



Ana Sofia Alberto e Silva

A BACE1 como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Sofia Alberto e Silva

A BACE1 como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Sofia Alberto e Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011159891, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

(Ana Sofia Alberto e Silva)

A Tutora

(Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos)

A Aluna

(Ana Sofia Alberto e Silva)

AGRADECIMENTOS

À minha prezada orientadora, Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos, por toda a disponibilidade, atenção e sugestões, um Muito Obrigada.

À minha família, pelo apoio diário, e por acreditar em mim e nas minhas capacidades, sempre. Sem vocês, nada disto seria possível.

A todos os meus amigos, pela curiosidade e apoio constantes.

A todos os Professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por todo o esforço e dedicação na transmissão de conhecimentos.

A todos os Auxiliares da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela constante boa disposição e todo o apoio prestado.

A Coimbra... A cidade mágica dos estudantes, a nossa inspiração! Muito Obrigada!

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 2 |
| RESUMO | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. DEMÊNCIA | 6 |
| 3. DOENÇA DE ALZHEIMER | 7 |
| 3.1. CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA | 7 |
| 3.2. DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ESTÁDIOS DA DOENÇA | 7 |
| 3.3. FISIOPATOLOGIA E MECANISMOS MOLECULARES DA DOENÇA | 9 |
| 3.4. COMPONENTE GENÉTICA DA DA | 13 |
| 3.5. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO | 15 |
| 4. TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER | 17 |
| 4.1. TERAPÊUTICA NÃO FARMACOLÓGICA | 17 |
| 4.2. TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA SINTOMÁTICA | 17 |
| 4.3. NOVAS ABORDAGENS FARMACOTERAPÊUTICAS | 18 |
| 4.3.1. A BACE1 COMO ALVO TERAPÊUTICO NA DA | 21 |
| 4.3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA BACE1 | 21 |
| 4.3.1.2. INIBIÇÃO DA BACE1 | 22 |
| 5. CONCLUSÃO | 25 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 27 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- α 7nAChR** – Subunidade α -7 do recetor nicotínico da acetilcolina
(*α -7 nicotinic acetylcholine receptor subunit*)
- A β** – β -amilóide (*amyloid- β*)
- AChE** – Acetilcolinesterase
- ADAM** – Uma desintegrina da família das metaloproteínases (*a disintegrin- and metalloproteinase-family enzyme*)
- APH-I** – *Anterior pharynx-defective 1*
- ApoE** – Apolipoproteína E
- APP** – Proteína precursora amilóide (*amyloid precursor protein*)
- BACE1** – Enzima 1 responsável pela clivagem da APP no local β (*β -site APP-cleaving enzyme 1*)
- BHE** – Barreira hemato-encefálica
- BuChE** – Butirilcolinesterase
- CRI** – Recetor do complemento tipo 1 (*complement receptor 1*)
- CT** – Tomografia computadorizada (*computed tomography*)
- CYP450** – Citocromo P450
- DA** – Doença de Alzheimer
- FAD** – Doença de Alzheimer familiar (*familiar Alzheimer's Disease*)
- FPRL** – *Formyl peptide receptor-like*
- HDL** – Lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)
- IMSH** – *International Meeting on Simulation in Healthcare*
- JIPI** – Proteína de interação com a cinase c-Jun N-terminal 1 (*c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1*)
- kDA** – Quilodalton
- KLC** – Cadeia leve da cinesina (*kinesin light chain*)
- LCR** – Líquido cefalorraquidiano
- LOAD** – Doença de Alzheimer de início tardio (*late-onset Alzheimer's Disease*)
- LP** – Libertação prolongada
- LRP** – Proteína relacionada com o recetor da lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein receptor-related protein*)
- MCI** – Défice cognitivo ligeiro (*mild cognitive impairment*)
- MMSE** – Mini-exame do estado mental (*mini-mental state examination*)
- MRI** – Imagiologia por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*)
- NFTs** – Tranças neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*)
- NMDA** – N-metil-D-aspartato
- PEN2** – Potenciador da presenilina 2 (*presenilin enhancer 2*)
- PET** – Tomografia por emissão de positrões (*positron emission tomography*)
- PS** – Presinilina
- RAGE** – Recetor dos produtos finais de glicosilação avançada (*receptor for advanced glycation end products*)
- RE** – Retículo endoplasmático
- sAPP** – Fragmento solúvel da proteína precursora amilóide (*soluble amyloid precursor protein*)
- SNC** – Sistema nervoso central
- SORLI** – Recetor relacionado com a sortilina (*sortilin-related receptor*)
- TREM2** - Recetor de “disparo” expresso nas células mielóides 2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*)

RESUMO

A presente monografia tem como tema: “A BACE1 como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer”. Atualmente, a Doença de Alzheimer (DA) é uma das doenças mais estudadas na área das neurociências e que maiores preocupações tem levantado, quer na comunidade científica, quer na sociedade em geral. A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, crônica, com um início insidioso e que atualmente não tem cura. A prevalência da DA tem vindo a aumentar na população, sendo considerada a principal causa de demência da atualidade.

A DA teve o seu primeiro caso oficialmente diagnosticado em 1906 por Alois Alzheimer. Após décadas de estudo, os dois principais marcos desta patologia continuam a ser as placas extracelulares de peptídeo β -amilóide e as tranças neurofibrilares intracelulares de proteína tau hiperfosforilada, ambos presentes no tecido cerebral.

Esta doença tem duas principais formas de manifestação: a forma familiar, que afeta os indivíduos numa fase mais precoce da vida (~45 anos) e a forma esporádica, a mais comum, que afeta predominantemente a população mais idosa (>60 anos).

Os principais sintomas da doença podem incluir perdas de memória, começando pela memória a curto prazo, falhas de linguagem, descoordenação motora, incontinência e total dependência de outrem para a realização das tarefas quotidianas mais básicas.

Atualmente, várias técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas e já se consegue fazer um diagnóstico de DA com 90% de confiança. Só é possível fazer um diagnóstico 100% confiável através de exames histológicos *post mortem*.

A terapêutica farmacológica atualmente disponível assenta em fármacos que controlam a sintomatologia da doença. É de extrema urgência e importância compreender os mecanismos moleculares por detrás desta patologia, quer para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico cada vez mais precisas e robustas, quer para o desenvolvimento de fármacos direcionados aos alvos cruciais na patogénese da doença. Atualmente estão a ser estudados diversos fármacos modificadores da doença e alguns deles estão já em ensaios clínicos. Os fármacos que estão a receber mais atenção pela comunidade científica são aqueles que impedem a elevação da concentração de $A\beta$ a nível cerebral. É neste contexto que surge a BACE1, uma enzima com atividade β -secretase que está implicada na via amiloidogénica desta doença, levando, portanto, à formação do peptídeo $A\beta$. Ao serem desenvolvidos inibidores desta enzima, reduzir-se-á significativamente os níveis deste peptídeo neurotóxico, levando a melhorias no controlo da progressão da doença.

ABSTRACT

The current monograph has as its theme: “The BACE1 as therapeutic target in Alzheimer’s Disease”. Nowadays, Alzheimer’s Disease (AD) is one of the most studied diseases in the neuroscience field and it has been raising the biggest concerns, both in scientific community and in global society. AD is a progressive, chronic and neurodegenerative disease that presents an insidious onset, and currently it has no cure. The prevalence of AD in the population has been rising and it is now considered the main cause of dementia.

AD had its first case officially diagnosed in 1906 by Alois Alzheimer. After decades of study, the two main hallmarks of this pathology are still the extracellular plaques of the β -amyloid peptide and the intracellular neurofibrillary tangles of the hyperphosphorylated tau protein, both present in cerebral tissue.

This disease has two main forms of expression: the familiar form, that affects individuals at an early period of their lifetime (~45 years) and the sporadic form, the most common, that predominantly affects the elderly people (>60 years).

The disease most common symptoms may include memory loss, starting with the short term memory, language flaws, motor incoordination, incontinence and a total dependence on another to do the most basic daily tasks.

Nowadays, several diagnostic techniques have been being developed and it is already possible to make an AD diagnostic with an accuracy of 90%. The only way of making a 100% reliable AD diagnostic is through post mortem histologic exams.

The current available pharmacologic therapies rely on drugs that control the diseases’ symptomatology. It is of extremely importance to understand the molecular mechanisms behind this pathology, both for the development of more accurate and robust diagnostic techniques as also for the development of drugs directed to crucial targets involved in the disease pathogenesis. It is currently being studied several drug modifiers of the disease and some of them are already in clinical trials. The drugs that are receiving more attention by the scientific community are the ones that prevent the high concentration of $A\beta$ peptide at cerebral level. In this context BACE1 arises, an enzyme with β -secretase activity implicated in the amyloidogenic pathway of the disease, leading to the formation of $A\beta$ peptide. By developing BACE1 inhibitors, the levels of this neurotoxic peptide will be significantly reduced, leading to improvements in the control of disease progression.

