



Ana Rita Pinheiro Teixeira

## Bexaroteno e a sua aplicabilidade no tratamento do Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves Castro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rita Pinheiro Teixeira

# Bexaroteno e a sua aplicabilidade no tratamento do Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves Castro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*Eu, Ana Rita Pinheiro Teixeira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011161920, 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 julho de 2016.*

---

*(Ana Rita Pinheiro Teixeira)*

O Tutor,

---

(Professor Ricardo Castro)

A aluna,

---

(Ana Rita Pinheiro Teixeira)

## **Agradecimentos**

Nesta etapa da minha vida, não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que foram essenciais em todo o meu percurso académico e sem elas teria sido impossível chegar até aqui.

Aos meus pais e irmãos, uma enorme obrigada, por terem permitido que tudo isto fosse possível, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida e por todo o esforço feito durante estes cinco anos.

Aos meus avós e restante família, agradeço por toda a ajuda prestada e por terem sempre acreditado em mim.

À Catarina, Sofia, Bruna, Camila, Sérgio e Isabel por terem sido os melhores amigos, por toda a paciência, compreensão e amizade.

À Phartuna, Tuna de Farmácia de Coimbra, por todos os momentos de descontração proporcionados e por terem sido a minha família de Coimbra.

Ao meu orientador, Ricardo Castro, por toda a disponibilidade que sempre demonstrou em ajudar-me.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por tão bem me ter acolhido e por todos os conhecimentos adquiridos.

“La accione es la clave fundamental de qualqier exito”

Pablo Picasso

## Índice

Siglas e Abreviaturas .....	vii
Resumo .....	viii
<i>Abstract</i> .....	ix
Introdução .....	1
a) DA de início precoce .....	1
b) DA de início tardio .....	2
Mecanismo fisiopatológico do Alzheimer.....	3
Estudos realizados com a molécula bexaroteno .....	6
Ensaio clínico com a molécula bexaroteno .....	14
Conclusões.....	16
Bibliografia .....	17

## Siglas e Abreviaturas

- ABCA1 – *ATP-binding Cassett Transporter A1*
- AIM – Autorização de Introdução no Mercado
- ApoE – Apolipoproteína E
- Arg – Arginina
- A $\beta$ <sub>1-42</sub> – Peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub>
- A $\beta$ <sub>25-35</sub> – Peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>
- Cys – Cisteína
- DA – Doença de Alzheimer
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EMA – Agência Europeia do Medicamento
- FDA – *Food and Drug Administration*
- Glu – Glutamato
- Ile – Isoleucina
- IRM – Imagem de Ressonância Magnética
- LCR – Líquido cefalorraquidiano
- LXR – Recetor X do Fígado
- Lys – Lisina
- Met – Metionina
- PET – Tomografia de emissão de positrões
- PPA – Proteína Precursora Amilóide
- PPAR – Recetores Ativados pelo Proliferador do Peroxissoma
- PSEN 1 – Presenilina 1
- PSEN 2 – Presenilina 2
- RXR – Recetores Retinóides X
- Ser – Serina



## Resumo

O bexaroteno, um agonista seletivo dos recetores retinóides X (RXR), foi estudado com o intuito de provar a sua capacidade em restaurar as funções cognitivas em modelos animais e humanos que possuíam a Doença de Alzheimer (DA). Assim, usou-se uma combinação de estudos realizados com a molécula bexaroteno, de modo a elucidar os mecanismos subjacentes às suas propriedades anti-DA em células neuronais.

A conversão do peptídeo  $\beta$ -amilóide em agregados patogénicos está associada ao aparecimento e progressão da DA. Esta observação levou a uma extensa pesquisa de agentes terapêuticos para modular a concentração desse peptídeo ou inibir a sua agregação.

Inicialmente, percebeu-se que bexaroteno compartilhava uma analogia estrutural com o colesterol e, neste sentido, competia pelo mesmo local de ligação na região C-terminal do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Posto isto, tentou-se mostrar que bexaroteno interferia com o processo de ligação do colesterol ao peptídeo, assim como inibia a formação dos canais amilóides permeáveis ao cálcio, uma vez que o colesterol está envolvido na oligomerização das espécies neurotóxicas, assim como na formação dos canais amilóides.

