Figura 24) e uma IMF mais elevada do IFN- γ produzido pelas células T citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L+) (Figura 25). As células CD8+CD62L+ dos doentes com DCL, para além de apresentarem valores de IMF mais elevados também têm uma percentagem mais elevada destas células a produzirem IFN- γ (Figura 23).

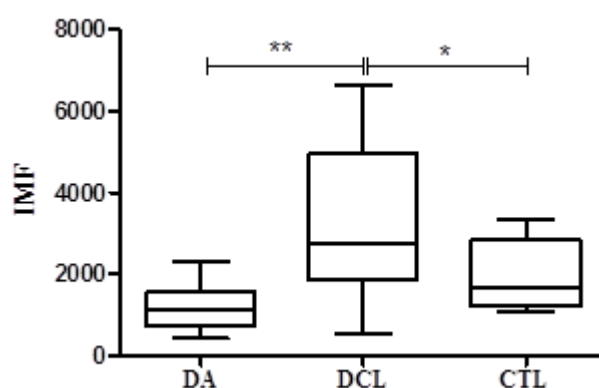


Figura 25 - Produção de IFN- γ em células T Citotóxicas não efectoras (CD8+CD62L). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ e $p < 0,01$ são representadas por um e dois *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL]

1.3.3 - Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro

Quando se compara os indivíduos com doença de Alzheimer e os indivíduos com DCL, pode observar-se diferenças significativas apenas ao nível da IMF do IFN- γ produzido pelas células T de memória (CD8+CD62L+) (Figura 25). O que significa que apesar das suas percentagens não serem significativamente diferentes a quantidade de citocina produzida é significativamente diferente entre os grupos, sendo maior nos doentes com DCL.

1.4 – Análise de Células NK (CD3-CD56+)

1.4.1 – Indivíduos com a Doença de Alzheimer vs Indivíduos Controlo

As diferenças encontradas entre os doentes de Alzheimer e os indivíduos controlo foram significativas ao nível da presença do receptor activador de células citotóxicas do tipo CD2 (CRACC). Este é um receptor presente nas células NK que medeia a adesão celular e a citotoxicidade mediada por células. Verificaram-se diferenças significativas tanto nas células NK citotóxicas (CD3-CD56^{Low}CD16+) CD62L+ como nas células NK citotóxicas CD62L- (Figura 26).

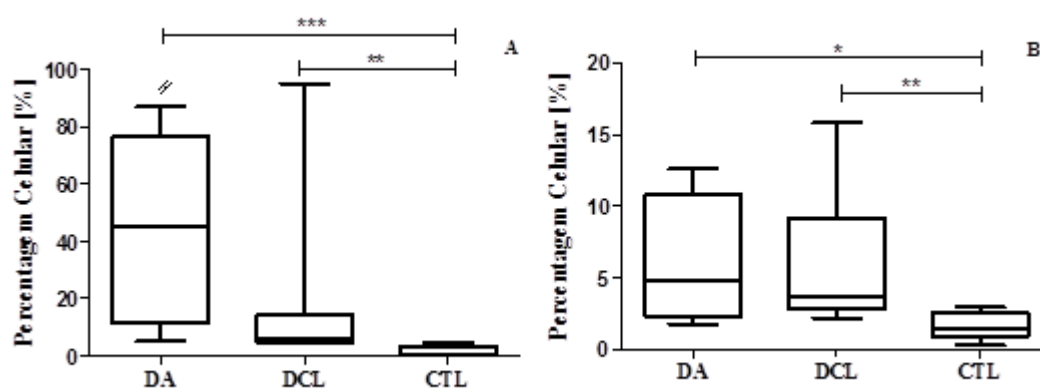


Figura 26 - Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas (CD3-CD56^{Low}CD16+). [A] – Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas CD62L+ e [B] – Expressão de CRACC nas células NK citotóxicas CD62L-. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas p<0,05, p<0,01 e p<0.001 são representadas por um, dois e três *, respectivamente. Legenda: [DA] – Doentes de

Apesar de não existirem diferenças significativas na percentagem média de produção de INF- γ nas células NK totais (CD3-CD56+), é verificado um valor mais elevado da IMF no grupo controlo (Figura 27).

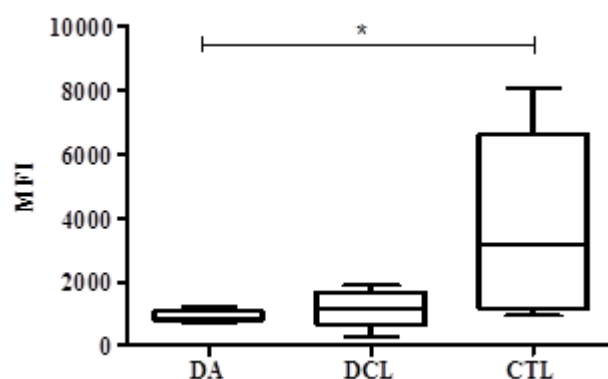


Figura 27 - Produção de $\text{INF-}\gamma$ em células NK Totais (CD3-CD56^+) Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Os indivíduos do grupo controlo apresentam uma maior percentagem de células NK *naive* ($\text{CD56}^{\text{Low}}\text{CD16}^-$) do que os indivíduos com doença de Alzheimer (Figura 28).

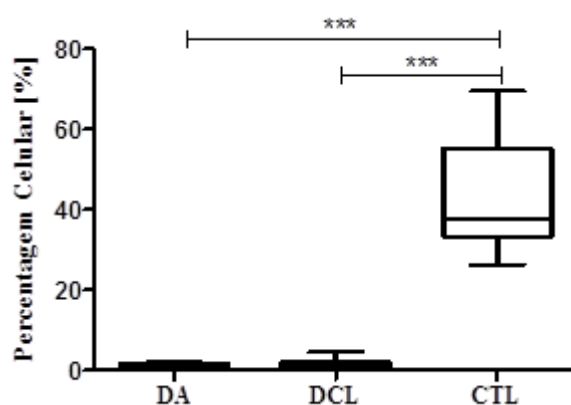


Figura 28 - Subpopulação de células NK denominada NK *naive* Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,001$ são representadas por três *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.4.2 – Indivíduos com Défice Cognitivo Ligeiro vs Indivíduos Controlo

O grupo de indivíduos com DCL apresenta em média uma maior percentagem de células NK (CD62L+ e CD62L-) que expressam o receptor CRACC (Figura 26A e B).

Existe também alteração na IMF da expressão do receptor CRACC na subpopulação de células NK citotóxicas CD62L-. A expressão deste receptor nesta subpopulação é mais elevada no grupo controlo, o que pode tornar a produção de CRACC pelas células NK citotóxicas CD62L- menos significativa (Figura 29).

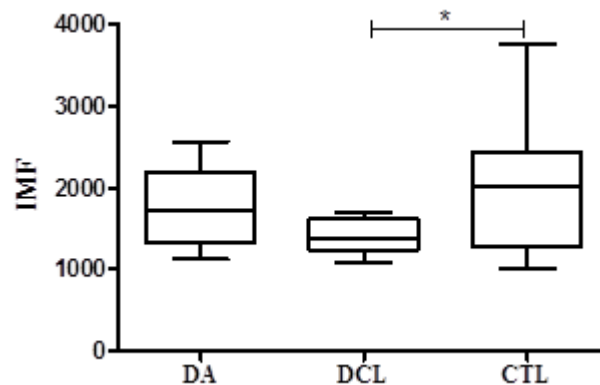


Figura 29 - Expressão do receptor CRACC na subpopulação de células NK citotóxicas CD62L-. Os resultados estão expressos em Intensidade média de fluorescência e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

Para além da alteração da expressão dos receptores nas subpopulações, também existe alteração das próprias subpopulações de NK. Assim, existe uma menor percentagem de células NK *naive* (CD56^{Low}CD16-) em doentes com DCL quando comparados com os indivíduos controlo (Figura 28).

1.4.3 – Indivíduos com Doença de Alzheimer vs Indivíduos com Déficit Cognitivo Ligeiro

Quando se comparam estes dois grupos verificam-se alterações significativas na expressão do receptor CRACC na subpopulação NK Citotóxica CD62L+ (Figura 26 A), na qual os doentes de Alzheimer apresentam uma expressão mais elevada do receptor.

Os doentes de Alzheimer apresentam também uma maior percentagem de células reguladoras (CD3-CD56^{High}CD16-) que produzem granzima B quando comparados com os doentes com DCL (Figura 30).

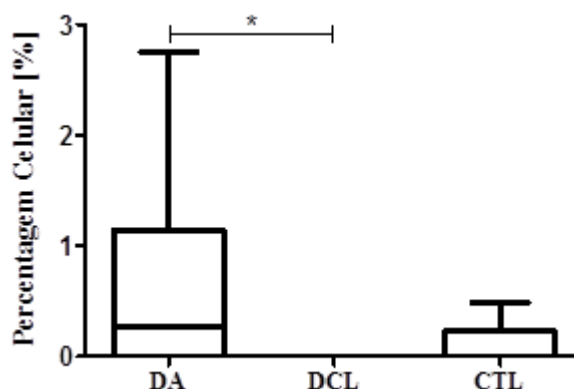


Figura 30 - Produção de granzima B pela subpopulação de células NK Reguladoras (CD3-CD56^{Elevado}CD16-). Os resultados estão expressos Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK e representam a média±e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas p<0,05 são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

1.5 Análise de Monócitos

Por último, foi efectuada a caracterização fenotípica dos monócitos no sangue periférico. Nestes, as únicas alterações significativas foram verificadas nas percentagens e IMF do IFN- γ produzido pelos monócitos inflamatórios nos doentes com DCL. Em média estas células produzem mais IFN- γ quando comparados com o grupo controlo (Figura 31).