I. INTRODUÇÃO

A esperança média de vida da população está a crescer continuamente nos países desenvolvidos, tornando a população crescentemente idosa. Mesmo que isto seja uma realidade favorável, também traz consequências indesejadas, tais como um crescente número de doenças, incluindo a DA. Estima-se que a DA duplique a sua frequência nos próximos 20 anos e que 115,4 milhões de pessoas sofram desta patologia em 2050. Além disto, enquanto outras doenças, como as doenças coronárias, têm diminuído nos últimos anos, as mortes associadas à DA entre 2000 e 2010 aumentaram 68% (Alberdi *et al.*, 2016).

Relativamente a Portugal, dados de 2015 indicam que o número estimado de Portugueses com mais de 60 anos e com demência é de 160287, o que corresponde a 5,91% deste universo populacional. Sabendo que a DA representa 50-70% dos casos, existirão entre 80144 e 112201 doentes. Por outro lado, dados da *International Meeting on Simulation in Healthcare*, IMSH (conferência científica internacional que explora as últimas inovações e melhores práticas na simulação em cuidados de saúde) indicam que estarão diagnosticados e a receber fármacos anti-demenciais cerca de 76250 doentes, representando um encargo financeiro de 37 milhões de euros por ano (Santana *et al.*, 2015).

Mesmo que se acredite que a DA seja um resultado de combinação genética, fatores ambientais e de estilo de vida, os eventos iniciais que fazem com que uma pessoa desenvolva esta demência permanecem ainda desconhecidos. Acredita-se que o método mais efetivo para controlar a progressão da DA seja baseado num diagnóstico precoce e numa boa estratégia de gestão da doença desde o início do declínio cognitivo. No entanto, hoje em dia, o diagnóstico é maioritariamente realizado usando testes psicológicos que se tornam positivos quando a doença se torna praticamente irreversível. Por outro lado, não existem ainda fármacos com o potencial de prevenir a progressão da doença. A esperança média de vida dos doentes diagnosticados com DA é, atualmente, inferior a 7 anos (Alberdi *et al.*, 2016).

2. DEMÊNCIA

A demência é uma síndrome que se caracteriza pelo declínio progressivo e global das funções cognitivas, sem haver um comprometimento agudo do estado de consciência do indivíduo. O facto de envolver múltiplas capacidades cerebrais distingue-a de outras enfermidades, tais como a amnésia e afasia, que afetam uma função cognitiva específica (memória e linguagem, respetivamente) (Alzheimer's Disease International, 2016; Squire et al., 2013).

Assim, a demência pode afetar a memória, raciocínio, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e capacidade de aprendizagem e julgamento. A deterioração da função cognitiva é comumente acompanhada (e ocasionalmente precedida) pela deterioração do controlo emocional, comportamento social e/ou motivação. A forma como cada pessoa é afetada pela demência varia; esta não tem fronteiras sociais, económicas, éticas ou geográficas. Surge, no entanto, mais frequentemente, em pessoas idosas, geralmente a partir dos 65 anos, estando entre as maiores causas de incapacidade e dependência da população idosa a nível mundial (Alzheimer's Disease International, 2016; WHO, 2016).

São conhecidas aproximadamente 50 patologias que causam demência. A maior parte delas são naturalmente progressivas, aumentando a severidade ao longo do tempo. A idade de começo e progressão dos sintomas diferem drasticamente entre as principais doenças que causam demência. A maior parte delas têm um começo insidioso e desenvolvem-se lentamente, por vezes durante vários anos (Squire et al., 2013).

As formas *major* de demência incluem a doença de Alzheimer, a doença de Huntington, a doença de Parkinson, a demência frontotemporal, a demência vascular e a demência de Corpos de Lewy, embora as fronteiras entre as diferentes formas sejam indefinidas e coexistam frequentemente formas mistas (Squire et al., 2013; WHO, 2016).

3. DOENÇA DE ALZHEIMER

3.1. CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA

O primeiro caso reportado de DA remonta ao ano de 1901, quando Alois Alzheimer (1864-1915), um psiquiatra e neuropatologista alemão, conheceu Auguste Deter, uma senhora de 51 anos. Esta doente sofria de uma redução progressiva da memória a curto prazo, apresentava comportamentos estranhos e a sua condição rapidamente piorou para demência severa. Dois anos após ter sido observada pela primeira vez, já se encontrava acamada, incontinente e com uma imobilidade acentuada. Deter foi ficando progressivamente desorientada e delirante, necessitando de assistência para ser alimentada e ficando impossibilitada de falar. Acabou por falecer em 1906 (Biography.com Editors, 2016).

Após o falecimento de Deter, Alzheimer estudou pormenorizadamente o cérebro desta doente a nível morfológico e histológico, tendo identificado certas condições patológicas: a diminuição do tamanho do córtex; a presença de agregados intracelulares anormais (e que mais tarde se demonstrou serem compostos de formas clivadas e hiperfosforiladas de proteína tau) e agregados extracelulares, compostos por processos neuronais distróficos a envolver uma “substância especial no córtex”. Esta substância especial foi isolada e purificada em 1984 por Glenner e Wong. Estes investigadores demonstraram que esta substância era constituída maioritariamente por um peptídeo de 4,2 kDa com 40 ou 42 aminoácidos de comprimento. O peptídeo isolado passou a ser conhecido, então, como o peptídeo A β , uma abreviatura para peptídeo β -amilóide. Glenner e Wong suspeitaram que este peptídeo era proveniente de um precursor maior. A sua suposição foi verificada pouco tempo depois, quando a proteína precursora amilóide (APP) foi clonada, em 1987. (Biography.com Editors, 2016; Hippus e Neundörfer, 2003; O'Brien e Wong, 2011).

As placas neuríticas, constituídas pelo peptídeo A β , e os aglomerados intracelulares, constituídos por proteína tau, eram suficientemente distintas para garantir um diagnóstico de demência senil a Auguste Deter. Mas tarde, esta demência senil ficou conhecida por DA (Biography.com Editors, 2016).

3.2. DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ESTÁDIOS DA DOENÇA

A DA é uma doença progressiva, irreversível e degenerativa que afeta extensas áreas cerebrais do córtex cerebral e hipocampo. As primeiras anomalias são detetadas no tecido

cerebral que envolve os lobos frontal e temporal, e depois lentamente avançam para outras áreas do neocórtex a velocidades que variam consideravelmente entre indivíduos.

A doença tem uma prevalência estimada de 10-30% na população com mais de 65 anos, com uma incidência de 1-3%. A maior parte dos doentes com DA (>95%) desenvolve a forma esporádica da doença, caracterizada por ter um início tardio (>60 anos), e resulta da falha da remoção do peptídeo β -amilóide do parênquima cerebral. Por outro lado, uma pequena proporção de doentes (<1%) tem herdado mutações em genes que afetam o processamento do peptídeo β -amilóide e desenvolvem a doença numa idade muito mais precoce (~45 anos). Clinicamente, as formas esporádica e familiar da DA são comparáveis, incluindo a taxa de progressão da doença e perfil de biomarcadores (Masters *et al.*, 2015).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da DA podem dividir-se em dois principais tipos: não modificáveis e modificáveis. Dentro dos fatores de risco não modificáveis, a idade é o fator mais preponderante (quanto maior a idade do indivíduo, maior é o risco de vir a desenvolver da doença). Outros fatores de risco não modificáveis são o género feminino, genes de risco/suscetibilidade (alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E – ApoE), a história familiar (mutações genéticas nos genes da APP, Presinilina 1 e Presinilina 2) e a Síndrome de Down. Relativamente aos fatores de risco modificáveis, podem ser destacados o baixo nível de literacia, a doença vascular (níveis elevados de colesterol, hipertensão, aterosclerose, doença coronária), a diabetes, o tabagismo, a obesidade e o consumo de álcool. Alguns estudos sugerem um papel benéfico de fatores psicossociais (por exemplo, exercício físico e atividade mental) (Blennow *et al.*, 2006; Citron, 2010).

As pessoas que sofrem de DA mostram sintomas de diversos tipos e em diferentes graus, dependendo do nível de progressão da demência. Estes sintomas podem ser distinguidos em quatro principais tipos: fisiológicos, psicológicos, cognitivos e comportamentais. Os diferentes tipos de sintomas podem funcionar como um processo em corrente. Assim, primeiramente há algumas alterações fisiológicas no doente (no cérebro mais predominantemente) que levam a dificuldades cognitivas, que por sua vez provocam mudanças psicológicas e comportamentais (Alberdi *et al.*, 2016).