Também foi descrita uma abordagem da cinética para a descoberta racional de novos fármacos, estudando os efeitos de pequenas moléculas nos passos específicos (nucleação primária, secundária e alongação) do processo de agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Isto permitiu observar que o bexaroteno atrasava a formação de espécies neurotóxicas em células do neuroblastoma, principalmente através da inibição da nucleação primária.

Existe ainda uma terceira abordagem que prova que os efeitos patológicos de ApoE4 em modelos animais com DA podem ser reduzidos através do tratamento com bexaroteno. Devido a esta redução, é também induzida uma melhoria das funções cognitivas desses mesmos animais.

Por último, foi testado o efeito do bexaroteno na carga amilóide cerebral em humanos.

**Palavras-chave** – Doença de Alzheimer, bexaroteno, peptídeo  $\beta$ -amilóide, oligómeros, ApoE4.

## **Abstract**

Bexarotene, a selective agonist of the receptor retinoid X (RXR), was studied in order to prove its ability to restore cognitive function in animal models and humans that had Alzheimer's disease (AD). Thus, we used a combination studies with bexarotene molecule, in order to elucidate the mechanisms underlying its anti-properties in neuronal cells.

The conversion of  $\beta$ -amyloid peptide into pathogens aggregates is associated with the onset and progression of AD. This observation has prompted an extensive search for therapeutic agents to modulate the concentration of that peptide or inhibit its aggregation.

Initially, we noticed that bexarotene shares a structural analogy with cholesterol and in this sense, competing for the same binding site in the C-terminal region of  $\beta$ -amyloid peptide. That said, he attempted to show that bexarotene interfere with the bonding process cholesterol the peptide, as well as inhibiting the formation of calcium-permeable amyloid pore, since Cholesterol is involved in oligomerization of the neurotoxic species as well as the formation of amyloid channels.

Also we describe a chemical kinetics approach for the discovery of new drugs has been described by studying the effects of small molecules in specific step (nucleation primary, secondary and elongation) of the process of aggregation of  $\beta$ -amyloid peptide. We noted that bexarotene delayed the formation of neurotoxic species in neuroblastoma cells through the inhibition of primary nucleation mainly.

There is a third approach proves that the pathological effects of ApoE4 in animal models of AD may be reduced by treatment with bexarotene. Due to this reduction, an improvement is also induced cognitive deficits in these same animals.

Finally, we tested the effect of bexarotene in brain amyloid burden in humans.

**Key Words** – Alzheimer's Disease, bexarotene,  $\beta$ -amyloid peptide, oligomers, ApoE.

## Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio complexo e heterogéneo do cérebro descrito separadamente em 1906 e 1910 por Alzheimer e Perusini. Esta doença é uma causa de demência prevalente em todo o mundo (Bennett *et al.*, 2015).

A característica central da DA é a perda de memória. A memória é a gravação, armazenamento e recuperação de informações. Existem muitas formas de memória, mas a principal característica clínica da DA é a perda progressiva da memória esporádica, a recordação explícita dos tempos e lugares. No entanto, todas as capacidades cognitivas podem ser afetadas. DA afeta uma ampla gama de outras habilidades, incluindo, as motoras, olfato e o sono. Para além disso, pode levar a depressão, delírios e alucinações (Bennett *et al.*, 2015).

DA é caracterizada por uma deterioração mental progressiva associada à degeneração e perda de neurónios localizados em regiões do cérebro relevantes para as funções cognitivas superiores. O seu diagnóstico é baseado em duas principais características histopatológicas: placas senis, que são depósitos extracelulares do peptídeo  $\beta$ -amilóide, e emaranhados neurofibrilares, que são inclusões somáticas da proteína Tau (Bignante *et al.*, 2013).

Vários fatores genéticos, ambientais e interações de genes podem estar envolvidos na ocorrência e progressão da doença (An e Kim, 2014).

Estima-se que mais 30 milhões de pessoas no mundo sofrem desta doença, e estudos epidemiológicos prevêm que este número vai aumentar exponencialmente nas próximas décadas devido ao envelhecimento sustentado da população humana (Bignante *et al.*, 2013; Simoncini *et al.*, 2015). Homens e mulheres podem ser igualmente afetados, no entanto, em termos absolutos, existe uma maior prevalência de mulheres afetadas, visto que as mulheres vivem durante mais tempo do que os homens. Não há diferenças étnicas ou raciais na predileção pela DA (Knopman, 2016).