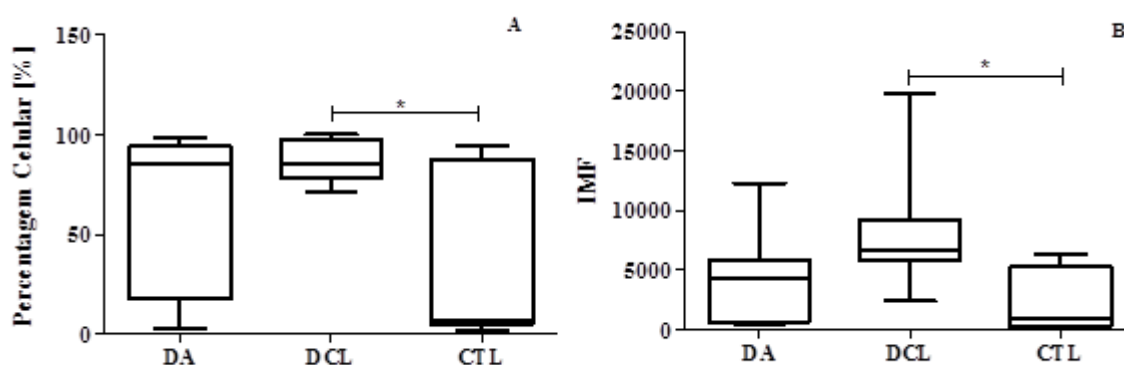


Figura 31 - Diferenças entre a produção de IFN- γ pelos monócitos inflamatórios do sangue periférico entre doentes com DCL e indivíduos controlo. [A] – Os resultados são expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de monócitos e representam a média \pm e.p.m (n=10) na subpopulação de monócitos inflamatórios; [B] – Subpopulação de monócitos inflamatórios produtora de IFN- γ . Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média \pm e.p.m (n=10). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ são representadas por um *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo.

2 – Detecção de Quimiocinas no soro

Quando se efectuou o teste de pesquisa de quimiocinas no soro dos indivíduos de cada grupo foram encontradas diferenças significativas em quatro das seis quimiocinas.

A quimiocina G-CSF apresenta uma concentração sérica mais elevada nos grupos de doentes do que no grupo controlo. Quando se comparam doentes de Alzheimer com indivíduos diagnosticados com DCL não se detectam diferenças significativas (Figura 32).

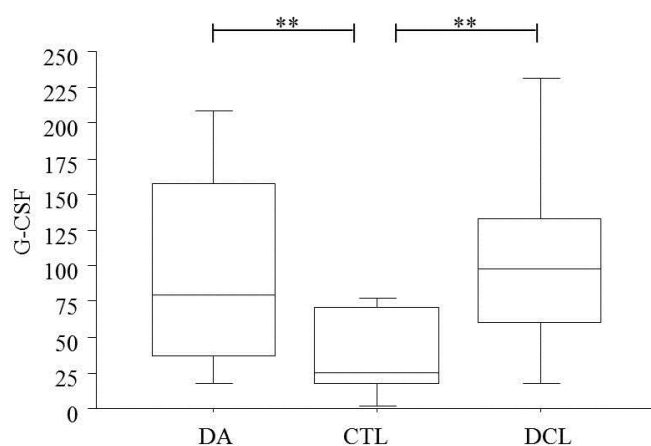


Figura 32 - Concentração da quimiocina G-CSF no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p < 0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [G-CSF] - Factor Estimulador de Colónias Macrofágico.

A IL-8 também apresenta diferenças significativas na sua concentração quando se compara o grupo de indivíduos com DCL e o grupo controlo, no entanto, não apresenta diferenças significativas relativamente aos doentes de Alzheimer. Para além disso também há um aumento da concentração desta interleucina nos doentes com DCL quando comparados com os doentes de Alzheimer. Sendo assim os indivíduos com DCL apresentam em média uma maior concentração de IL-8 no seu soro, em relação aos outros dois grupos (Figura 33).

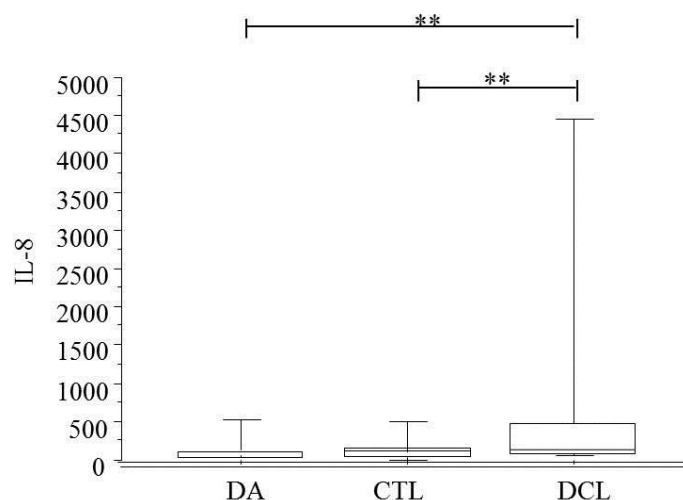


Figura 33 - Concentração da IL-8 no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [IL-8] – Interleucina 8

O MIP-1 β apresenta diferenças significativas apenas quando se comparam os doentes de Alzheimer com os doentes com DCL. Os doentes com DCL apresentam uma concentração mais elevada desta quimiocina (Figura 34).

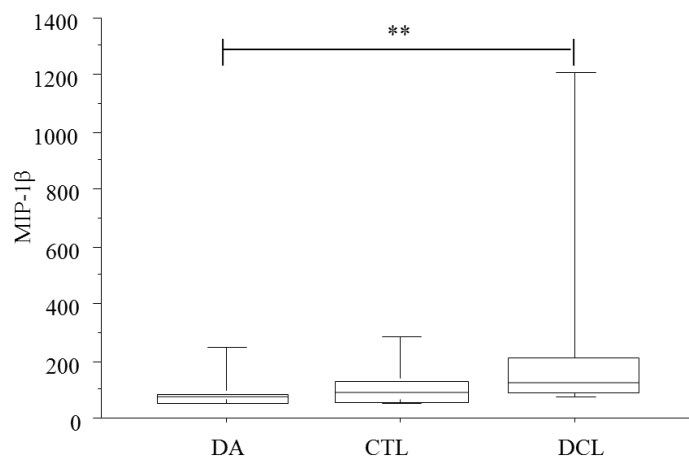


Figura 34 - Concentração de MIP-1 β no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média±e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas $p<0,01$ são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Déficit Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [MIG] – Monocina Induzida pelo Interferão-gama.

A última quimiocina cujos valores de concentração foram encontrados alterados foi a MIG. Tanto os doentes de Alzheimer como os indivíduos com DCL apresentam valores mais elevados desta quimiocina no seu soro face ao grupo controlo (Figura 35).

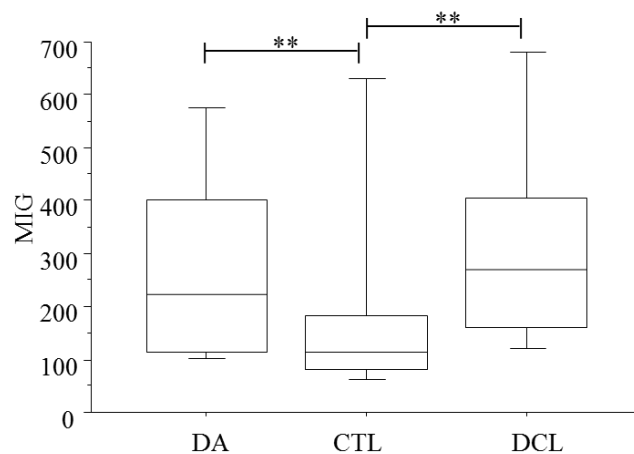


Figura 35 - Concentração de MIP-1 β no soro dos indivíduos dos três grupos em estudo. Os resultados são expressos em pg/mL e representam a média \pm e.p.m (DA com n=21; DCL com n=27 e CTL com n=18). As diferenças estatisticamente significativas p<0,01 são representadas por dois *. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo; [MIG] – Monocina Induzida pelo Interferão-gama

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A evidência de uma alteração no sistema imune periférico na DA parece clara, no entanto, os mecanismos desta desregulação, a causa e as consequências permanecem desconhecidos. Não existe ainda um consenso quanto às alterações fenotípicas das células do sistema imune nesta doença, podendo as diferenças encontradas serem devidas à heterogeneidade das próprias metodologias, às diferenças entre os doentes de Alzheimer ou aos critérios usados para a selecção de doentes e controlos (Xue *et al.*, 2009).

Com o objectivo de clarificar quais as alterações que ocorrem no sistema imune de indivíduos com demência e/ou com DA procedeu-se a uma caracterização fenotípica das diferentes populações, incluindo as células B. Poucos são os grupos que se aventuram no estudo fenotípico desta população celular. No entanto, muitos são os que apostam na imunização pela administração de βA_{42} . Esta estimula os linfócitos B a produzirem anticorpos anti- βA provocando a activação de células T e de células da microglia de modo a desencadarem uma resposta imune. Esta estratégia tem apresentado várias desvantagens, entre as quais o desenvolvimento de meningoencefalite em 6% dos indivíduos envolvidos no ensaio clínico, reactividade do APP, microhemorragias, entre outras (Delrieu *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos na caracterização fenotípica das células B demonstram um aumento da expressão de CD69 nos doentes de Alzheimer em relação aos doentes com DCL. A expressão desta molécula constitui um dos primeiros indicadores de activação de leucócitos e a sua rápida indução ocorre através da activação da transcrição (Vazquez *et al.*, 2009). Para além da activação destes linfócitos, também parece existir uma expressão mais eficaz do receptor da IL-6 nos doentes de Alzheimer em relação aos doentes com DCL mas não em relação ao controlo. A IL-6 funciona como um factor de activação para as células B sendo referida como reguladora de respostas imunes e reacções inflamatórias, tendo um importante papel em doenças auto-imunes, tais como AR. Dada a sua importância na AR, foram desenvolvidos agentes bloqueantes da sua acção dirigidos especificamente para o seu receptor (Nishimoto and Kishimoto, 2008). Quando este receptor é activado ocorre indução de adesão intercelular de moléculas e produção de citocinas pró-inflamatórias. O aumento destas moléculas sugere um processo inflamatório geral no sistema imune periférico subjacente à neurodegeneração. Estes sinais podem ainda relacionar-se com diferenças ao nível das subpopulações de células B. Através do uso dos anticorpos monoclonais anti-CD19, anti-CD27 e anti-IgD, marcados com diferentes fluorocromos é possível distinguir cinco subpopulações