Os indivíduos que desenvolvem DA passam por três estádios principais:

1) O primeiro estádio é um estádio pré-clínico, onde começam a ocorrer alterações no cérebro, no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR), embora o doente ainda não apresente sintomas. Acredita-se que este estádio possa começar 20 anos antes de qualquer sintoma ser evidente;

2) O segundo estádio é chamado Défice Cognitivo Ligeiro (MCI). Neste estádio, défices na capacidade de pensar (que envolve a memória, a linguagem, o raciocínio e a

capacidade de decisão) podem começar a ser perceptíveis para os próprios doentes e para os familiares mais chegados, mas não afetam a sua vida quotidiana. Apenas cerca de 10-15% das pessoas diagnosticadas com MCI desenvolvem DA a cada ano. A razão pela qual algumas pessoas desenvolvem demência e outras não ainda permanece desconhecida. Assim que um paciente é diagnosticado com MCI, deve iniciar-se um diagnóstico específico para compreender que doença ou condição está a ser responsável pelo défice. Podem ser distinguidos dois tipos de MCI: MCI amnésico (aMCI) e MCI não-amnésico. O aMCI refere-se a doentes que apresentem danos a nível da memória, e o MCI não amnésico refere-se a doentes que apresentem danos noutros domínios da cognição, excetuando a memória (por exemplo, atenção ou processamento da linguagem). Acredita-se que os indivíduos que sofrem de aMCI estejam mais propensos a desenvolver DA;

3) O terceiro estágio, o estágio final, é designado demência devida à DA, onde a memória, pensamento e sintomas comportamentais já são evidentes e afetam a capacidade do doente de viver o dia-a-dia. O agravamento de todos estes sintomas ocorre gradual e continuamente, num período que pode variar entre 2 a 20 anos (Alberdi *et al.*, 2016).

3.3. FISIOPATOLOGIA E MECANISMOS MOLECULARES DA DOENÇA

A nível macroscópico, a DA caracteriza-se por uma atrofia cerebral resultante da morte neuronal no córtex cerebral e hipocampo. Concomitantemente, há uma acumulação de LCR nos ventrículos, o que leva a um alargamento compensatório dos mesmos durante a progressão da doença (Alves *et al.*, 2012).

A nível microscópico, as lesões características da DA apresentam-se como placas senis ou neuríticas (constituídas maioritariamente por agregados de proteína A β extracelular) e tranças neurofibrilares (NFTs) (constituídas por proteína tau hiperfosforilada intracelular); estas lesões localizam-se no neocórtex, em estruturas do sistema límbico (hipocampo, amígdala e córtex associado) e em núcleos do tronco cerebral (especialmente nos núcleos basais do prosencéfalo) (Blennow *et al.*, 2006; Purves *et al.*, 2004); relativamente aos agregados de proteína A β estes podem igualmente ser encontrados nas paredes de vasos sanguíneos do córtex cerebral e meninges, sendo este fenómeno designado por angiopatia amilóide cerebral (Tincer, Bhattarai e Kizil, 2016); a nível microscópico, a DA caracteriza-se ainda pela ocorrência de gliose (com proliferação de astrócitos e microglia) e por uma perda neuronal seletiva, nomeadamente a nível de neurónios colinérgicos e glutamatérgicos.

A proteína A β e a proteína tau desempenham um papel crítico no desenvolvimento de DA, no entanto, outros mecanismos de neurodegenerescência foram propostos, incluindo respostas pró-inflamatórias, a disfunção mitocondrial e o stress oxidativo.

A hipótese da cascata β -amilóide e a modificação pós-tradução da proteína tau são consideradas as hipóteses mais importantes na DA, embora nenhuma delas por si só seja suficiente para explicar a grande diversidade de anomalias bioquímicas e patológicas da doença. Compreender as vias moleculares pelas quais as várias alterações patológicas comprometem a função e integridade neuronal e levam a sintomas clínicos tem sido um objetivo de longa data na investigação da DA (Masters *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2012).

A hipótese da cascata amilóide é um modelo linear quantitativo que se centra na acumulação de A β no parênquima cerebral. Esta hipótese postula que uma cascata iniciada pela deposição de A β leva ao aparecimento da patologia tau, disfunção sináptica, inflamação, perda neuronal e, por último, à demência. A linearidade desta cascata permanece, no entanto, muito controversa (Strooper e Karran, 2016). Há investigadores que defendem uma hipótese da cascata β -amilóide modificada, que enfatiza o papel da proteína tau, localizando-a no centro da cascata que leva à demência. O caminho reforça os papéis tanto dos agregados oligoméricos de A β , como de tau, sendo candidatos neurotóxicos que levam à formação de placas amilóides e NFTs, respetivamente. O papel ainda controverso da A β como um desencadeador da toxicidade da tau que leva à formação de NFTs, e ultimamente a perda neuronal, permanece uma questão em aberto (Giacobini e Gold, 2013).

Enquanto as placas amilóides e NFTs se correlacionam com a progressão da DA, pesquisas recentes indicam que estes poderão não ser os agentes causadores da demência. Foi apresentado um novo modelo que sugere que são os monómeros ou pequenos oligómeros A β que poderão causar a morte neuronal, e não a placa agregada. Neste modelo, as placas amilóides poderiam até inibir a morte neuronal sequestrando os monómeros e oligómeros amilóides deletérios (Arbor *et al.*, 2016) ou, por outro lado, as placas amilóides poderiam funcionar como um reservatório de libertação de monómeros ou de pequenos oligómeros de A β , mantendo o agente tóxico no tecido cerebral.

Formação do peptídeo A β : A APP é uma proteína transmembranar tipo I, compreendendo um domínio N-terminal extracelular grande e um domínio C-terminal intracelular pequeno, em adição à região A β . O *splicing* alternativo do gene da APP produz 3 isoformas *major* (695aa, 751aa e 770aa), sendo a APP₆₉₅ a forma predominante no sistema nervoso (Cassar e Kretschmar, 2016). Esta proteína é produzida em grandes quantidades

nos neurónios e é metabolizada muito rapidamente. A função neuronal da APP permanece desconhecida, mas poderá estar envolvida na plasticidade sináptica (Masters *et al.*, 2015).

A A β é produzida por clivagem endoproteolítica da APP, resultando de uma clivagem sequencial desta por grupos de enzimas ou complexos enzimáticos denominados β e γ -secretases (LaFerla *et al.*, 2007). No cérebro, o peptídeo A β é produzido predominantemente pelos neurónios, embora os astrócitos e outras células da glia também o produzam, especialmente sob condições de stress que induzem ativação glial, como ocorre na DA (Yan e Vassar, 2014).

Diversos grupos identificaram a BACE1 (enzima I responsável pela clivagem da APP no local β), que é uma proteína transmembranar de tipo I, como sendo a enzima com atividade β -secretase. A γ -secretase foi identificada como um complexo de proteínas composto por: presenilina (PS) 1 ou 2, nicastrina, APH-1 (*anterior pharynx-defective*) e potenciador da presenilina 2 (PEN2). Por outro lado, a APP pode também ser clivada pela α -secretase mas, neste caso, impossibilitando a formação de A β . Três enzimas com atividade α -secretase foram identificadas, todas elas pertencentes à família ADAM: ADAM9, ADAM10 e ADAM17. A clivagem e processamento da APP pode seguir, então, uma via não amiloidogénica ou uma via amiloidogénica (**Figura 1**):

1) Na via não amiloidogénica, a APP é clivada pela α -secretase numa posição a 83 aminoácidos do C-terminal, produzindo um ectodomínio N-terminal (sAPP α) que é secretado no meio extracelular. O fragmento resultante de 83 aminoácidos C-terminal (C83) é retido na membrana e subsequentemente é clivado pela γ -secretase, produzindo um pequeno fragmento denominado p3. A clivagem pela α -secretase ocorre na região A β , impossibilitando assim a formação de A β .

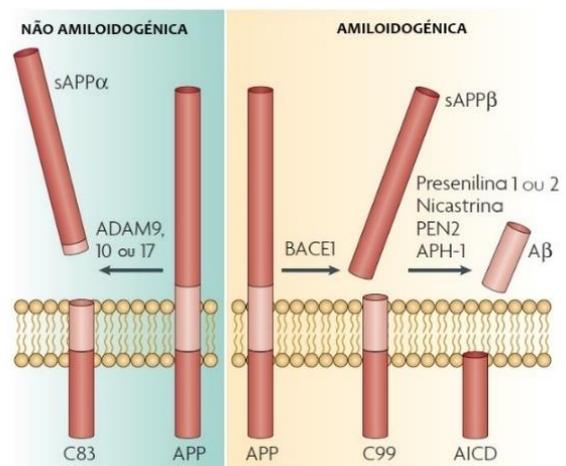


Figura 1 – Proteólise da APP.
(adaptado de LaFerla *et al.*, 2007).