A DA pode ser classificada em dois subtipos: início precoce e início tardio.

### a) DA de início precoce

A Doença de Alzheimer familiar representa uma minoria (5 % -10 %). Esta pode ser caracterizada pelo padrão da herança mendeliana. Para além disso, existem também relatos

de casos sem história familiar, sendo designada por DA de início precoce esporádica (An e Kim, 2014).

Este subtipo da DA está associado a três genes que são considerados fatores de risco: Proteína Precursora Amilóide (PPA); presenilina 1 (PSEN 1) e presenilina 2 (PSEN 2). Mutações nestes genes podem resultar na alteração da proteína  $\beta$ -amilóide e, assim conduzir à apoptose dos neurónios e à demência (An e Kim, 2014).

O gene PPA está localizado no cromossoma 21. A triplicação do cromossoma 21 origina a triplicação do gene PPA, podendo causar o aumento da sua expressão e acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Este gene contém 19 exões que codificam a proteína PPA. O peptídeo  $\beta$ -amilóide é codificado pelos exões 16 e 17. Após a transcrição e *splicing* foram identificadas pelo menos cinco isoformas da proteína PPA que continham a sequência do peptídeo  $\beta$ -amilóide (An e Kim, 2014).

## **b) DA de início tardio**

Neste subtipo da DA, vários genes têm sido descritos como potenciais fatores de risco. No entanto, fatores não genéticos também podem estar envolvidos na progressão da doença (An e Kim, 2014).

O gene apolipoproteína E (ApoE), localizado no cromossoma 19, é um importante exemplo de um fator de risco genético associado a este tipo de doença (An e Kim, 2014).

A apolipoproteína E é o principal transportador de colesterol no cérebro, que pode estar envolvido na manutenção e reparação neuronal. ApoE liga-se a vários recetores na superfície celular, que estão envolvidos no transporte de lípidos, metabolismo da glucose, sinalização neuronal e função mitocondrial. Normalmente, ApoE liga-se ao peptídeo  $\beta$ -amilóide, desempenhando um papel importante na sua remoção. Foram descritos dois sítios polimórficos do gene ApoE humano, localizados no codão 112 e 158. Existem pelo menos três variações principais desse gene, designados de alelos “E2”, “E3” e “E4”. O alelo E3 foi definido como um alelo normal por Cys no codão 112 e Arg no codão 158, enquanto os alelos E2 e E4 transportam os polimorfos Arg158Cys e Cys112Arg, respetivamente. Podem ser distinguidos seis génotipos diferentes com as seguintes combinações: homocigóticos: E4/E4, E3/E3, e E2/E2 e heterocigóticos: E2/E3, E2/E4, E3/E4. O alelo E3 é o mais comum aparecendo numa percentagem de 77 %, enquanto E2 em 8 % e E4 em 15 %. No entanto, frequências mais altas do alelo E4 foram encontradas em pacientes com DA (An e Kim, 2014).

A natureza patogénica do alelo E4 pode ser associada a uma mudança estrutural da proteína ApoE. Esta proteína tem dois domínios funcionais: N-terminal e C-terminal, ligados por uma região charneira. O alelo E4 pode promover interações entre os domínios, através da alteração da orientação de Arg61 no domínio N-terminal. A Arg112 pode interagir com Glu255 no domínio C-terminal, resultando em mudanças estruturais da proteína ApoE, morte neuronal e neurodegeneração (An e Kim, 2014).

## **Mecanismo fisiopatológico do Alzheimer**

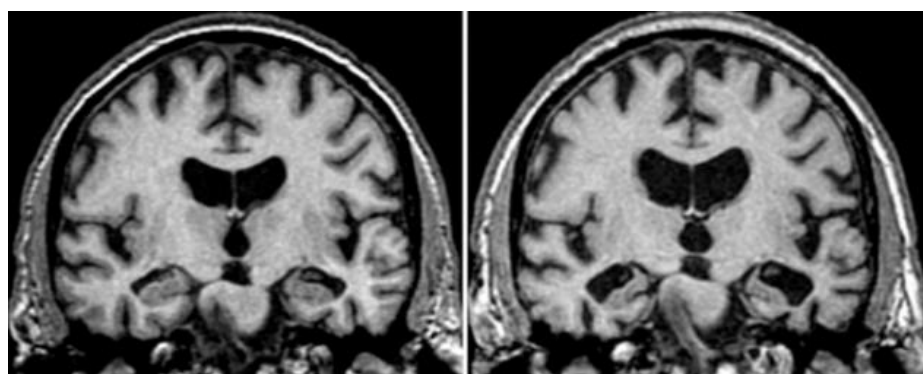
O cérebro das pessoas que têm DA é caracterizado pela acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide em placas senis e pela hiperfosforilação da proteína Tau em emaranhados neurofibrilares (Spire-Jones e Hyman, 2015).