diferentes: (1) células B *naive* (CD19+CD27+IgD+); (2) células B de memória *unswitched* (CD19+CD27+IgD+); (3) células B de memória *switched* ou convencionais (CD19+CD27+IgD-); (4) uma população dupla negativa (CD19+CD27-IgD-) e (5) plasmócitos (CD19+CD27++IgD-) (Rodriguez-Bayona *et al.*, 2010). A análise dos resultados demonstra um aumento das células de memória *switched* em DA e doentes com DCL, o que também acontece em doenças inflamatórias crónicas, como a AR, em que as células de memória (CD27+) se acumulam com a progressão da doença, enquanto as células B *naive* tendem a diminuir no sangue periférico (Fekete *et al.*, 2007). Em paralelo com o que se passa numa inflamação crónica, nos doentes em estudo parece existir um aumento das células B de memória (mas apenas das *switched*) e uma tendência para uma diminuição das células B *naive* (anexos) em relação aos controlos. No que diz respeito às células de memória *unswitched* estas apresentam uma tendência para estarem diminuídas em relação aos indivíduos controlo, o que pode estar relacionado com o facto destas últimas células estarem associadas à produção de autoanticorpos (Tiller *et al.*, 2007). Não são muitas as referências a autoanticorpos em doentes de Alzheimer, no entanto, foram encontrados complexos imunes de autoanticorpos contra peptídeos de βA_{1-42} no líquido cefalorraquidiano em indivíduos controlo sem DA (Henkel *et al.*, 2007). Esta evidência para além de sugerir que o sistema imune periférico pode ter um papel extremamente importante na homeostasia da βA_{1-42} por efectuar imunocomplexos com o peptídeo, pode suportar a ideia de que a subpopulação de células B de memória *switched* está diminuída em DA impedindo que haja uma remoção adequada desses péptidos por esses autoanticorpos com funções homeostáticas, conduzindo à sua posterior oligomerização e deposição em placas (sabe-se que o início desta doença de etiologia desconhecida pode desencadear-se décadas antes do aparecimento dos sintomas característicos da doença). Todos estes factos associados levantam uma questão essencial para uma melhor compreensão do papel do sistema imune periférico nesta doença: será que o sistema imune periférico inicia a sua acção aquando do início dos mecanismos fisiopatológicos que decorrem no sistema nervoso central, ou é uma consequência tardia do desenvolvimento da doença, iniciando a sua acção simultaneamente com o aparecimento dos primeiros sintomas da doença (que se sabe serem muito tardios no decurso da patologia)?

Para além das alterações nas subpopulações de memória, também as células B reguladoras (CD19+CD1d+IL10+) se encontram aumentadas em ambos os grupos de doentes quando comparados com os controlos. A identificação de distintas

subpopulações de células T reguladoras (Tregs) tais como, Tregs CD4+CD25+, Tregs1 produtoras de IL-10 e células Th₃ produtoras de TGF-β1 dentro das células T CD4+ revelou uma das vias através da qual as respostas imunes são reguladas. No entanto, há alguns anos atrás foi descoberta uma outra via de regulação da resposta imune que consiste na subpopulação de células B reguladoras (Bregs) (Mizoguchi and Bhan, 2006). Estas células têm como função a supressão e/ou uma melhor recuperação de processos inflamatórios através de vários mecanismos, entre os quais, a produção de IL-10 que restabelece o equilíbrio Th₁/Th₂; a inibição directa de cascatas inflamatórias; a produção de TGF-β1 que induz a apoptose de células T efectoras; a capacidade de diminuir células T CD4+ activadas de forma directa ou actuando como células apresentadoras de antígeno e, também pelo recrutamento de Tregs. A evidência da existência destas células advém de modelos de inflamação crónica, que incluem lúpus e AR, nas quais as células B produtoras de autoanticorpos têm um papel patogénico (Mizoguchi and Bhan, 2006). Todas estas alterações referidas até agora nas subpopulações de células B e moléculas expressas à sua superfície sugerem que o processo inflamatório periférico desta doença neurodegenerativa poderá ser semelhante a um processo de inflamação crónica, tal como lúpus e AR. O aumento das células Bregs sugere uma tentativa de controlo do processo inflamatório. A própria produção de IL-10 (tanto ao nível das células B totais como ao nível das subpopulações *unswitched* e *switched*), que se apresenta aumentada em doentes com DCL, evidencia essa tentativa de travar a resposta imune, sugerindo que os doentes com DCL podem estar num estado anti-inflamatório (IL-10 é uma interleucina anti-inflamatória), enquanto os doentes de Alzheimer, nos quais não se verifica esse aumento de IL-10, podem estar num estado pró-inflamatório. É facto que o DCL é um estadio pré-Alzheimer, que pode ou não evoluir para DA e onde os sintomas e os processos patológicos não são tão agressivos, o que origina uma resposta imune mais controlada. Por outro lado, os doentes de Alzheimer já apresentam uma maior severidade dos sintomas e mecanismos patológicos fazendo com que o organismo entre num processo inflamatório mais agressivo.

O receptor CD40 apresenta uma maior expressão à superfície de células B, nos doentes de Alzheimer. A sua forma solúvel já foi encontrada em níveis elevados no soro de doentes de Alzheimer por Buchhave *et al.*, 2008, no entanto, ainda não se conseguiu definir o papel desta molécula na fisiopatologia da doença nem a sua associação com o metabolismo da βA. Este receptor está envolvido na sinalização imunorregulatória, quando interage com o seu ligando (CD40L). O CD40 é essencial para o *switch* de

classes de imunoglobulinas dependente de células T e para o desenvolvimento de células B de memória (Arlestig and Rantapaa-Dahlqvist, 2012). Sendo este receptor essencial para o *switch* de classes de imunoglobulinas, pode relacionar-se o seu aumento com o aumento de células CD27+IgD-IgM-, nos doentes de Alzheimer e nos doentes com DCL que se verificou neste estudo. Desta forma a percentagem de células que sofreu *switch* é mais elevada do que a percentagem de células que não sofreu *switch* de classe e permaneceu IgM positiva. Para além disso estas células IgM positivas encontram-se aumentadas nos controlos em relação aos DA. O aumento do número de células que sofreram *switch* de classes de Imunoglobulinas demonstra que algo no organismo foi reconhecido como estranho (provavelmente o péptido β A, levando à diferenciação das células B. Para além disso, é referido que as células que sofreram *switch* de classes de imunoglobulinas podem ser importantes no desenvolvimento de autoimunidade (Moller *et al.*, 2009). O CD40 contribui para a potenciação de doenças auto-imunes nas quais a activação de células B e T têm um papel importante tais como LES, AR e esclerose múltipla. Nestas doenças, o CD40 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e contribui para a imunidade dependente de células T em diferentes fases da doença, nomeadamente pela interferência com o processo de selecção negativa que permite o escape de células T auto-reactivas; pela produção de citocinas dependentes de CD40 que podem levar à diferenciação das células T em células Th₁₇ e, por último, pela produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias dentro do tecido alvo, o que contribui para o dano do tecido e propagação do insulto inflamatório (Alaaeddine *et al.*, 2012). Segundo o mesmo autor, este receptor tem sido relacionado com a produção de autoanticorpos no LES, doença em que as células B se encontram no centro da patologia. Este facto levanta novamente a questão em relação ao momento em que ocorre activação do sistema imune periférico nesta doença neurodegenerativa. A verdade é que as citocinas e quimiocinas produzidas em ambientes inflamatórios são de extrema importância para a patologia das doenças, nomeadamente em doenças auto-imunes, nas quais há um desequilíbrio na produção destas. As quimiocinas normalmente levam à acumulação de células no local de inflamação. Sendo assim, vários estudos têm demonstrado que uma diminuição de quimiocinas e/ou um bloqueio dos seus receptores leva a reduções dos focos de inflamação com melhorias significativas dos mecanismos patológicos destas doenças. Um dos receptores de quimiocinas mais estudado para este tipo de abordagem, na tentativa de diminuir a inflamação e os sintomas da doença é o CCR1. Este receptor é abundantemente expresso no líquido sinovial e nas células

presentes nesse mesmo líquido, o que sugere que um bloqueio deste CCR1 possa ser uma estratégia terapêutica para reduzir a inflamação na AR. Este receptor tem vários ligandos, tais como, MIP-1 α , RANTES, MCP-3, ligando de quimiocina C-C 7 (CCL7), ligando de quimiocina C-C 14 (CCL14), ligando de quimiocina C-C 15 (CCL15) e ligando de quimiocina C-C 16 (CCL16) (Szekanecz *et al.*, 2011). À semelhança do que acontece na AR também existe um aumento da expressão deste receptor em células B circulantes no sangue periférico de indivíduos com DA. Estes indivíduos apresentam valores mais elevados de CCR1, tanto em relação aos controlos como em relação aos indivíduos com DCL, o que pode estar relacionado com a maior agressividade do processo inflamatório nos doentes com Alzheimer. Por sua vez, os doentes com DCL apresentam um aumento do receptor CXCR4 em relação aos controlos. Este CXCR4 é também um receptor de quimiocinas específico para o factor derivado de células do estroma 1 expresso em várias células do sistema imune e do sistema nervoso central (Chung *et al.*, 2010). Este receptor medeia a migração e activação de progenitores hematopoiéticos e células B, estando envolvido em vários fenómenos como hematopoiese e desenvolvimento ou sobrevivência de células B (Luan *et al.*, 2012). Para além disso, é muito provável que também esteja envolvido na sinalização do receptor de células T (TCR) ou migração celular destas. É sugerido que o CXCR4 está envolvido na fisiopatologia da AR entre outras doenças auto-imunes (Chung *et al.*, 2010). Também nos doentes com DCL ocorreu aumento deste receptor evidenciado recrutamento e activação das células B do sangue periférico nestes doentes. À semelhança do que se passa em doenças como AR e LES, também na presença de processos neurodegenerativos, as quimiocinas e seus receptores parecem estar activadas e desempenhar a sua função. Isso é evidente não só pelo aumento da expressão dos receptores na superfície das células B mas também pelo aumento de quimiocinas no soro dos doentes de Alzheimer e doentes com DCL verificado também neste estudo. As alterações não são verificadas apenas quando se analisa o *pool* de células B total. Quando se verifica a produção de citocinas nas subpopulações B *naive*, B duplas negativas e B *switched* pode verificar-se um aumento do TGF- β nos doentes com DCL. Esta proteína regula a proliferação, diferenciação, adesão, migração e outras funções em vários tipos de células. Segundo Caraci *et al.*, 2012, o TGF- β é reconhecido como um factor neurotrófico que confere neuroprotecção contra a neurodegeneração induzida pela β A. Assim, o aumento de TGF- β nos indivíduos com DCL pode ser um mecanismo de protecção que o organismo está a tentar exercer numa fase pré-Alzheimer, por forma