2) A via amiloidogénica é uma via de clivagem da APP alternativa que leva à formação de A β . A proteólise inicial é mediada pela β -secretase numa posição localizada a 99 aminoácidos da extremidade C-terminal. Este corte resulta na libertação de sAPP β para o espaço extracelular, e deixa a porção C-terminal com 99 aminoácidos (conhecido como C99) dentro da membrana, com o recentemente formado N-terminal correspondendo ao

primeiro aminoácido da A β . Uma clivagem subsequente deste fragmento (entre os resíduos 38 e 43) pela γ -secretase liberta um peptídeo A β intacto. A maior parte do peptídeo A β produzido tem 40 resíduos de aminoácidos (A β_{40}), enquanto que uma pequena proporção (aproximadamente 10%) tem 42 resíduos (A β_{42}). A variante A β_{42} é mais hidrofóbica e mais propensa à formação de fibrilas que a A β_{40} , e é esta forma mais longa que também é a isoforma encontrada predominantemente nas placas neuríticas (LaFerla *et al.*, 2007).

É importante compreender que tanto a via amiloidogénica, como a via não amiloidogénica estão presentes em indivíduos saudáveis, com a DA surgindo devido a um aumento da via amiloidogénica ou um *turnover* deficiente da proteína A β . Indivíduos saudáveis têm concentrações na ordem dos 500 pM e 3-8 nM de A β no seu plasma e LCR, respetivamente (Arbor *et al.*, 2016).

Localização celular: A A β é produzida no interior do RE e complexo de Golgi e secretada como parte da via secretora constitutiva. A APP é direcionada à membrana plasmática, onde é clivada predominantemente pela α -secretase, libertando sAPP α no espaço extracelular e deixando um fragmento C83 dentro da membrana. A APP não processada pode ser internalizada em endossomas iniciais. Na presença do recetor relacionado com a sortilina, SORL1, a APP é reciclada de volta ao Golgi em endossomas *retomer*. Os endossomas iniciais contêm BACE1 e têm um pH ótimo para a clivagem da APP por esta enzima. Assim, como já foi referido, a clivagem de APP pela BACE1 resulta num fragmento, C99, sendo retido na membrana. O C99 pode ser transportado de volta ao RE para ser processado em A β pela γ -secretase do RE, transportado de volta para a membrana plasmática onde o complexo γ -secretase também está presente, ou processado a A β dentro do sistema endossoma/lisossoma. A A β extracelular (isto é, A β previamente secretada) pode ligar-se aos recetores da superfície celular (por exemplo, proteína relacionada com o recetor da lipoproteína de baixa densidade (LRP), recetor dos produtos finais de glicosilação avançada (RAGE), *formyl*

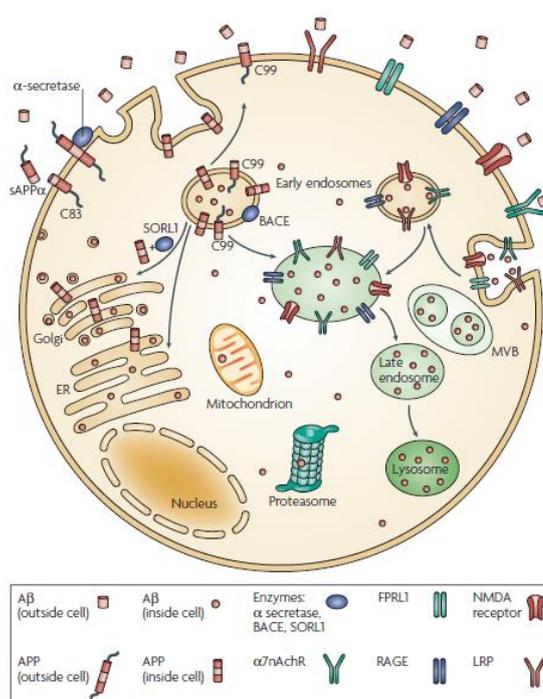


Figura 2 – Localização celular da produção de A β (LaFerla *et al.*, 2007).

peptide receptor-like (FPRL1), N-metil-D-aspartato (NMDA) e subunidade α -7 do recetor nicotínico da acetilcolina (α 7nAChR)), e este complexo recetor-A β ser internalizado em endossomas iniciais. A acumulação intracelular de A β é vista predominantemente em corpos multivesiculares e lisossomas, mas também na mitocôndria, RE, Golgi e no citosol, onde afeta a função dos proteassomas (**Figura 2**) (LaFerla *et al.*, 2007).

Tau: *background* e significado: A tau é uma proteína associada aos microtúbulos, tendo como principal função estabilizá-los. As tauopatias, definidas como as doenças neurodegenerativas com agregação de tau no cérebro, são a manifestação patológica mais comum nas doenças neurodegenerativas. Muitos estudos mostraram que os níveis totais de tau (T-tau; todas as isoformas de tau independentemente do estado de fosforilação) e tau fosforilada (P-tau; tau com fosforilação nos resíduos 181 ou 231) estão aumentados tanto no cérebro como no LCR de doentes com DA (Masters *et al.*, 2015).

Na DA, as formas de tau hiperfosforilada formam as designadas tranças neurofibrilares (NFTs), outro dos agregados característicos desta doença. Também foi demonstrado que as formas de tau hiperfosforilada têm outros efeitos deletérios, tais como a ligação à proteína de interação com a cinase c-Jun N-terminal 1 (JIP1), fazendo com que esta se agregue no corpo celular e prejudique o transporte axonal na DA (Arbor *et al.*, 2016).

O mecanismo pelo qual a tau está aumentada e agregada (isto é, se é devido à produção aumentada ou *scavenging* ineficaz) não é conhecido. O tempo de semi-vida da tau no SNC humano, se a sua cinética está alterada na DA, e que quantidade desta proteína deve ser modulada por fármacos são questões ainda sem resposta (Masters *et al.*, 2015).

3.4. COMPONENTE GENÉTICA DA DA

Tal como já foi mencionado, a DA pode ter um início precoce (entre os 30-60 anos de idade), sendo designada a forma familiar da DA (*familiar Alzheimer's disease*, FAD) ou ter um início tardio (após os 60 anos), sendo designada a forma esporádica de DA (*late-onset Alzheimer's Disease*, LOAD). De longe, a última é a forma mais comum da doença (estimando-se cerca de 98% dos casos). Nesta secção são descritas variações e mutações genéticas que estão implicadas na forma familiar ou esporádica da DA.

Doença de Alzheimer Familiar (FAD): O estudo de pessoas afetadas pela forma familiar da doença deu importantes contribuições acerca da base fisiopatológica da DA.

Esta condição relativamente rara e agressiva tem uma prevalência aumentada em algumas famílias e, por isso, pensa-se que tenha uma componente genética significativa.

Até à data, foram identificadas mutações em três genes que estão ligadas ao início precoce da DA. Estes genes incluem o gene da APP no cromossoma 21, o gene da presenilina 1 no cromossoma 14 e o gene da presenilina 2 no cromossoma 1. Todas estas mutações são expressas de forma autossómica dominante (Squire *et al.*, 2013). As mutações *missense* nas presenilinas 1 ou 2, sendo a presenilina a subunidade catalítica da γ -secretase, são a causa mais comum da FAD. Estas mutações resultam em aumentos relativos na produção de peptídeos A β 42/43. Estas espécies hidrofóbicas auto-agregam, levando à deposição de A β (Selkoe e Hardy, 2016).

Doença de Alzheimer de início tardio (LOAD): Um fator de risco para o aparecimento da forma esporádica da doença é a composição alélica do gene da apolipoproteína E no cromossoma 19 (ApoE) (Squire *et al.*, 2013). A ApoE é a apolipoproteína predominante do complexo HDL no cérebro. Embora esta tenha diferentes papéis na fisiologia cerebral, a informação mais interessante relativamente ao seu papel no desenvolvimento da DA reside no facto de ser capaz de ligar o peptídeo A β (O'Brien e Wong, 2011). O gene ApoE tem 3 alelos distintos (ApoE2, ApoE3 e ApoE4). Doentes com DA possuem o alelo ApoE4 com maior frequência, comparando com os indivíduos que não têm a doença. O risco da doença ainda é acoplado ao número de cópias deste alelo específico: indivíduos que não tenham cópias de ApoE4 estão menos propensos que a população geral a desenvolver a DA, a presença de um alelo ApoE4 aumenta o risco da doença quatro vezes e pessoas com duas cópias deste alelo estão oito vezes mais propensas a desenvolver a doença. Embora o mecanismo preciso pelo qual ApoE4 medie a suscetibilidade da doença seja assunto de intensa investigação, uma hipótese é que esta apolipoproteína está envolvida na diminuição dos processos responsáveis pelo *scavenging* do peptídeo A β do espaço extracelular no cérebro (Squire *et al.*, 2013).