A hipótese mais aceite para esta doença sugere que a agregação e acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide no cérebro desencadeia uma cascata de eventos patológicos levando a uma disfunção neuronal progressiva. No entanto, o papel fisiológico deste peptídeo solúvel continua a ser debatido, uma vez que existem várias evidências que indicam que este modula a função sinática. Assim sendo, tem havido um esforço no sentido de explicar os mecanismos subjacentes à agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide e a sua neurotoxicidade (Bignante *et al.*, 2013).

A Tomografia de Emissão de Positrões (PET) e ensaios de imagiologia mostram que o peptídeo  $\beta$ -amilóide começa a acumular-se no neocórtex, muito antes do aparecimento da doença (quase 20 anos). As placas senis representam a fase final do processo da DA. (Knopman, 2016).

A extensão regional dos emaranhados neurofibrilares na DA aumenta à medida que a doença evolui. Estes aparecem no lobo temporal medial e tronco cerebral nos indivíduos cognitivamente normais, ou seja, no início da doença, mas ainda sem sintomas. Quando os sintomas clínicos começam a desenvolver-se, os emaranhados encontram-se na associação dos neocórtices dos lobos frontal, parietal e temporais. E, na fase mais grave e final da doença estes localizam-se nos lobos occipitais e no córtex sensorial. Assim sendo, pode-se concluir que a localização dos emaranhados neurofibrilares corresponde à evolução clínica e gravidade da DA. Quando há apenas um transtorno cognitivo leve, a primeira manifestação clínica relativamente aos emaranhados é o facto de se encontrarem no córtex entorrinal e hipocampo, regiões envolvidas na memória episódica (Knopman, 2016).

Imagens de Ressonância Magnética (IRM) mostram a atrofia do hipocampo e redução do volume do mesmo e em pacientes com comprometimento cognitivo leve que mais tarde evolui para demência observa-se um aumento da atrofia das áreas de associação corticais chave, tais como os lobos temporais laterais, parietal inferior, córtex cingulado posterior e lobos frontais laterais (Figura 1) (Knopman, 2016).

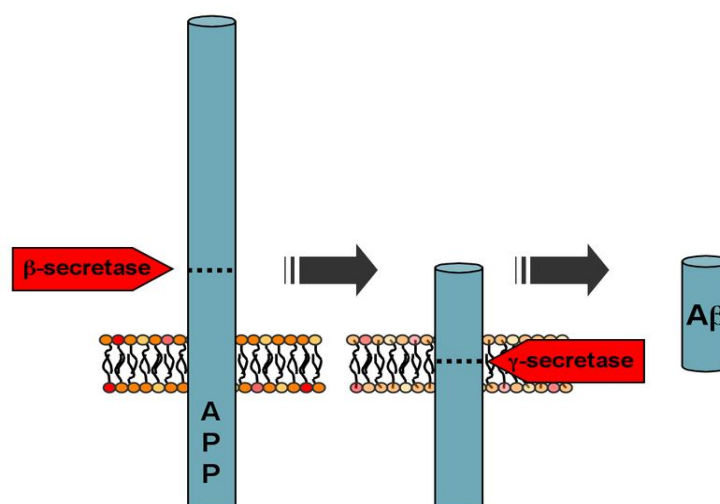


**Figura 1** – Imagens de ressonância magnética de um paciente com doença de Alzheimer. A imagem da esquerda foi realizada quando o paciente era clinicamente normal. A do lado direito foi realizada 11 anos depois, quando o paciente estava demente. Observou-se um aumento drástico da atrofia do hipocampo (Knopman, 2016).