a evitar a evolução para Alzheimer. Este facto apoia a ideia já referida, de que os doentes com DCL, no que diz respeito à análise de células B parecem apresentar um perfil mais anti-inflamatório. Contrastando com estes resultados, já foram demonstradas deficiências ao nível da via de sinalização do TGF- β 1 em cérebros de doentes de Alzheimer com determinados polimorfismos nesta citocina, estando esses mesmos polimorfismos associados a um maior risco de contrair a doença (Caraci *et al.*, 2012). Analisando sob esta perspectiva, sugerimos que esta elevada expressão de TGF- β possa estar relacionada com uma maior tendência para estes doentes com DCL evoluírem para Alzheimer. Estes doentes apresentam ainda uma diminuição da população total de células B e, contrariamente ao que se verifica na AR (Wheater *et al.*, 2011), neste caso não se relaciona com a medicação administrada. Esta diminuição do *pool* de células B, já verificada em doentes de Alzheimer (Pellicano *et al.*, 2010) pode relacionar-se com o aumento da expressão da molécula de superfície CD95/Fas. Esta proteína é membro da superfamília do receptor do TNF e contem domínios de morte. Tem sido demonstrado que esta molécula tem um papel central na regulação fisiológica da morte celular programada e tem sido implicada na patogénese de várias doenças do sistema imune. Também neste caso se encontra aumentada em ambos os grupos de doentes. Na realidade a linha entre activação e apoptose das células B é muito ténue, de forma que células bastante estimuladas podem rapidamente entrar em apoptose. Uma outra razão para a diminuição das células pode ser a diminuição do *pool* de células T, necessárias à activação das células B. Isto porque, o modelo clássico de activação das células B inclui dois sinais: o sinal enviado através do receptor do antígeno (BCR) e o sinal enviado pelas células T auxiliares via CD40 e receptores de citocinas (Peckham *et al.*, 2001). Apesar de existir uma diminuição do *pool* de células T em doentes com DCL e doentes de Alzheimer em relação ao controlo, esta diminuição não apresentou significância estatística e para além disso, como já foi referido, verificou-se um aumento da expressão de CD40.

As alterações verificadas ao nível das células T parecem estar concordantes com as alterações supracitadas nas células B. Existe um aumento de células T auxiliares (TCD4+) produtoras de IL-4 em doente com DCL, o que evidencia uma polarização das células T no sentido Th₂, o que significa uma resposta humoral (efectuada por células B) mais forte. Durante vários anos as células T auxiliares foram divididas entre células Th₁ e Th₂, as quais apresentam diferentes fenótipos ao nível da secreção de citocinas que influenciam uma resposta imune diferencial. As células Th₁ produzem IFN- γ , TNF-

β e IL-10, mediando respostas de imunidade celular contra células tumorais, vírus intracelulares e bactérias através da activação de macrófagos e células T citotóxicas (TCD8+). As células Th₂ secretam IL-4, IL-5, IL-13, IL-21 e IL-31, e são importantes na defesa do organismo contra agentes patogénicos, contribuindo também para a patogénese da asma e das alergias. Este equilíbrio entre células Th₁/Th₂ pode ser regulado pelas células T reguladoras (CD4+CD25+FOXP3+), cuja função é manter a homeostasia da resposta imune (Vojdani and Lambert, 2011a). Estas células Tregs não se encontram significativamente elevadas nos dois grupos de doente, apesar de demonstrarem uma tendência para tal, o que poderia ser confirmada com o aumento do número de indivíduos de cada grupo. Actualmente, a divisão das células TCD4+ estende-se também às células Th₁₇, com a capacidade de produção da citocina IL-17. As células TCD4+ *naive* diferenciam-se em células Th₁₇ em resposta à produção de IL-6, IL-23, TGF- β e IL-1 β (Jung *et al.*, 2010). Nos resultados obtidos pode observar-se um aumento da produção de TGF- β nas células B que pode ser responsável pelo ambiente propício à diferenciação das células TCD4+ *naive* em células Th₁₇. A função exacta destas células não é totalmente conhecida, no entanto, sabe-se que têm um importante papel na defesa contra bactérias extracelulares e no desenvolvimento de doenças auto-imunes, entre as quais se encontra a AR (Jung *et al.*, 2010). Sabe-se que a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que regula a actividade do NF κ B e de proteínas cinases activadas por mitogénio. Esta citocina pode levar a um aumento da produção de IL-6 e de óxido nítrico; estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a produzir outras quimiocinas inflamatórias tais como MIP-2, MCP-1 e G-CSF. Na análise das quimiocinas efectuadas no soro dos indivíduos que constituem os grupos em estudo pode verificar-se o aumento de G-CSF. Existe também a descrição de uma relação entre as células Th₁₇ e a indução de auto-imunidade ao nível do sistema nervoso central, tendo sido demonstrado que a IL-17 desencadeia uma activação da microglia, levando a que esta produza IL-6, MIP-2, óxido nítrico, factores neurotróficos e moléculas de adesão. Sob condições inflamatórias a microglia produz IL-1 β e IL-23 que podem actuar de forma autócrina, induzindo a expressão de IL-17 pela própria microglia que provoca desmielinização contribuindo para a neurodegeneração. Por sua vez a neutralização desta citocina demonstra diminuição do processo inflamatório. A IL-17 produzida pelas células Th₁₇ tem ainda a capacidade de alterar a permeabilidade da barreira celular, com consequente atracção de monócitos e macrófagos para o sistema nervoso, o que leva ao dano da mielina e dos axónios (Vojdani and Lambert, 2011b). O

papel das células T na doença de Alzheimer parece ser essencial, não só pelo facto destas poderem atravessar a barreira hematoencefálica mas também pela produção de citocinas capazes de actuar no sistema nervoso central (Jozwik *et al.*, 2012). Actualmente a questão que se tenta esclarecer é se a β A pode servir como antigénio para as células T. A verdade é que a meningoencefalite desenvolvida em 6% dos indivíduos que receberam imunizações com o péptido β A₁₋₄₂ parece ser atribuída a um desequilíbrio Th₁/Th₂, com predomínio de uma resposta imune no sentido Th₁. O aumento das células CD4+CD28 já foi referido em doentes de Alzheimer (Jozwik *et al.*, 2012). Neste estudo, há um maior IMF destas células nos indivíduos com DCL, o que significa um aumento significativo destas células nestes doentes quando comparados com os indivíduos controlo. O CD28 é um marcador de activação, essencial para a proliferação, sobrevivência, produção de citocinas e desenvolvimento de células Th₂, o que novamente apoia uma eficácia da resposta humoral.

As células T citotóxicas (TCD8+) estão normalmente activadas na resposta contra os tumores e vírus intracelulares, pois exibem uma capacidade citotóxica efectora. Não foram encontradas diferenças significativas nestas células ao longo do estudo, o que sugere que não tenham um papel tão relevante como as células B. Os doentes de Alzheimer e com DCL, apenas demonstraram uma maior percentagem de produção de INF- γ pelas células CD8+CD62L+. Esta citocina normalmente exhibe propriedades antivirais, imunoreguladoras e anti-tumorais, sendo um potente activador de macrófagos (Guenin-Mace *et al.*, 2011). Não foram verificadas alterações nas populações de monócitos entre os diferentes grupos, no entanto, ocorreu uma maior produção de IFN- γ por parte dos monócitos inflamatórios, o que pode estar relacionado com esta activação das células CD8+CD62L+. Desta forma a sua produção indica uma tentativa de reposta por parte das células T citotóxicas dos doentes com neurodegeneração. A lectina CD62 está envolvida na migração e das células T *naive* para os nódulos linfáticos, onde ocorre o contacto com o antigénio (Guenin-Mace *et al.*, 2011). Este pode ser um indicativo de que realmente a β A talvez possa funcionar como um antigénio, pois as células CD8+CD62L+ são maioritariamente células de memória central que se formam após contacto com o antigénio, e sem propriedades efectoras. Estas células de memória são menos citolíticas que as células efectoras, mas exibem uma grande capacidade de sobrevivência, sendo cruciais para uma maior rapidez da resposta imune aquando de um segundo contacto com o antigénio (Laouar *et al.*, 2008). Não foram verificadas muito mais alterações ao nível das células T citotóxicas, tendo

sido avaliada a produção de granzima B, que avalia o exercício da função citotóxica e também a eventual activação das células TCD8+ totais e as suas subpopulações. Será que o facto de existirem alterações apenas nas células T de memória pressupõe uma activação do sistema imune, que poderá significar uma activação simultânea ao início das alterações neurodegenerativas? Mais uma vez se coloca a questão do momento em que o sistema imune se começa a alterar na DA.

As células NK são também conhecidas pela sua actividade citotóxica sendo essenciais em respostas contra tumores ou vírus intracelulares. Estas também foram avaliadas nos doentes de Alzheimer e doentes com DCL. Apesar de serem células totalmente diferentes a nível de fenótipo e características biológicas, em termos de função as células NK são semelhantes às células T citotóxicas, exercendo actividade citolítica e actuando no meso tipo de patologias. Estas células também agem como células reguladoras que produzem citocinas. Assim, tal como as células TCD8+CD62L+, a população de células NK total apresenta um aumento da produção de IFN- γ , o que implica activação destas células tal como acontece na presença de vírus (Wren *et al.*, 2012). A actividade destas células é regulada por um equilíbrio entre estimulação e inibição de receptores de superfície, sendo os receptores inibitórios responsáveis pela tolerância das células NK a antigénios do próprio. A activação das células NK pode ser mediada por diferentes receptores entre os quais se encontram os receptores CD244 e CRACC. Estes receptores estão envolvidos na citotoxicidade celular das células NK e provavelmente também estão envolvidos na proliferação das próprias células NK, de células T e APC (Stark and Watzl, 2006). Estes receptores de citotoxicidade encontraram-se aumentados nas células NK citotóxicas nos doentes com Alzheimer e DCL. Como já foi referido as células NK subdividem-se em diferentes subpopulações, aparentemente com diferentes funções, isso indica que as células NK também possuem todo um processo de diferenciação, o qual está dependente do CMH e inclui formação de memória. Assim sendo, parece que as células NK CD56^{High} têm uma enorme capacidade proliferativa e produzem IFN- γ quando estimuladas por citocinas, enquanto que as células NK CD56^{Low} são altamente citotóxicas. Esta população de NK citotóxica é muito heterogénea em relação aos marcadores de superfície denominados KIR (do Inglês *Killer immunoglobulin-like receptors*) e a moléculas como CD27 e CD62L. Alguns desses marcadores têm sido associados a diferentes funções das células NK (Juelke *et al.*, 2010). Com o objectivo de analisar diferenças dentro da subpopulação de células NK citotóxicas verificou-se a produção de CRACC e granzima