Síndrome de Down: Descobertas adicionais do papel da proteína β -amilóide na DA vêm da investigação da Síndrome de Down. A Síndrome de Down resulta da presença de uma cópia extra do cromossoma 21, o cromossoma que carrega o gene da APP (Squire *et al.*, 2013). Deste modo, estes doentes albergam 3 cópias do gene da APP e desenvolvem, invariavelmente, alterações neuropatológicas típicas da DA (Selkoe e Hardy, 2016). Aqueles que sobrevivem até à quarta década de vida desenvolvem, invariavelmente, uma

distribuição de placas de proteína β -amilóide no cérebro semelhantes às observadas em pacientes com DA (Squire *et al.*, 2013).

Outros fatores genéticos, para além dos mencionados anteriormente, também estão implicados no desenvolvimento da doença por regularem a resposta da microglia à deposição de $A\beta$, como genes do recetor do complemento tipo 1 (CRI), *Siglec-3* (CD33) e do recetor de “disparo” expresso nas células mielóides 2 (TREM2)) (Alzheimer’s Disease International, 2016; Selkoe e Hardy, 2016).

3.5. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Hoje em dia, o diagnóstico da DA assenta numa avaliação cognitiva por meio de testes tais como o mini-exame do estado mental (MMSE), no uso de biomarcadores presentes no LCR e, nos últimos anos, no uso de algumas modalidades de imagiologia médica, nomeadamente, tomografia por emissão de positrões (PET), tomografia computadorizada (CT) e ressonância magnética (MRI). Todos estes métodos são considerados confiáveis, no entanto, apresentam alguns inconvenientes que tornam impossível o seu uso para a deteção de estádios precoces da DA (Alberdi *et al.*, 2016). Por um lado, apenas dão informação sobre a condição atual de saúde do doente, não informando sobre a evolução da doença, por outro, os questionários de avaliação psicológica ou cognitiva por vezes são demasiado subjetivos. Relativamente às medições no LCR, são métodos de análise intrusivos, dispendiosos e demorados (Alberdi *et al.*, 2016).

Tal como já referido anteriormente, a deteção precoce da DA traria muitos benefícios, em termos de eficácia de tratamento e precisão de diagnóstico. Existem evidências suficientes que afirmam que os tratamentos são muito mais efetivos nos estádios iniciais da doença, permitindo que o declínio cognitivo seja parado ou, pelo menos, abrandado. Além disso, quando o doente ainda tem a capacidade de responder a questões e lembrar-se da ordem pela qual os sintomas apareceram, o diagnóstico pode tornar-se muito mais preciso. Consequentemente, os custos em cuidados de saúde podem diminuir, e a qualidade de vida dos doentes pode melhorar significativamente (Alberdi *et al.*, 2016).

É necessário desenvolver um sistema de monitorização ubíquo para a DA e doenças relacionadas de forma a que pequenas mudanças na evolução da doença possam ser detetadas (Alberdi *et al.*, 2016).

4. TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE ALZHEIMER

4.1. TERAPÊUTICA NÃO FARMACOLÓGICA

As terapêuticas não farmacológicas são frequentemente utilizadas com o objetivo de manter ou melhorar a função cognitiva, a capacidade de realizar atividades do dia-a-dia e a qualidade de vida em geral. Estas também podem ser utilizadas com o objetivo de reduzir sintomas comportamentais tais como depressão, apatia, distração, distúrbios do sono, agitação e agressividade. Exemplos destas terapêuticas incluem: a arte-terapia (método de tratamento para o desenvolvimento pessoal, integrando no contexto psicoterapêutico mediadores artísticos (Sociedade Portuguesa de Arte-Terapia)), a terapia baseada em atividade (tipo de terapia em que todos os eventos, encontros e interações são consideradas atividades e têm como fim a estimulação das capacidades do doente) e o treino da memória.

Tal como as terapêuticas farmacológicas atuais, que serão abordadas em seguida, as terapêuticas não farmacológicas não têm mostrado alterar o curso da DA. Algumas revisões sistemáticas sobre estas terapêuticas descobriram que algumas, tais como o exercício físico e atividade cognitiva (por ex. jardinagem, jogos de palavras, ouvir música e cozinhar) se revelam promissoras. É necessária uma maior investigação neste tipo de terapêuticas para melhor compreender e avaliar a sua eficácia (Alzheimer Association, 2016).

4.2. TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA SINTOMÁTICA

As atuais opções de tratamento para a DA focam-se no controlo da sintomatologia da doença. Assim, estas dirigem-se à disfunção colinérgica e glutamatérgica, consequentes do processo de agregação da proteína A β em placas (segundo a hipótese da cascata amilóide). Assim, duas das classes de medicamentos que estão atualmente aprovadas para controlar os sintomas da DA são: os inibidores da acetilcolinesterase e os antagonistas dos recetores do glutamato (Dalvi, 2012) (**Tabela I**).

Inibidores da acetilcolinesterase: Os inibidores da acetilcolinesterase reduzem a hidrólise da acetilcolina (neurotransmissor importante nos processo de memória) presente na fenda sináptica por inibirem a acetilcolinesterase, resultando numa estimulação aumentada dos recetores colinérgicos. O donepezilo, a rivastigmina e a galantamina são os

três fármacos disponíveis nesta classe, por via oral. A rivastigmina também está disponível em *patch* transdérmico (Dalvi, 2012).

Tabela I – Comparação entre os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e o antagonista do recetor NMDA ao nível da fase da doença, modo de ação, metabolismo, tempo de semi-vida, doses por dia, relevância da administração com alimentos, dose inicial, escalação de doses e dose clinicamente recomendada (adaptado de Blennow *et al.*, 2006).

| | Donepezilo | Galantamina | Rivastigmina | Memantina |
|--------------------------------------|---------------------------|---|---|--|
| Fase da doença | Leve-Moderada | Leve-Moderada | Leve-Moderada | Moderada-Severa |
| Modo de ação | Inibição seletiva da AChE | Inibição seletiva da AChE e modulação alostérica do recetor da nicotina | Inibição reversível lenta da AChE e BuChE | Antagonista não competitivo do recetor NMDA |
| Metabolismo CYP450 | Sim (CYP2D6 e CYP3A4) | Sim (CYP2D6 e CYP3A4) | Não, hidrolisada por esterases | Não |
| Tempo de semi-vida | Longo (70h) | Pequeno (7-8h) | Muito pequeno (1h) | Longo (60-100h) |
| Doses/dia | 1 | 2 (comprimidos) 1 (cápsula LP) | 2 | 2 (1ª semana, 1x/dia) |
| Dado com alimentos | Irrelevante | Recomendado | Sim (aumenta a biodisponibilidade) | Irrelevante |
| Dose inicial | 5 mg/dia | 8 mg/dia | 3 mg/dia (1.5 mg x 2) | 5 mg/dia |
| Escalação de doses | 4-6 semanas | A cada 4 semanas até à dose recomendada/tolerada | A cada 2 semanas, até à dose recomendada/tolerada | A cada semana, até à dose recomendada/tolerada |
| Dose clinicamente recomendada | 10 mg/dia | 16-24 mg/dia | 6-12 mg/dia | 20 mg/dia |

Antagonistas dos recetores do glutamato: O glutamato é o neurotransmissor excitatório *major* no cérebro. Em condições normais, o glutamato e o recetor NMDA têm papéis importantes em processos de aprendizagem e memória. Em condições anormais, tal como na DA, uma atividade glutamatérgica aumentada pode levar a uma ativação contínua dos recetores de NMDA, que pode prejudicar a função neuronal. Assim, a memantina é um antagonista não competitivo do recetor NMDA, o qual se acredita que proteja os neurónios da excitotoxicidade mediada pelo glutamato sem impedir a ativação fisiológica do recetor NMDA necessária para a função cognitiva (Blennow *et al.*, 2006). Demonstrou-

se que a memantina usada sozinha ou em combinação com um inibidor da acetilcolinesterase abranda a progressão da doença na DA moderada a severa (Dalvi, 2012).

Para além destes fármacos, que apenas diminuem a severidade dos sintomas e proporcionam uma melhoria temporária no comprometimento cognitivo, são utilizados em simultâneo antipsicóticos, antidepressivos e benzodiazepinas de forma a tratar os sintomas comportamentais da doença (Yiannopoulou e Papageorgiou, 2012). Alimentos medicinais e suplementos nutricionais também são muitas vezes utilizados. Os alimentos medicinais são geralmente considerados abordagens de segunda linha, para doentes que não estejam a responder adequadamente à farmacoterapia, que sejam intolerantes aos inibidores da acetilcolinesterase ou memantina e quando as famílias procuram outras opções terapêuticas além dos tratamentos farmacológicos existentes (Masters *et al.*, 2015).