A neurotransmissão colinérgica é a mais afetada na DA. As células que têm origem na neurotransmissão colinérgica do hipocampo e áreas neocorticais estão localizadas no septo, faixa diagonal e núcleo basal (Knopman, 2016).

Mutações na PPA, PSEN1 e PSEN2 desempenharam um papel crucial no avanço da compreensão da DA. PPA é uma proteína transmembranar que, quando clivada, origina o peptídeo  $\beta$ -amilóide que representa uma característica patológica fundamental da DA (Bennett *et al.*, 2015).

A clivagem de PPA é realizada por um conjunto de três secretases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). A clivagem através da  $\beta$ -secretase é um pré-requisito para originar o peptídeo  $\beta$ -amilóide. A  $\alpha$ -secretase cliva dentro da sequência desse mesmo peptídeo impedindo a produção da PPA. Pelo contrário, a  $\gamma$ -secretase cliva noutro lugar deixando o fragmento  $\beta$ -amilóide intacto permitindo, assim a formação do peptídeo  $\beta$ -amilóide (Figura 2). A PSEN1 e a PSEN2 são ambas componentes da  $\gamma$ -secretase e levam ao desenvolvimento de DA, enquanto mutações na  $\beta$ -secretase não provocam a doença (Bignante *et al.*, 2013).



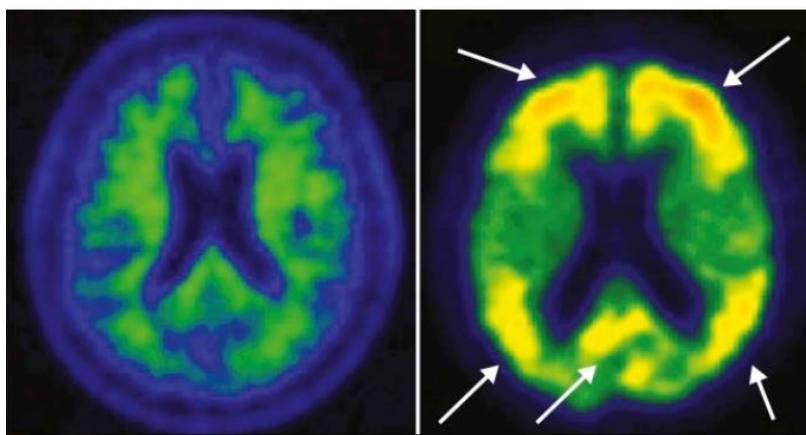
**Figura 2** – Clivagem da PPA pela  $\beta$ -secretase e pela  $\gamma$ -secretase (Knopman, 2016).

Existem várias evidências que indicam que a ApoE está envolvida na deposição amilóide, muito provavelmente através da via de remoção do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Sendo que podem estar outros mecanismos envolvidos (Spires-Jones e Hyman, 2015).

No ser humano, existem três variantes alélicas do gene ApoE, determinadas por diferentes aminoácidos, cisteína e arginina nas posições 112 e 158, como já foi descrito anteriormente. Uma das variantes alélicas, com arginina em ambas as posições, designada de ApoE4, está associada a um risco aumentado de 14 vezes para a DA em homocigóticos e em 3 vezes em heterocigóticos. A presença desta variante nem sempre causa DA, havendo casos de portadores da ApoE4 que nunca a desenvolveram (Knopman, 2016).

O diagnóstico da DA, como da própria demência, é em grande parte baseado na história clínica e num exame do estado mental. O elemento-chave é o comprometimento cognitivo, essencialmente a perda de memória. Se o exame do estado mental e a história clínica forem compatíveis e, depois de certas exclusões, o diagnóstico da Doença de Alzheimer pode ser feito com confiança (Knopman, 2016).