B nas células NK citotóxicas CD62L⁺ e nas células NK CD62L⁻. Segundo Juelke *et al.*, 2011, as células NK CD56^{Low}CD62L⁺ representam uma subpopulação única que combina a capacidade de produção de IFN- γ após serem estimuladas e proliferarem com a capacidade de matar células e produzir citocinas após receberem sinais de activação. Este autor refere ainda, a existência de diferentes funções entre as células CD62L positivas e as negativas. No entanto, no nosso estudo a expressão do receptor CRACC apresenta-se aumentada, em ambos os grupos de doentes quando comparados com os controlos tanto nas células CD62L⁻ como nas células CD62L⁺. A diferença de expressão (DA_{vs}CTL) é mais significativa na população CD62L⁺, no entanto, creio não se puder afirmar com base nisso que as diferenças entre subpopulações de CD62L sejam significativas pois em ambas é expressa a mesma quantidade de CRACC. Por outro lado, foi referido para as células T que o marcador CD62L está associado a células de memória. Apesar das células NK fazerem parte do sistema imune inato e do sistema de memória ter sido associado durante vários anos à imunidade adquirida, vários estudos têm descrito possíveis células NK de memória (Sun *et al.*, 2010). Apesar da literatura não associar a molécula CD62L a células NK de memória, evidencia cada vez mais a semelhança entre células TCD8⁺ e NK. Na mesma linha de pensamento talvez seja possível, apesar de ousado, estabelecer um ponto de semelhança entre células TCD8⁺ CD62L⁺ produtoras de IFN- γ aumentadas em doentes de Alzheimer e células NK citotóxicas CD62L⁺ produtoras de CRACC. Será que este é mais um ponto capaz de aproximar células T de células NK, como tem sido feito ao longo dos últimos anos?

Como já foi referido, as células NK têm todo um processo de diferenciação que é distinguido pelos seus marcadores de superfície (Johnston *et al.*, 2011). As células CD56^{Low}CD16⁻ são referidas como células NK *naive*, que se encontram aumentadas nos controlos em relação a doentes de Alzheimer e indivíduos com DCL, o que pode sugerir uma maior diferenciação e activação das células nos doentes. Da mesma forma, é referida a existência de células NK reguladoras (CD56^{Elevado}CD16⁻), que demonstram que as células NK não executam apenas funções relacionadas com citotoxicidade mas também secretam citocinas e quimiocinas que são responsáveis pela sobrevivência e homeostasia, nomeadamente com o reconhecimento do próprio e não próprio (Tian *et al.*, 2012). Nesta caso as células NK reguladoras apresentam uma maior produção de granzima B nos doentes de Alzheimer quando comparadas com o grupo de indivíduos com DCL, o que evidencia uma maior actividade citotóxica nas células de doentes de Alzheimer. A granzima B é produzida por células com capacidade citotóxica e a sua

libertação promove apoptose da célula infectada ou células tumoral (Trapani, 2012). Sabe-se que os péptidos de β A podem encontrar-se no interior de células da microglia (Morelli *et al.*, 1999), apelidadas de “macrófagos cerebrais” e também se encontra presente ao nível do sangue periférico. Dado este facto, foi colocada a hipótese de as próprias isoformas da proteína β A (Mayeux and Schupf, 2011) ou as enzimas que degradam essas mesmas isoformas (Liu *et al.*, 2012) puderem ser usadas como biomarcadores da doença de Alzheimer. Tudo isto demonstra a presença de péptidos de β A em circulação na doença de Alzheimer. Assim, sendo não é de todo descabida a possibilidade de uma internalização de β A por macrófagos periféricos que desencadeiam a produção de actividade citotóxica por parte de células T e NK.

Os monócitos são células circulantes no sangue periférico, medula óssea e baço. Representam células efectoras imunes que expressam à sua superfície receptores de quimiocinas e receptores de adesão, que medeiam a migração do sangue para os tecidos durante o processo inflamatório. Estes produzem citocinas inflamatórias e durante esse estado inflamatório podem diferenciar-se em células dendríticas inflamatórias ou macrófagos (Geissmann *et al.*, 2010). Vários artigos referem que os próprios monócitos derivados do sangue periférico são recrutados para o sistema nervoso central. Aí podem modificar a inflamação local fazendo com que as terapias baseadas em drogas anti-inflamatórias sistémicas que são usadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, possam falhar devido à supressão induzida pelo recrutamento destes monócitos do sangue periférico (Schwartz and Shechter, 2010). É praticamente certo que a microglia tem origem no mesmo precursor que os macrófagos. Durante a embriogénese, as células mielóides hematopoiéticas migram para o cérebro onde se diferenciam em microglia. Na patogénese da doença de Alzheimer a microglia torna-se activada, adquire capacidade fagocítica e produz citocinas (Gate *et al.*, 2010). Contrariamente ao que se esperava, dada a importância da microglia na resposta neuroimunológica, não foram encontradas grandes alterações ao nível dos monócitos do sangue periférico. A única alteração verificada foi ao nível da produção de $\text{INF-}\gamma$ pelos monócitos inflamatórios ($\text{CD11b}^+\text{CD14}^{\text{Low}}\text{CD16}^+$). Nos humanos, os monócitos podem ser classificados com base na expressão das moléculas de superfície CD14 e CD16. Os monócitos $\text{CD14}^{\text{High}}\text{CD16}^-$ constituem 80 a 90% dos monócitos circulantes enquanto que os monócitos $\text{CD14}^{\text{Low}}\text{CD16}^+$ constituem cerca de 10% dos monócitos circulantes. Os monócitos CD16^+ aumentam a sua frequência durante infecções, produzindo citocinas (Rocha *et al.*, 2012). Desta forma o aumento da produção de $\text{INF-}\gamma$ por esta

subpopulação de monócitos pode indicar uma ligeira activação destes nos indivíduos com Alzheimer, no entanto, não foram verificadas alterações significativas na percentagem de monócitos inflamatórios.

As alterações ao nível do sistema imune periférico não se resumem a alterações de fenótipos celulares mas também a alterações de citocinas produzidas por estas células. Rocha *et al.*, 2012, afirma que as citocinas podem ser usadas como biomarcadores de diagnóstico em demência. Foram encontrados níveis mais elevados de algumas citocinas em doentes de Alzheimer e DCL quando comparados com o grupo controlo, nomeadamente o G-CSF e a MIG. O G-CSF é membro da família dos factores de crescimento hematopoiético e promove a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas da linhagem mielóide. Recentemente esta citocina tem sido considerada um importante factor neurotrófico no sistema nervoso central, sendo amplamente expresso nesse órgão em doentes de Alzheimer (Ridwan *et al.*, 2012). Para além do aumento desta citocina ser descrito em vários estudos que incluem doentes de Alzheimer, esta chega a ser referida como dotada de efeitos benéficos nestes doentes em sinergia com outras moléculas. É referido que o G-CSF pode estar envolvido no recrutamento de microglia da medula óssea, sinaptogenese e neurogénesse (Cao *et al.*, 2011), pode diminuir os depósitos de β A (Li *et al.*, 2011) e também parece ter propriedades anti-inflamatórias que estão a ser exploradas em doenças como esclerose múltipla. Desta forma o seu aumento ao nível do sangue periférico pode constituir um biomarcador não só da doença de Alzheimer, como de demência, uma vez que também é encontrado aumentado nos indivíduos com DCL. Quanto à quimiocina MIG, esta pertence a uma subfamília de receptores de quimiocinas CXC, sendo a sua principal função o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação. MIG liga-se a um receptor que é selectivamente expresso em linfócitos T activados e é crítico na mediação da migração de linfócitos T em respostas imunes dependentes destes. A literatura não descreve alterações desta quimiocina em indivíduos com doença de Alzheimer, no entanto, a sinalização via um dos seus receptores (CXCR3) é referido como sendo crucial no recrutamento da microglia e um elemento essencial para a reorganização neuronal (Li *et al.*, 2006). Desta forma o aumento da quimiocina MIG (ligando do receptor CXCR3) pode indicar que existe um recrutamento células nestes doentes, incluindo células da microglia.

Por sua vez as quimiocinas MIP-1 β e IL-8 foram encontradas aumentadas em doentes com DCL. A MIP-1 β pertence a uma família das quimiocinas cisteína-cisteína

(CC). Tem como função atrair compostos inflamatórios para o local da inflamação e serve como co-activadora de macrófagos agindo em conjunto com o IFN- γ . O aumento desta quimiocina tem sido referido em indivíduos com doença de Alzheimer (Xia and Hyman, 1999) e da mesma forma que G-CSF é sugerido o seu uso como biomarcador. Xia *et al.*, 1999, refere também um aumento de IL-8 em doentes de Alzheimer, no entanto, neste caso foi encontrado um aumento desta citocina em doentes com DCL. A IL-8 estimula a capacidade dos neutrófilos e dos linfócitos T invadirem locais de inflamação e tecidos com danos. O facto de existir um aumento de MIP-1 β e IL-8 nos doentes com DCL, sugere um perfil mais pró-inflamatório em relação aos doentes de Alzheimer. No entanto, não se verificou uma activação muito forte das células T, como seria de esperar pelo aumento da concentração de IL-8 sérica.

CONCLUSÃO

Sendo a doença de Alzheimer uma doença neurodegenerativa com etiologia desconhecida, durante vários anos o estudo dos seus mecanismos patológicos incidiu no sistema nervoso central. Actualmente é inegável o importante papel do sistema imune endógeno ao sistema nervoso central, levado a cabo pela microglia, pelos astrócitos e inclusive pelos próprios neurónios. A presença de uma resposta imune crónica a nível central nestes doentes levou à procura de uma resposta imune a nível periférico. Existem evidências claras de alterações de componentes e mecanismos de acção no sistema imune periférico, no entanto, a forma como essas alterações se relacionam com a doença permanece desconhecida.