4.3. NOVAS ABORDAGENS FARMACOTERAPÊUTICAS

Embora o controlo sintomático pelos agentes anteriormente referidos se tenha mostrado estatisticamente significativo, a sua eficácia terapêutica encontra-se longe de ser robusta, e a duração dos seus efeitos é limitada. Desta forma, existe uma crescente necessidade de desenvolver agentes com a capacidade de alterar ou parar a progressão da doença, sendo estes denominados fármacos modificadores da doença (Arbor *et al.*, 2016).

Atualmente ainda não existem fármacos modificadores da DA disponíveis. Existem muitos fatores que contribuem para a dificuldade em desenvolver tratamentos eficazes, nomeadamente o alto custo do desenvolvimento farmacêutico, o tempo relativamente longo para se verificar se um determinado tratamento em fase de investigação está a afetar a progressão da doença, e a própria estrutura do cérebro, que é protegido pela barreira hemato-encefálica (Alzheimer Association, 2016). Ainda assim, nos últimos anos, várias abordagens terapêuticas destinadas a impedir a progressão da DA têm avançado para ensaios clínicos (Citron, 2010). Dentro dessas novas abordagens terapêuticas existentes, podem ser listadas as abordagens direcionadas à proteína tau, as abordagens relacionadas com a redução de A β , e as abordagens anti-inflamatórias e neuroprotetoras, sendo que esta última não será discutida nesta monografia.

→ Abordagens terapêuticas direcionadas à proteína tau

As abordagens direcionadas à proteína tau têm sido investigadas, embora menos extensamente, como uma alternativa às terapias direcionadas à redução de A β (Tayeb,

2012). Dentro destas abordagens distinguem-se duas classes farmacológicas principais: os inibidores da fosforilação da tau e os compostos que previnem a sua agregação e/ou promovem a sua desagregação. A GSK3 β é a principal enzima envolvida na hiperfosforilação da tau. Exemplos de fármacos nesta categoria são o lítio, que é um inibidor da GSK3 β , e o azul de metileno (*methylthioninium chloride*, MTC), que interfere com a agregação da tau.

→ Abordagens terapêuticas relacionadas com a redução de A β

Um dos grandes responsáveis pela patogénese da DA é o excesso de A β no cérebro e, deste modo, a intervenção clínica para reduzir os níveis deste peptídeo tem sido uma das abordagens atrativas para o desenvolvimento de terapêuticas modificadoras da doença (Ghosh *et al.*, 2012), tal como aquela que tem mostrado os agentes mais promissores (Arbor *et al.*, 2016).

Remoção de A β : Uma das estratégias para modificar a cascata amilóide é a remoção de A β do cérebro. Teoricamente, esta remoção pode ser conseguida através da ativação das enzimas que degradam a A β , através do aumento dos mecanismos de transporte de A β do cérebro para a circulação periférica e através da remoção direta de espécies amilóides através de uma resposta imunológica (Tayeb *et al.*, 2012). A imunoterapia na DA é considerada uma das abordagens promissoras para o desenvolvimento de fármacos modificadores da doença, uma vez que pode potencialmente afetar a agregação e deposição de A β e, deste modo, diminuir a carga de placas amilóides. A imunização ativa através de vacinação leva à formação de anticorpos contra as formas patogénicas de A β , simulando uma resposta imune, ao passo que a imunização passiva fornece anticorpos produzidos exogenamente (Salomone *et al.*, 2011). Exemplos deste último tipo de imunização são os anticorpos monoclonais solanezumab, crenezumab e aducanumab que, em ensaios clínicos, sugeriram abrandar o declínio cognitivo em doentes com DA moderada (Selkoe *et al.*, 2016).

Inibição da agregação de A β : Inicialmente pensava-se que a neurodegenerescência resultava da agregação de espécies A β (que sequencialmente formam oligómeros, fibrilas e protofibrilas) e da conseqüente deposição na forma de placas amilóides (Tayeb *et al.*, 2012). Novos estudos, no entanto, têm sugerido que são os monómeros ou pequenos oligómeros A β que poderão causar a morte neuronal, e não a placa agregada, tal como já referido na

secção 3.3.. Assim, outra estratégia para a redução da acumulação e toxicidade das espécies $A\beta$ passa, então, pela utilização de agentes químicos que impeçam a oligomerização e formação de fibrilas neurotóxicas, facilitando assim a sua eliminação. Já foram testados vários destes agentes em ensaios clínicos e são exemplos desses o tramiprosato, a colostrina, o clioquinol, o PBT2 e o ELND005 (Tayeb *et al.*, 2012).

Modulação da produção de $A\beta$: Tal como já foi mencionado anteriormente, o peptídeo $A\beta$ é gerado de um grande precursor molecular, a APP, pela ação sequencial de duas proteases: a BACE1 e a γ -secretase. Uma terceira protease, a α -secretase, que compete com a β -secretase para o substrato APP, pode impedir a produção de $A\beta$, clivando a APP na região do peptídeo $A\beta$. Este cenário sugere imediatamente três estratégias para reduzir a $A\beta$: a inibição da γ -secretase, a inibição da β -secretase, ou a estimulação da α -secretase. Todas estas estratégias têm sido ativamente exploradas há mais de uma década (Citron, 2010).

A γ -secretase foi o primeiro alvo a ser intensivamente estudado na via amiloidogénica. No entanto, dada a sua estrutura complexa (composta por várias subunidades), é difícil obter informação estrutural de alta resolução do seu local ativo e compreender a enzima em profundidade (Citron, 2010). Para além disso, a inibição desta enzima em ensaios clínicos levou à ocorrência de diversos efeitos laterais (Kandalepas e Vassar, 2012).

Relativamente à estimulação da via da α -secretase, esta leva a uma redução do substrato APP que está disponível para a via amiloidogénica. A estimulação da α -secretase tem sido explorada com profundidade no contexto de agonistas dos recetores muscarínicos M_1 , que podem funcionar como potenciadores da cognição e que reportaram reduzir a $A\beta$ num pequeno ensaio clínico. No entanto, o desenvolvimento destes agonistas tem sido impedido pela dificuldade em gerar moléculas específicas M_1 que não causem efeitos laterais atuando noutros recetores muscarínicos. Não há moléculas do género que tenham sido reportadas correntemente em ensaios clínicos para a DA (Citron, 2010).

As abordagens terapêuticas que mais têm progredido até à data consistem em intervenções imunológicas para eliminar os oligómeros de $A\beta$ e fármacos para inibir as secretases que produzem $A\beta$, nomeadamente a BACE e a γ -secretase (Evin, 2016). A presente monografia tem como principal objetivo realçar o papel da BACE1 na patogénese da doença e, conseqüentemente, destacá-la como um potencial alvo terapêutico na DA.

4.3.1. A BACEI COMO ALVO TERAPÊUTICO NA DA

4.3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA BACEI

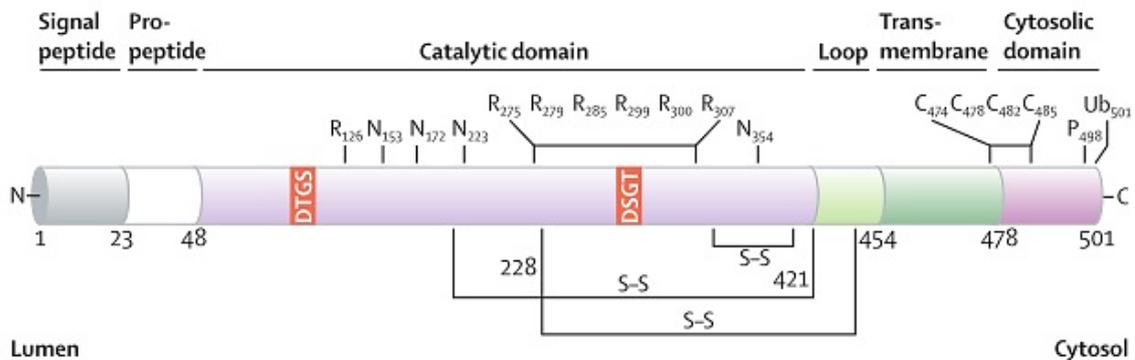


Figura 3 – Estrutura primária da BACE-I (Yan e Vassar, 2014).

gene da BACE-I foi identificado há mais de 15 anos como o gene responsável pela atividade β -secretase (Evin, 2016). Como já foi referido anteriormente, a BACEI é uma proteína transmembranar do tipo I. Esta enzima pertence à família das aspartil proteases, contém 501 aminoácidos e sofre várias modificações pós-tradução na via secretora da célula, incluindo N-glicosilação, fosforilação, ubiquitinação, S-palmitoilação e acetilação.