Os estudos efectuados nesta área incidem essencialmente em alterações de linfócitos T e produção de citocinas pró-inflamatórias, no entanto, este estudo demonstra que as células B apresentam alterações evidentes, não só pela diminuição do *pool* de células B totais mas também pela alteração das suas subpopulações e produção de citocinas. As alterações ao nível das suas subpopulações sugerem ainda uma possível disfunção dos processos de diferenciação nos doentes de Alzheimer que pode indicar uma activação e/ou desregulação do sistema imune periférico anterior ao aparecimento dos sintomas da doença. Para uma melhor compreensão do papel do sistema imune periférico na patologia da doença torna-se importante determinar se esta resposta periférica é uma causa ou uma consequência tardia da doença. As células B também parecem apresentar perfis distintos em ambos os grupos de doentes. Desta forma, doentes com DA parecem apresentar um perfil ligeiramente mais pró-inflamatório e activado, dada a expressão de CD69, CD40 e CCR1 enquanto os doentes com DCL para além de marcadores de inflamação (TGF- β , IL-6R e CXCR4) mostram um aumento de células B produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10. Estes dados levam a sugerir que as células B de indivíduos diagnosticados com doença de Alzheimer possam estar envolvidos na (neuro)imunologia desta doença enquanto as células B de indivíduos com DCL podem estar a tentar controlar a resposta imune e a restabelecer a homeostasia deste sistema.

A produção de TGF- β e IL-6R pelas células B de doentes com DCL parece estar a criar um ambiente favorável para a diferenciação de células T *naive* em células Th₁₇, produtoras de IL-17, que é uma citocina inflamatória que activa o NF- κ B. Este facto sugere alterações de vias de sinalização subjacentes às alterações patológicas da doença e que podem contribuir para o processo neurodegenerativo. Desta forma, seria importante determinar relações entre alterações ao nível do estado de activação do

sistema imune e vias de sinalização o que poderia levar a uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos da DA. A produção de IL-4 pelas células T auxiliares sugere também a presença de células Th₂, que potenciam uma resposta humoral e uma activação das células B. Esta evidência sugere a produção de anticorpos, possivelmente contra o péptido β A. Esta resposta parece atenuada, no entanto, uma potenciação de uma resposta Th₂ após imunização dos indivíduos com β A poderá ser a chave da *clearance* do péptido aberrante do organismo dos indivíduos com a doença. Esse é o objectivo dos grupos que tentam imunização através do DNA e não com o péptido propriamente dito. Os nossos resultados sugerem que essa resposta existe, mas provavelmente é insuficiente, tendo de ser potenciada para obter uma maior eficiência.

As células que normalmente exibem respostas mediadas por citotoxicidade, não se encontram muito activas. A expressão do receptor CRACC à superfície das células NK sugere alguma actividade citotóxica, enquanto as células T apresentam alguma actividade ao nível das células de memória. Estes factos sugerem que a resposta humoral e a produção de citocinas ganham uma maior importância que a resposta imune mediada por células. A produção de IFN- γ pelos monócitos inflamatórios em doentes com DCL pode sugerir um recrutamento de células T, no entanto, esperava-se uma maior percentagem destes monócitos em circulação e uma resposta mais agressiva quanto à produção de citocinas e estado de activação destas células. Este facto pode querer dizer que as funções dos monócitos do sangue periférico e dos “macrófagos endógenos ao sistema imune central” denominados de microglia são distintas e que apesar dos macrófagos periféricos mostrarem capacidades fagocíticas na β A *in vitro*, as suas funções *in vivo* podem não ser equivalentes.

O aumento de G-CSF e MIG no soro de indivíduos com DA e DCL em contraste com os controlos sugere um processo inflamatório que pode contribuir para a neurodegeneração, uma vez que estas quimiocinas atraem, granulócitos e linfócitos T para os locais de inflamação. No entanto, e contrariamente àquilo que se verifica com as células B, o aumento acentuado das quimiocinas IL-8 e MIP-1 β em doentes com DCL quando comparados com doentes de Alzheimer, demonstra um processo pró-inflamatório mais acentuado neste grupo de doentes. Este facto sugere que as quimiocinas IL-8 e MIP-1 β possam servir como possíveis biomarcadores capazes de distinguir entre DA e DCL.

Este estudo vem confirmar que existem alterações profundas ao nível do sistema imune periférico de doentes de Alzheimer, sugerindo pela primeira vez uma alteração

maioritária ao nível das células B periféricas. É essencial perceber estas alterações e as possíveis relações com vias de sinalização de forma a perceber a dimensão do envolvimento do sistema imune periférico nos mecanismos patológicos da doença. Muitas das alterações observadas coincidem com alterações características de inflamações crónicas, e de doenças auto-imunes que colocam o sistema imune periférico no centro da patologia. Para além disso, estas evidências levantam a questão do momento em que o sistema imune periférico é alterado, o que pode contribuir para um diagnóstico precoce da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2:675-680.
- Alaaeddine N, Hassan GS, Yacoub D, Mourad W. 2012. CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clinical & developmental immunology* 2012:490148.
- Alloul K, Sauriol L, Kennedy W, Laurier C, Tessier G, Novosel S, Contandriopoulos A. 1998. Alzheimer's disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact. *Arch Gerontol Geriatr* 27:189-221.
- Arlestig L, Rantapaa-Dahlqvist S. 2012. Polymorphisms of the genes encoding CD40 and growth differentiation factor 15 and in the 9p21.3 region in patients with rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *The Journal of rheumatology* 39:939-945.
- Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C. 2011. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* 3:1.
- Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. 2004. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* 3:169-176.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature medicine* 10 Suppl:S2-9.
- Britschgi M, Wyss-Coray T. 2007. Immune cells may fend off Alzheimer disease. *Nature medicine* 13:408-409.
- Cao C, Wang L, Lin X, Mamcarz M, Zhang C, Bai G, Nong J, Sussman S, Arendash G. 2011. Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. *J Alzheimers Dis* 25:323-335.
- Caraci F, Bosco P, Signorelli M, Spada RS, Cosentino FI, Toscano G, Bonforte C, Muratore S, Prestianni G, Panerai S, Giambirtone MC, Gulotta E, Romano C, Salluzzo MG, Nicoletti F, Copani A, Drago F, Aguglia E, Ferri R. 2012. The CC genotype of transforming growth factor-beta1 increases the risk of late-onset

- Alzheimer's disease and is associated with AD-related depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22:281-289.
- Carter CJ. 2007. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int* 50:12-38.
- Chung SH, Seki K, Choi BI, Kimura KB, Ito A, Fujikado N, Saijo S, Iwakura Y. 2010. CXC chemokine receptor 4 expressed in T cells plays an important role in the development of collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy* 12:R188.
- Citron BA, Dennis JS, Zeitlin RS, Echeverria V. 2008. Transcription factor Sp1 dysregulation in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research* 86:2499-2504.
- Couturier J, Page G, Morel M, Gontier C, Claude J, Pontcharraud R, Fauconneau B, Paccalin M. 2012. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21:1217-1231.
- Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B. 2012. 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *J Neurochem* 120 Suppl 1:186-193.
- Duan RS, Jin T, Yang X, Mix E, Adem A, Zhu J. 2007. Apolipoprotein E deficiency enhances the antigen-presenting capacity of Schwann cells. *Glia* 55:772-776.
- Elias-Sonnenschein LS, Viechtbauer W, Ramakers IH, Verhey FR, Visser PJ. 2011. Predictive value of APOE-epsilon4 allele for progression from MCI to AD-type dementia: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:1149-1156.
- Ertekin-Taner N. 2007. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol Clin* 25:611-667, v.
- Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, Lakos G. 2007. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *Journal of autoimmunity* 29:154-163.
- Fiala M, Veerhuis R. 2010. Biomarkers of inflammation and amyloid-beta phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease. *Experimental gerontology* 45:57-63.

- Finsen B, Owens T. 2011. Innate immune responses in central nervous system inflammation. *FEBS Lett* 585:3806-3812.
- Flirski M, Sobow T, Kloszewska I. 2012. Behavioural genetics of Alzheimer's disease: a comprehensive review. *Arch Med Sci* 7:195-210.
- Gate D, Rezai-Zadeh K, Jodry D, Rentsendorj A, Town T. 2010. Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity. *J Neural Transm* 117:961-970.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.
- Guenin-Mace L, Carrette F, Asperti-Boursin F, Le Bon A, Caleechurn L, Di Bartolo V, Fontanet A, Bismuth G, Demangel C. 2011. Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:12833-12838.
- Haapasalo A, Kovacs DM. 2011. The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25:3-28.
- Hall LJ, Clare S, Dougan G. 2010. NK cells influence both innate and adaptive immune responses after mucosal immunization with antigen and mucosal adjuvant. *J Immunol* 184:4327-4337.
- Hampel H, Broich K, Hoessler Y, Pantel J. 2009. Biological markers for early detection and pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 11:141-157.
- Henkel AW, Dittrich PS, Groemer TW, Lemke EA, Klingauf J, Klafki HW, Lewczuk P, Esselmann H, Schwille P, Kornhuber J, Wiltfang J. 2007. Immune complexes of auto-antibodies against A beta 1-42 peptides patrol cerebrospinal fluid of non-Alzheimer's patients. *Molecular psychiatry* 12:601-610.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 5:971-974.
- Janus C. 2003. Vaccines for Alzheimer's disease: how close are we? *CNS drugs* 17:457-474.
- Johnston H, Boutin H, Allan SM. 2011. Assessing the contribution of inflammation in models of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 39:886-890.
- Jozwik A, Landowski J, Bidzan L, Fulop T, Bryl E, Witkowski JM. 2012. Beta-amyloid peptides enhance the proliferative response of activated CD4CD28 lymphocytes from Alzheimer disease patients and from healthy elderly. *PLoS one* 7:e33276.

- Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, Ferlazzo G, Thiel A, Schmitt-Knosalla I, Romagnani C. 2010. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* 116:1299-1307.
- Jung S, Park YK, Lee H, Shin JH, Lee GR, Park SH. 2010. TGF-beta-treated antigen presenting cells suppress collagen- induced arthritis through the promotion of Th2 responses. *Experimental & molecular medicine* 42:187-194.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124:823-835.
- Koistinaho J, Malm T, Goldsteins G. 2011. Glycogen synthase kinase-3beta: a mediator of inflammation in Alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis* 2011:129753.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
- Laouar A, Manocha M, Haridas V, Manjunath N. 2008. Concurrent generation of effector and central memory CD8 T cells during vaccinia virus infection. *PLoS one* 3:e4089.
- Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. 2011. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 585:3770-3780.
- Lee VM, Brunden KR, Hutton M, Trojanowski JQ. 2012. Developing therapeutic approaches to tau, selected kinases, and related neuronal protein targets. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006437.
- Lemere CA, Maier M, Peng Y, Jiang L, Seabrook TJ. 2007. Novel Aβ immunogens: is shorter better? *Curr Alzheimer Res* 4:427-436.
- Li B, Gonzalez-Toledo ME, Piao CS, Gu A, Kelley RE, Zhao LR. 2011. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor reduce beta-amyloid deposits in the brains of APP/PS1 transgenic mice. *Alzheimer's research & therapy* 3:8.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC. 2010. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8:67-80.
- Li H, Gang Z, Yuling H, Luokun X, Jie X, Hao L, Li W, Chunsong H, Junyan L, Mingshen J, Youxin J, Feili G, Boquan J, Jinqian T. 2006. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol* 177:3644-3656.
- Liu Z, Zhu H, Fang GG, Walsh K, Mwamburi M, Wolozin B, Abdul-Hay SO, Ikezu T, Leissring MA, Qiu WQ. 2012. Characterization of insulin degrading enzyme

- and other amyloid-beta degrading proteases in human serum: a role in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 29:329-340.
- Luan J, Cui YZ, Zhang YY, Zhou XY, Zhang GL, Han JX. 2012. Effect of CXCR4 inhibitor AMD3100 on alkaline phosphatase activity and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bioscience trends* 6:63-69.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32:367-381.
- Magaki S, Yellon SM, Mueller C, Kirsch WM. 2008. Immunophenotypes in the circulation of patients with mild cognitive impairment. *Journal of psychiatric research* 42:240-246.
- Martens GW, Arikan MC, Lee J, Ren F, Vallerskog T, Kornfeld H. 2008. Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis. *Infection and immunity* 76:3464-3472.
- Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111:1275-1308.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.
- Mayeux R, Schupf N. 2011. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: plasma A β 40 and A β 42, and genetic variants. *Neurobiology of aging* 32 Suppl 1:S10-19.
- Mecocci P, Polidori MC. 2011. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:631-638.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Mizoguchi A, Bhan AK. 2006. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 176:705-710.
- Moller B, Aeberli D, Egli S, Fuhrer M, Vajtai I, Vogelin E, Ziswiler HR, Dahinden CA, Villiger PM. 2009. Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 11:R62.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL. 2003. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 112:415-422.

- Morelli L, Giambartolomei GH, Prat MI, Castano EM. 1999. Internalization and resistance to degradation of Alzheimer's A beta 1-42 at nanomolar concentrations in THP-1 human monocytic cell line. *Neuroscience letters* 262:5-8.
- Mrak RE, Griffin WS. 2005. Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8:369-375.
- Muller UC, Zheng H. 2012. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006288.
- Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC. 2012. Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol* 3:27.
- Nishimoto N, Kishimoto T. 2008. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handbook of experimental pharmacology*:151-160.
- Parachikova A, Agadjanyan MG, Cribbs DH, Blurton-Jones M, Perreau V, Rogers J, Beach TG, Cotman CW. 2007. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease. *Neurobiology of aging* 28:1821-1833.
- Peckham D, Andersen-Nissen E, Finkelman FD, Stunz LL, Ashman RF. 2001. Difference in apoptosis induction between surface IgD and IgM. *International immunology* 13:285-295.
- Pellicano M, Bulati M, Buffa S, Barbagallo M, Di Prima A, Misiano G, Picone P, Di Carlo M, Nuzzo D, Candore G, Vasto S, Lio D, Caruso C, Colonna-Romano G. 2010. Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production. *J Alzheimers Dis* 21:181-192.
- Reale M, Greig NH, Kamal MA. 2009. Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry* 9:1229-1241.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR. 2008. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44:2051-2057.
- Ridwan S, Bauer H, Frauenknecht K, von Pein H, Sommer CJ. 2012. Distribution of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and its receptor alpha-subunit in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *J Neural Transm*.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. 2003. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1-24.

- Rocha NP, Teixeira AL, Coelho FM, Caramelli P, Guimaraes HC, Barbosa IG, da Silva TA, Mukhamedyarov MA, Zefirov AL, Rizvanov AA, Kiyasov AP, Vieira LB, Janka Z, Palotas A, Reis HJ. 2012. Peripheral blood mono-nuclear cells derived from Alzheimer's disease patients show elevated baseline levels of secreted cytokines but resist stimulation with beta-amyloid peptide. *Molecular and cellular neurosciences* 49:77-84.
- Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Perez-Venegas JJ, Rodriguez C, Brieva JA. 2010. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis research & therapy* 12:R108.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 24:167-176.
- Schliebs R, Arendt T. 2010. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555-563.
- Schwartz M, Shechter R. 2010. Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology* 6:405-410.
- Stark S, Watzl C. 2006. 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *International immunology* 18:241-247.
- Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. 2010. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunological reviews* 236:83-94.
- Szekanecz Z, Koch AE, Tak PP. 2011. Chemokine and chemokine receptor blockade in arthritis, a prototype of immune-mediated inflammatory diseases. *The Netherlands journal of medicine* 69:356-366.
- Takata K, Kitamura Y. 2012. Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Tangle Formation, Amyloid-beta, and Microglia in Alzheimer's Disease. *Journal of pharmacological sciences*.
- Takeda K, Akira S. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6:733-742.
- Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. 2012. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *Journal of autoimmunity*.
- Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. 2007. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26:205-213.

- Town T, Vendrame M, Patel A, Poetter D, DelleDonne A, Mori T, Smeed R, Crawford F, Klein T, Tan J, Mullan M. 2002. Reduced Th1 and enhanced Th2 immunity after immunization with Alzheimer's beta-amyloid(1-42). *Journal of neuroimmunology* 132:49-59.
- Trapani JA. 2012. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell death and differentiation* 19:21-27.
- Tuppo EE, Arias HR. 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB, Brenner MB. 2005. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 437:906-910.
- Vazquez BN, Laguna T, Carabana J, Krangel MS, Lauzurica P. 2009. CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements. *J Immunol* 183:6513-6521.
- Vojdani A, Lambert J. 2011a. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2011:927294.
- Vojdani A, Lambert J. 2011b. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part II. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2011:984965.
- Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, Arrighi HM. 2011. Prevalence of Apolipoprotein E4 Genotype and Homozygotes (APOE e4/4) among Patients Diagnosed with Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* 38:1-17.
- Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. 2010. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39:115-123.
- Wheater G, Hogan VE, Teng YK, Tekstra J, Lafeber FP, Huizinga TW, Bijlsma JW, Francis RM, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. 2011. Suppression of bone turnover by B-cell depletion in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22:3067-3072.

- Wren L, Parsons MS, Isitman G, Center RJ, Kelleher AD, Stratov I, Bernard NF, Kent SJ. 2012. Influence of Cytokines on HIV-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activation Profile of Natural Killer Cells. *PloS one* 7:e38580.
- Wyss-Coray T, Rogers J. 2012. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006346.
- Xia MQ, Hyman BT. 1999. Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *Journal of neurovirology* 5:32-41.
- Xue SR, Xu DH, Yang XX, Dong WL. 2009. Alterations in lymphocyte subset patterns and co-stimulatory molecules in patients with Alzheimer disease. *Chinese medical journal* 122:1469-1472.
- Yamasaki T, Muranaka H, Kaseda Y, Mimori Y, Tobimatsu S. 2011. Understanding the Pathophysiology of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Mini Review on fMRI and ERP Studies. *Neurol Res Int* 2012:719056.

ANEXOS

Anexo I – Diferenças não significativas (ns) entre células B, suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células B	DA	DCL	CTL
Produção Total de TGF-β	1,6±0,2	1,7±0,2	1,0±0,3
Subpopulações de células B			
CD27-IgD+	43,7±5,8	48,5±4,1	62,3±3,4
CD27+IgD+	21,7±2,9	12,8±1,8	19,3±2,6
CD27+IgD-	26,1±3,2	27,7±2,8	14,3±2,0
CD27-IgD-	8,5±1,1	11,5±1,3	9,1±1,0
Produção de IL-10 nas Subpopulações de células B			
CD27+IgD-	13,8±3,9	7,7±0,9	7,1±1,7
CD27-IgD-	12,0±3,0	9,7±2,2	9,7±2,5
Produção de TGF-β nas subpopulações de células B			
CD27+IgD-	3,6±0,9	3,4±0,7	1,2±0,3
IL-6R	4,9±1,2	5,4±1,1	4,06±1,1
Plasmócitos	1,1±0,2	1,8±0,5	1,05±0,4
CD19+BAFF-R+	89,0±1,1	91,5±1,9	85,8±2,9
CD19+CXCR3+	3,6±0,8	5,3±1,2	4,6±1,5

Anexo II – Diferenças não significativas (ns) entre células B, suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células B	DA	DCL	CTL
Produção Total de IL-10	4830±343,1	5033±215,3	4692±310,3
Produção Total de TGF-β	564,8±63,7	555,5±37,9	482,1±57,3
Produção de IL-10 nas Subpopulações de células B			
CD27+IgD-	1828±278,8	2081±183,3	1857±208,9
CD27-IgD-	1642±234,5	2099±188,3	1399±241,1
Produção de TGF-β nas subpopulações de células B			
CD27-IgD+	116,6±15,05	132,9±9,8	125,4±13,91
CD27+IgD+	155,8±16,0	183,2±12,9	177,7±25,55
CD27+IgD-	167,5±15,97	185,7±6,6	166,2±16,1
CD27-IgD-	148,4±15,56	161,6±8,1	160±21,0
CD19+CD69+	2746±673,3	3741±969,2	4416±233,9
CD19+BAFF-R+	12106±2024	15890±663,1	11094±1516
CD19+CD40+	1135±86,4	1035±89,9	1044±162,2
CD19+CD95+	5067±463,6	5516±495,5	7463±420,4
CD19+CCR1+	2965±161,8	4834±752,6	3556±433,1
CD19+CXCR3+	7821±1169	5865±589,6	5353±832,0
CD19+CXCR4+	10596±1466	4381±1592	11069±1421

Anexo III – Diferenças não significativas (ns) entre células T auxiliares (CD4+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