Na **Figura 3**, os vários subdomínios da BACEI estão representados em cima da estrutura. Os números referem-se às posições dos aminoácidos. Os dois sítios ativos nas posições 93 e 289 estão sombreados a laranja, os “S-S” indicam as posições das pontes dissulfureto dentro do domínio catalítico, o N representa as posições dos locais de glicosilação ligados ao grupo NH_2 de resíduos de asparagina, o R mostra as posições dos resíduos de arginina acetilada, o C marca as posições dos resíduos de cisteína que sofreram S-palmitoilação, o P mostra a fosforilação da serina 498 e Ub indica a ubiquitinação da lisina 501 (Yan e Vassar, 2014). A BACEI é igualmente modificada com N-acetilglucosamina (GlcNAc), uma estrutura N-glicano complexa altamente expressa no cérebro, e esta modificação está aumentada em doentes com DA. Isto deve-se à sobreexpressão da glicosil-transferase (GnT-III) (enzima responsável por esta modificação) no cérebro dos doentes e sugere que esta modificação aumenta os níveis de BACEI e o processamento da APP (Barão *et al.*, 2016).

Os níveis mais altos de mRNA da BACEI são encontrados no cérebro (predominantemente em neurónios e pouco nas células da glia) e pâncreas, sendo significativamente mais baixos nos outros tecidos. Esta enzima é abundante tanto no cérebro humano normal, como no cérebro afetado pela DA (Cole e Vassar, 2007). Os

neurónios expressam a BACE1 especialmente nos terminais pré-sinápticos, sugerindo um papel importante desta enzima nas sinapses (Barão *et al.*, 2016; Yan e Vassar, 2014). A nível celular, a BACE1 está localizada no *trans-Golgi network* (TGN), na membrana plasmática superficial e nos endossomas iniciais (Halima *et al.*, 2016). Sabe-se igualmente que a BACE1 sofre uma sobre-regulação em resposta ao stress celular, tal como o stress oxidativo, isquémia e depleção energética (Arbor *et al.*, 2016).

4.3.1.2 INIBIÇÃO DA BACE1

Como dito anteriormente, a inibição da BACE1 tem sido explorada intensivamente como um alvo terapêutico promissor na DA. Já se demonstrou que a inibição química da BACE1 em animais adultos pode alterar a manutenção dos fusos musculares e danificar funções sinápticas, uma vez que para além da APP a BACE1 tem muitos outros substratos endógenos. Por isso, é essencial desenhar inibidores da BACE1 mais seletivos e que inibam especificamente a clivagem de APP e a produção de A β sem interferir com a clivagem de outros substratos da enzima. Foi explorada a compartimentação diferencial do processamento de substratos de modo a permitir o desenvolvimento de estratégias para aumentar a seletividade dos inibidores da BACE1. Assim, foi demonstrado que a clivagem de substratos não-amilóides pela BACE1 não requer endocitose mediada por dinamina/clatrina, enquanto que o processamento da APP requer. Foi igualmente demonstrada a importância do resíduo ácido no local da ligação da BACE1 ao substrato na posição P2. Para substratos não-amilóides, a presença de um resíduo ácido confere uma ligação de alta afinidade.

Resumidamente, inibir seletivamente a atividade da BACE1 num compartimento subcelular particular, os endossomas iniciais, onde a BACE1 cliva a APP, pode ser uma estratégia terapêutica efetiva desde que os outros substratos sejam clivados em compartimentos não endossomais (Halima *et al.*, 2016).

Para estudar e desenvolver a seletividade, a potência dos inibidores para a β -secretase é muitas vezes comparada com a potência para outras duas proteases aspárticas humanas: a memapsina I (BACE2), uma vez que é o homólogo mais próximo da β -secretase, e a catepsina D, a protease aspártica mais abundante nas células humanas (Ghosh *et al.*, 2012).

Um inibidor da β -secretase clinicamente eficaz deve ter a capacidade de penetrar a BHE e as membranas neuronais. O limite superior de tamanho molecular que atravessa a BHE é de cerca de 550 Da. Adicionalmente, tais inibidores devem possuir boas

propriedades farmacológicas de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (Ghosh *et al.*, 2012).

A BACE-I tem numerosos substratos e funções e, atualmente ainda não se compreende totalmente a relação entre a inibição da BACEI, níveis de A β e os défices cognitivos na DA. Consequentemente é crucial definir: (i) o nível da inibição da BACEI necessário para alcançar eficácia; (ii) a altura ideal para começar a intervenção terapêutica; (iii) se a modulação da produção de A β pode modificar o curso da doença assim que os sintomas se manifestam; e (iv) antecipar os efeitos laterais devido à inibição da BACEI.

É importante realçar que o risco de efeitos tóxicos relacionados com o mecanismo poderá depender do nível de inibição da BACEI. Encontrar uma janela terapêutica segura onde o intervalo de doses dos inibidores da BACEI é balanceado entre os efeitos tóxicos derivados do mecanismo e a redução de A β será crucial para alcançar uma terapêutica segura da DA (Barão *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos, vários esforços têm sido feitos para identificar inibidores potentes da BACEI. Inicialmente, a maior parte destes tinham por base peptídeos, mas, progressivamente, foram-se desenvolvendo moléculas mais pequenas e diversos compostos estão atualmente em ensaios clínicos. Até à data, apenas dois fármacos (MK-8931 e AZD3293) alcançaram os ensaios clínicos de Fase III (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Inibidores da BACEI em ensaios clínicos (adaptado de Barão *et al.*, 2016).

| Composto | Empresa(s) | Fase | População | Próximo “marco miliário” |
|---------------------|--------------------------|-------------|--|--|
| MK-8931 | Merck | Fase III | DA ligeira a moderada e DA prodrómica | Final do ensaio de Fase II em 2017 (DA ligeira a moderada) e em 2019 (DA prodrómica) |
| AZD3293 | AstraZeneca Eli Lilly | Fase II/III | DA prodrómica a ligeira | Final dos ensaios de Fase II/III em 2019 |
| E2609 | Eisai Biogen Idec | Fase II | DA prodrómica a ligeira | Final do ensaio de Fase II e início do de Fase III em 2016 |
| JNJ-54861911 | Shionogi Janssen | Fase II | Estado precoce da DA (assintomática) e DA prodrómica | Início do estudo adaptativo de prevenção da DA de Fase II/III em 2015 |
| CNP520 | Novartis Amgen | Fase I/II | ApoE4+/+ | Resultados da Fase I/II |
| PF-06648671 | Pfizer | Fase I | ? | Resultados da Fase I |
| LY-3202626 | Eli Lilly | Fase I | ? | Resultados da Fase I |
| VTP-36951 | Vitae | Pré-clínica | ? | A procurar parceiro para iniciar Fase I |

O MK-8931, recentemente nomeado verubecestat, foi desenvolvido pela Merck – é bem tolerado e causa uma redução dose-dependente significativa dos níveis de A β no LCR de indivíduos saudáveis depois de uma única ou várias administrações (Evin, 2016). O ensaio clínico de Fase III irá testar o fármaco ao longo dos diversos estádios da doença.

Estes estudos clínicos que decorrem irão, esperançosamente, ensinar-nos que nível de inibição da BACE1 e a que estágio da progressão da DA é possível uma modificação da doença segura. Se nenhum problema de segurança maior se levantar, a inibição da BACE1 poderá encontrar um lugar na prevenção da DA em doentes que estão em risco de desenvolver a doença (Barão *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÃO

No último século, tem-se assistido a um aumento da esperança média de vida da população a nível mundial, especialmente nos países desenvolvidos. Parte desse aumento deve-se a melhorias nos cuidados de saúde. Em contrapartida, o número de demências relacionadas com a idade tem aumentado, como é o caso da DA. O aumento da prevalência desta doença torna-a um problema de saúde pública a nível mundial que tem trazido grandes consequências a nível económico, político e social.

Atualmente, a fisiopatologia da DA ainda não é completamente conhecida. A hipótese da cascata amilóide continua a não estar completamente provada e esta incompreensão do mecanismo molecular exato da doença leva a um consequente aumento da dificuldade no desenvolvimento de novos fármacos. Qual a ligação entre a patologia $A\beta$ e a patologia da tau? É uma ligação direta e apenas envolve a célula por si só? Será que o peptídeo $A\beta$ tem uma função fisiológica ainda não conhecida? (Selkoe e Hardy, 2016). Estas são algumas das questões que continuam por responder relativamente à DA.