	DA	DCL	CTL
Células TCD3+ Totais	71,7±3,2	64,1±5,4	70,5±1,8
Células T auxiliares	DA	DCL	CTL
CD4 Totais	45,7±3,9	37,1±2,5	43,5±2,2
CD4+CD28+	82,2±9,2	92,5±1,2	86,6±4,1
CD4+FoxP3-CD25+	3,7±0,5	5,5±1,0	3,6±0,4
CD4+FoxP3+CD25+	0,3±0,0	0,4±0,0	0,3±0,1
CD4+FoxP3-CD25-	92,3±1,5	90,4±1,3	91,0±2,0
CD4+FoxP3+CD25-	3,8±1,4	3,7±0,8	3,7±1,3
CD4+CD25-	93,4±1,1	92,9±1,5	94,2±0,5
CD4+INF-γ+	1,8±0,8	1,4±0,3	1,4±0,2
CD4+CD28+IL-4+	1,5±0,2	1,3±0,2	0,9±0,2
CD4+CD28+IL17a+	0,5±0,1	0,5±0,0	0,2±0,1
CD4+CD28+INF-γ+	1,0±0,4	0,8±0,1	1,0±0,3

Anexo IV – Diferenças não significativas (ns) entre células T auxiliares (CD4+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células T auxiliares	DA	DCL	CTL
CD4+IL4+	951,6±119,4	1228±48,4	791,2±204,9
CD4+IL-17A+	316,6±13,4	317,3±10,8	298,1±15,2
CD4+INF-γ+	987±66,5	1126±105,7	1372±159,3
CD4+CD28+IL-17A+	319,1±34,6	350,9±21,1	290,9±28,2
CD4+CD28+INF-γ+	970±73,7	1075±50,2	1292±178,9

Anexo V – Diferenças não significativas (ns) entre células T citotóxicas (CD8+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células T citotóxicas	DA	DCL	CTL
CD8 Totais	16,4±1,8	19,5±3,7	22,4±1,8
CD8+CD28 Elevado Granzima B+	40,6±5,8	32,8±4,6	36,4±5,4
CD8+CD28 Baixo Granzima B+	53,4±4,2	64,8±4,5	49,2±6,1
CD8+Granzima B+	37,3±5,9	33,4±3,3	51,1±6,6
CD8+IL-10+	0,5±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0
CD8+INF-γ+	0,5±0,2	0,3±0,0	0,4±0,0
CD8+CD28+IL-10+	2,7±1,5	1,5±1,2	0,3±0,1
CD8+CD28+IL-10-	34,3±4,1	34,0±4,5	37,3±5,0
CD8+CD28+INF-γ+	4,3±2,6	1,1±0,3	0,5±0,2
CD8+CD28+INF-γ-	41,8±4,9	31,8±4,0	35,1±5,1
CD8+CD62L+INF-γ-	31,1±5,0	27,7±3,8	27,8±4,3
CD8+CD62L+IL-10+	0,5±0,2	2,1±1,7	0,3±0,0
CD8+CD62L+IL-10-	31,47±4,7	27,6±4,4	28,2±4,6
Subpopulações de Células T Citotóxicas			
CD27-CD62L+	5,5±1,4	9,7±2,6	7,3±1,8
CD27+CD62L+	26,3±4,3	21,4±3,4	21,2±4,2
CD27+CD62L-	26,5±3,1	20,1±1,6	22,8±2,9
CD27-CD62L-	41,6±4,8	46,8±3,7	55,8±4,1
Produção de Granzima B nas Subpopulações de Células T Citotóxicas			
CD27-CD62L+	26,6±5,5	34,9±5,5	40,2±8,0
CD27+CD62L+	6,3±1,0	5,4±0,7	6,5±1,6
CD27+CD62L-	15,3±5,4	15,4±2,4	15,3±3,3
CD27-CD62L-	52,3±6,9	57,1±5,8	53,9±6,1
Produção de CD28 nas Subpopulações de Células T Citotóxicas			
CD27-CD62L+	19,1±4,5	14,3±3,9	20,0±6,4
CD27+CD62L+	90,9±1,6	81,8±4,2	87,7±3,2
CD27+CD62L-	60,0±5,7	51,1±5,2	57,6±6,9
CD27-CD62L-	7,1±4,5	5,1±0,9	3,9±0,6

Anexo VI – Diferenças não significativas (ns) entre células T citotóxicas (CD8+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células T citotóxicas	DA	DCL	CTL
CD8+CD28 Elevado Granzima B+			
	645,6±144,7	549,5±48,1	399,6±37,1
CD8+CD28 Baixo Granzima B+			
	1659±454,6	1375±212,7	2048±383,3
CD8+Granzima B+			
	2461±571,5	4168±742,2	3361±702,3
CD8+INF-γ+			
	1681±277,1	1456±201,8	2032±±307,6
CD8+CD28+IL-10+			
	420,6±39,3	401,4±38,9	671,1±119,9
CD8+CD28+INF-γ+			
	1189±67,6	1368±149,5	1892±215,8
CD8+CD62L+IL-10+			
	521,6±129,7	383,0±30,5	659,2±103,4
Produção de Granzima B nas Subpopulações de Células T Citotóxicas			
CD27-CD62L+	2517±1235	1684±418,6	2889±969,6
CD27+CD62L+	704,3±186,5	605,4±59,6	459,5±48,3
CD27+CD62L-	683,3±135,2	684,6±77,1	418,5±35,8
CD27-CD62L-	1964±622,8	1727±278,8	2367±617,0
Produção de CD28 nas Subpopulações de Células T Citotóxicas			
CD27-CD62L+	1922±775,0	1420±138,9	1814±899,2
CD27+CD62L+	7294±767,2	7038±338,3	5233±980,6
CD27+CD62L-	6834±1258	5252±1203	5523±945,6
CD27-CD62L-	1209±203,3	1124±95,04	815,4±177,5

Anexo VII – Diferenças não significativas (ns) entre células NK (CD3-CD56+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células NK	DA	DCL	CTL
NK citotóxicas			
NK pró-inflamatórias	1,5±0,3	1,1±0,2	1,6±0,5
NK reguladoras	1,6±0,4	1,0±0,2	1,3±0,3
NK Citotóxicas CD62L+	15,0±2,2	12,6±2,9	7,7±2,7
NK Citotóxicas CD62L-	85,0±2,2	89,4±2,3	92,3±2,7
NK citotóxicas			
Granzima B	4,0±0,8	3,9±0,8	3,3±0,3
CRACC	21,1±11,7	1,6±0,5	6,9±3,2
NK citotóxicas CD62L+			
Granzima B	6,7±1,7	6,8±1,0	5,6±3,3
NK citotóxicas CD62L-			
Granzima B	4,2±1,3	4,4±1,7	1,2±0,5
NK naive			
Granzima B	2,0±0,7	0,8±0,4	2,0±0,7
CRACC	0,7±0,2	1,6±0,7	1,1±0,5
NK pró-inflamatórias			
Granzima B	4,3±1,6	4,7±1,4	3,6±1,1
CRACC	4,3±0,6	5,4±0,7	3,3±0,6
NK reguladoras			
Granzima B	0,6±0,3	0,0±0,0	0,1±0,0
CRACC	1,2±0,4	3,8±0,9	0,8±0,3
CD107A+NK	0,4±0,1	0,2±0,0	0,3±0,0
CD244+NK	0,8±0,2	0,4±0,0	0,7±0,2
INF-γ+NK	0,5±0,2	0,1±0,0	0,3±0,1

Anexo VIII – Diferenças não significativas (ns) entre células NK (CD3-CD56+), suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Células NK	DA	DCL	CTL
NK citotóxicas			
Granzima B	499,3±107,8	488,9±120,2	529±59,1
CRACC	889,6±81,7	730,5±42,2	787,5±147,1
NK citotóxicas CD62L+			
Granzima B	1636±526,7	2361±740,0	2139±861,0
CRACC	1457±141,3	1258±86,2	866,1±284,9
NK citotóxicas CD62L-			
Granzima B	3199±952,8	2735±632,5	4064±784,7
NK naive			
Granzima B	175,3±29,9	149,8±9,8	203,0±28,9
CRACC	467,4±31,2	544,4±46,3	424,0±61,6
NK pró-inflamatórias			
Granzima B	402,5±103,3	210,3±37,2	712,5±318,5
CRACC	857,1±115,2	633,1±71,8	814,6±161,2
NK reguladoras			
CRACC	410,8±49,1	384,4±68,1	504,0±86,0
CD107A+NK	7686±4534	744,6±78,1	1320±328,7
CD244+NK	558,0±78,4	480,6±60,7	1740±586,9

Anexo IX – Diferenças não significativas (ns) entre Monócitos, suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Monócitos	DA	DCL	CTL
Clássicos	83,6±2,9	82,4±2,3	82,8±2,2
Inflamatórios	2,6±0,5	3,4±0,7	2,3±0,4
Intermediários	4,9±0,8	6,7±0,7	4,8±0,7
Clássicos			
CD68+	2,3±0,6	4,3±1,0	3,8±1,0
INF-γ+	1,8±0,4	2,0±0,4	1,6±0,2
IL-4+	4,2±1,4	2,1±0,4	1,7±0,2
Inflamatórios			
CD68+	6,2±1,4	4,6±0,9	4,8±0,7
IL-4+	9,0±1,6	5,5±1,4	6,0±1,0
Intermediários			
CD68+	6,2±1,1	5,6±0,9	6,0±1,4
INF-γ+	34,1±10,4	46,5±9,2	35,8±13,2
IL-4+	7,9±3,6	3,0±0,6	5,7±1,0

Anexo X – Diferenças não significativas (ns) entre Monócitos, suas subpopulações, expressão de receptores à sua superfície e produção de citocinas nos diferentes grupos. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (IMF) e representam a média±e.p.m. Legenda: [DA] – Doentes de Alzheimer; [DCL] – Défice Cognitivo Ligeiro; [CTL] – Grupo Controlo

Monócitos	DA	DCL	CTL
Clássicos			
CD68+	1807±438,4	3152±594,5	2078±313,8
INF-γ+	1315±240,2	1988±247,2	1291±292,9
IL-4+	1659±617,7	1229±154,3	1480±1002
Inflamatórios			
CD68+	1801±462,2	2713±462,8	1922±329,2
IL-4+	1683±631,0	1214±152,1	1342±798,0
Intermediários			
CD68+	2142±508,2	3458±600,4	2446±436,4
INF-γ+	2237±518,0	3464±388,9	1922±499,6
IL-4+	2144±972,	1393±188,5	1448±933,2