A atual terapêutica farmacológica na DA compreende fármacos que apenas diminuem a sua sintomatologia, isto é, não alteram o curso da doença. Já existem, no entanto, fármacos modificadores da doença em ensaios clínicos. As abordagens terapêuticas que têm tido mais destaque no desenvolvimento destes novos fármacos são aquelas que têm como alvo a redução do peptídeo $A\beta$, uma vez que se conhece parte dos efeitos deletérios provocados por este peptídeo. É neste contexto que surgem os inibidores da BACE1, um dos agentes que dentro do grupo de compostos que reduzem os níveis do peptídeo $A\beta$ se têm demonstrado mais promissores. A BACE-1 trata-se de uma proteína transmembranar que cliva a APP e forma o peptídeo $A\beta$ pela via amiloidogénica da célula. Ao ser inibida, a produção de $A\beta$ é interrompida, impedindo que este peptídeo neurotóxico se forme e se agregue.

No entanto, é necessário considerar os eventuais efeitos laterais provocados pelo mecanismo de inibição da BACE1. Assim, relativamente à inibição da BACE1, é necessário desenvolver inibidores com uma grande seletividade de forma a que o processamento de substratos não-amilóides não fique comprometido, e apenas se iniba a interação da BACE1 com a APP. De igual forma, estes inibidores devem ter a capacidade de penetrar a BHE e as membranas neuronais e ter igualmente boas propriedades de ADME.

As boas notícias são que, na prática, e na medida em que a informação está disponível, os inibidores da BACE1 correntemente testados em ensaios clínicos aparentam

ser muito seguros. Por exemplo o MK-8931 (o verubecestat) tem sido bem tolerado depois da administração de múltiplas doses durante pelo menos 18 meses, em humanos.

Como futura farmacêutica e desde sempre interessada pela área das neurociências, esta monografia permitiu-me uma compreensão mais aprofundada da fisiopatologia DA e dos possíveis alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos modificadores desta doença, nomeadamente os inibidores da BACE1.

O farmacêutico, sendo o especialista do medicamento, deve estar a par de todos os avanços científicos, especialmente daqueles que possam estar direta ou indiretamente ligados ao medicamento e ao seu uso racional. Falando concretamente da DA, os conhecimentos sobre a fisiopatologia e sintomatologia desta doença, bem como sobre a sua respetiva terapêutica, são de extrema importância em qualquer que seja a área na qual o farmacêutico exerça a sua atividade. Para além destes conhecimentos base, também é essencial conhecer o tipo de apoio que se pode fornecer ao doente e ao cuidador, uma vez que este último muitas vezes não sabe a melhor forma de lidar com o doente.

É essencial continuar a apostar na investigação científica na área da DA, assim como a desenvolver métodos de diagnóstico cada vez mais precisos e robustos, de forma a permitir uma deteção da doença mais precoce. Quanto mais cedo for detetada a doença, mais cedo se pode começar a intervenção terapêutica e, num futuro próximo, estou convicta que será possível retardar a progressão da mesma.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALBERDI, A.; AZTIRIA, A.; BASARAB, A. - **On the early diagnosis of Alzheimer's Disease from multimodal signals: A survey.** Artificial Intelligence in Medicine. 71 (2016) 1–29.
- ALVES, L. *et al.* - **Alzheimer's disease: A clinical practice-oriented review.** Frontiers in Neurology. (2012) 1–20.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION - **2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures.** Alzheimer's & Dementia 2016. 12:4 (2016) 1–80. [Acedido a 19 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <https://www.alz.org/>.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. The Global Voice on Dementia. **About dementia.** [Acedido a 18 de julho de 2016]. Disponível na Internet: <https://www.alz.co.uk/>.
- ARBOR, S. C.; LAFONTAINE, M.; CUMBAY, M. - **Amyloid-beta Alzheimer targets — protein processing , lipid rafts , and amyloid-beta pores.** YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE. 89 (2016) 5–21.
- BARÃO, S.; MOECHARS, D.; LICHTENTHALER, S. F.; STROOPER, B. D. - **BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease.** Trends in neurosciences. 39:3 (2016) 158–69.
- BIOGRAPHY.COM EDITORS, **Alois Alzheimer Biography.** A&E Television Networks, February 25, 2016. [Acedido a 12 de agosto de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.biography.com/>.
- BLENNOW, K.; LEON, M. J. De; ZETTERBERG, H. - **Alzheimer's Disease.** 368 (2006), 387–403.
- CASSAR, M.; KRETZSCHMAR, D. - **Analysis of Amyloid Precursor Protein Function in Drosophila melanogaster.** Frontiers in Molecular Neuroscience. 9, (2016) 61.
- CITRON, M. - **Alzheimer's disease: strategies for disease modification.** Nature reviews. Drug discovery. 9:5 (2010) 387–398.
- COLE, S. L.; VASSAR, R. - **The Basic Biology of BACE1 : A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease.** Current Genomics. 8 (2007) 509–530.
- DALVI, A. - **Alzheimer's Disease.** Disease-a-Month. 58 (2012) 666–677.
- DONG, S.; DUAN, Y.; HU, Y.; ZHAO, Z. - **Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis.** Translational Neurodegeneration. 1 (2012) 18.
- EVIN, G. - **Future Therapeutics in Alzheimer's Disease: Development Status of BACE Inhibitors.** BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy. (2016)
- GHOSH, A. K.; BRINDISI, M.; TANG, J. - **Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease.** Journal of Neurochemistry. 120 (2012) 71–83
- GIACOBINI, E.; GOLD, G. - **Alzheimer disease therapy — moving from amyloid- β to tau.** Nature reviews. Neurology. 9 (2013) 677–86
- HALIMA, S. B.; MISHRA, S.; RAJA, K. M. P.; WILLEM, M.; BAICI, A.; SIMONS, K.; BRÜSTLE, O.; KOCH, P.; HAASS, C.; CAFLISCH A.; RAJENDRAN, L. - **Specific Inhibition of β -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein.** Cell Reports. 14:9 (2016) 2127–2141.
- HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. - **The discovery of Alzheimer's disease.** Dialogues in Clinical Neuroscience. 5:1 (2003) 101–108. [acedido a 12 de agosto de 2016]. Disponível na Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- KANDALEPAS, P. C.; VASSAR, R. - **Identification and biology of β -secretase**. *Journal of Neurochemistry*. 120 (2012) 55–61.
- LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. - **Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease**. *Nature Reviews. Neuroscience*. 8 (2007) 499–509.
- MASTERS, C. L.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C. C.; SPERLING R. A.; CUMMINGS, J. L. - **Alzheimer's disease**. *Nature Reviews Disease Primers*. 1, 15056 (2015) 1019–1031.
- O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. - **Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease**. *Annual review of neuroscience*. (2011) 183–202.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. - **Neuroscience**. 3th Ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2004 ISBN 0-87893-725-0.
- SALOMONE, S.; CARACI, F.; LEGGIO, G. M.; FEDOTOVA, J.; DRAGO, F. - **New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: Focus on disease modifying drugs**. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 73 (2012) 504–517.
- SANTANA, I.; FARINHA, F.; FREITAS, S.; RODRIGUES, V.; CARVALHO, A. - **Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação**. *Acta Medica Portuguesa*. 28 (2015) 182–189.
- SELKOE, D. J.; HARDY, J. - **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years**. *EMBO Molecular Medicine*. 8 (2016) 1–14.
- SOCIEDADE PORTUGUESA DE ARTE-TERAPIA. **Âmbito da Arte-Terapia do ponto de vista da SPAT. Definição**. [Acedido a 8 de setembro de 2016]. Disponível na Internet: <http://arte-terapia.com/>
- SQUIRE, L. R.; BLOOM, F. E.; SPIZER, N. C.; LAC, S. du; GHOSH, A.; BERG, D. - **Fundamental Neuroscience**. 3th Ed. Canada: Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-12-374019-9.
- STROOPER, B.; KARRAN, E. - **The Cellular Phase of Alzheimer's Disease**. *Cell*. 164:4 (2016) 603–615.
- TAYEB, H. O.; YANG, H. D.; TARAIZI, F. I. - **Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors**. *Pharmacology and Therapeutics*. 134 (2012) 8–25.
- TINCER, G.; BHATTARAI, P.; KIZIL, C. - **Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease**. 89 (2016) 23–35.
- WHO 2016. Media centre. Fact sheets. **Dementia**. April 2016. [Acedido a 18 de julho de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>
- WONG, P. C.; SAVONENKO, A.; LI, T.; PRICE, D. L. - **Neurobiology of Alzheimer's Disease**. In: BRANDY, S. T.; SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L. . *Basic Neurochemistry*. Elsevier Inc., 2012 ISBN: 9780123749475, p. 815-828
- YAN, R.; VASSAR, R. - **Targeting the β -secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy**. *The Lancet Neurology*. 13:3 (2014) 319–329.
- YIANNPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIU, S. G. - **Current and future treatments for Alzheimer's disease**. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 6 (2013) 19–33.