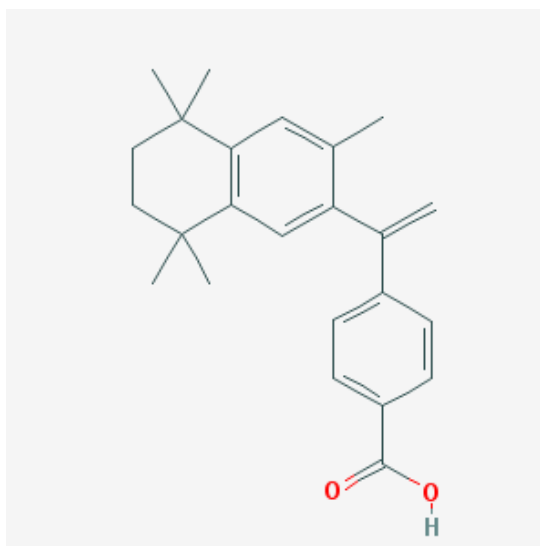
A fisiopatologia da DA em pacientes com comprometimento cognitivo leve ou demência pode ser avaliada através do líquido cefalorraquidiano (LCR), marcadores proteicos (peptídeo  $\beta$ -amilóide e proteína Tau) e com imagens do cérebro (IRM estrutural e PET) (Figura 3) (Knopman, 2016).



**Figura 3** – PET da deposição amilóide num paciente com DA. A imagem da esquerda representa o indivíduo sem retenção amilóide cortical. A imagem da direita corresponde a um paciente com demência e mostra a retenção amilóide proeminente nos lobos frontal, parietal e no córtex cingulado posterior (Knopman, 2016).

### Estudos realizados com a molécula bexaroteno

A molécula bexaroteno foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1999. A 29 de Março de 2001 a Autorização de Introdução no Mercado (AIM) foi validada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) para toda a União Europeia e em 2006 uma empresa japonesa “Eisai Lta.” comprou os direitos para o Targretin (Bexarotene –  $C_{24}H_{28}O_2$  - PubChem, [s.d.]) (Tousi, 2015).



**Figura 4** – Estrutura da molécula bexaroteno (Bexarotene –  $C_{24}H_{28}O_2$  - PubChem, [s.d.]).



Esta molécula pertence à família dos retinóides (substâncias que derivam da vitamina A) e é utilizada como antineoplásica no tratamento do linfoma cutâneo das células T. Atua ligando-se seletivamente aos recetores retinóides X (RXRs), induzindo a diferenciação celular e a apoptose e impedindo o desenvolvimento de resistência aos fármacos (*Bexarotene* –  $C_{24}H_{28}O_2$  - PubChem, [s.d.]).

O bexaroteno com a fórmula molecular  $C_{24}H_{28}O_2$  e um peso molecular de 348,47792 g/mol, é um pó sólido branco e é fracamente solúvel em água. Este é solúvel em solventes orgânicos como o etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), e dimetilformamida. A sua solubilidade nestes solventes é aproximadamente 0,5, 10 e 20 mg/ml, respetivamente. (*Bexarotene* –  $C_{24}H_{28}O_2$  - PubChem, [s.d.]).

O bexaroteno é um antineoplásico que mostrou recentemente evidências na restauração das funções cognitivas em modelos animais com DA (Fantini *et al.*, 2014). No entanto, o seu mecanismo de ação continua a ser investigado, particularmente o efeito na redução das placas amilóides nas células cerebrais.

Foram efetuados alguns estudos que podem na sua essência ser agrupados em três abordagens:

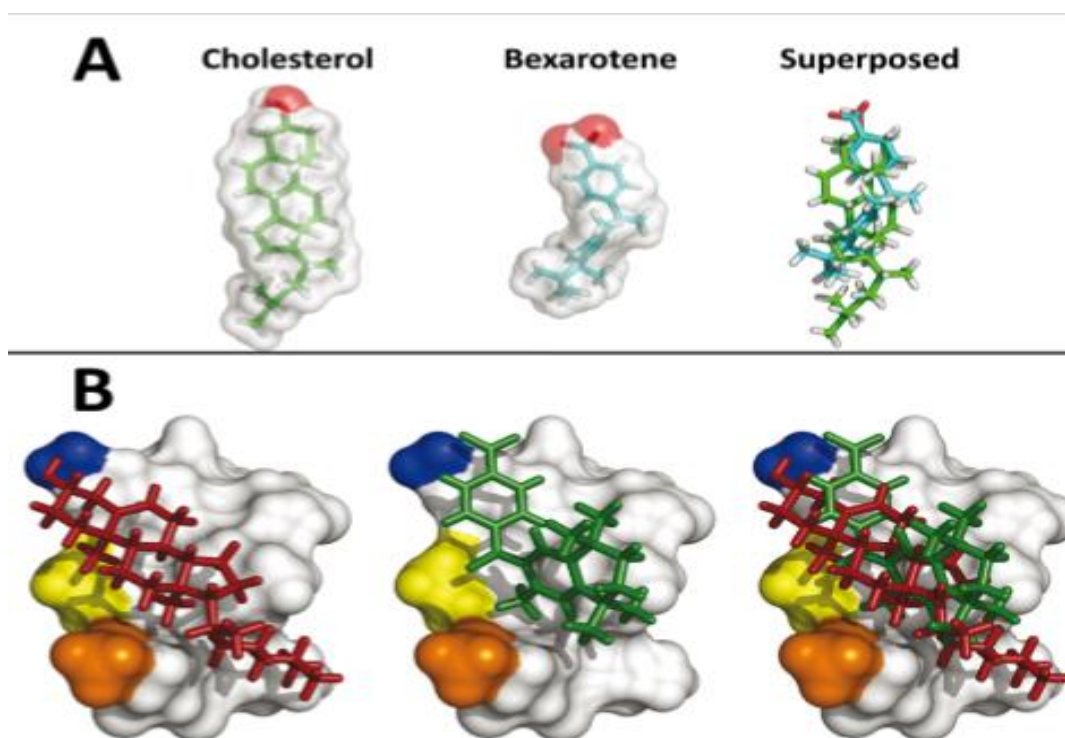
#### **a) Bloqueio dos canais iónicos permeáveis ao cálcio formados pelas espécies neurotóxicas pelo bexaroteno**

Fantini e os seus colaboradores (Fantini *et al.*, 2014) realizaram um estudo que mostrou que o tratamento com bexaroteno pode induzir uma redução significativa do peptídeo  $\beta$ -amilóide nas células cerebrais. Assim sendo, tentou-se encontrar o mecanismo de ação que pudesse explicar os efeitos benéficos da molécula, tendo em conta o processo de oligomerização do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Isto porque existem várias evidências de que os oligómeros das proteínas amilóides são as principais espécies moleculares neurotóxicas na DA, em vez das placas amilóides.

Os oligómeros tóxicos do peptídeo  $\beta$ -amilóide são incorporados na membrana plasmática das células neuronais, onde são formados poros amilóides permeáveis ao cálcio. A prevenção destes dois fenómenos pode ser realizada através de moléculas lipofílicas e/ou anfifílicas, uma vez que se trata de um meio lipídico. E, de facto o bexaroteno é uma molécula anfifílica que pode interagir com os lípidos da membrana.

O colesterol é um dos lípidos que se encontra na membrana plasmática das células neuronais e a sua concentração neste local desempenha um papel muito importante no controlo da neurotoxicidade do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Isto acontece porque este interage

especificamente com os peptídeos  $\beta$ -amilóides monoméricos, facilita a sua entrada na membrana e estimula a oligomerização funcional nos canais iónicos permeáveis ao cálcio.



**Figura 5** – A) Moléculas de colesterol e de bexaroteno e a sua sobreposição. A superfície molecular está colorida a branco e os átomos de oxigénio a vermelho.

B) A vermelho está representada a molécula de colesterol sobre o peptídeo  $\beta$ -amilóide (representado a branco), o bexaroteno aparece colorido a verde e finalmente as duas moléculas sobrepostas sobre o peptídeo. A azul temos a Lys28, a amarelo Ile31 e a laranja Met35 (Fantini et al., 2014).

Esse estudo designou o domínio da ligação do colesterol ao peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> como o domínio que abrange os resíduos 22-35. Este contém toda a sequência de  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>, peptídeo  $\beta$ -amilóide sintético que tem sido utilizado em experiências para estudar a DA. Também demonstrou que o bexaroteno e o colesterol possuem analogia estrutural (Figura 5) e que este fármaco inibe competitivamente a ligação do colesterol ao peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>, assim como impede o processo de oligomerização dos peptídeos  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> e  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub> nos poros amilóides permeáveis ao cálcio.

Tanto o bexaroteno como o colesterol são moléculas anfífilicas com uma grande parte apolar e uma pequena polar (com um grupo carboxílico no caso do bexaroteno e um grupo hidroxilo no caso do colesterol). Ambas as moléculas interagem com o domínio C-

terminal do peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> e atuam no mesmo sítio de ligação ao peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>. A energia de ligação entre o bexaroteno e o peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub> é significativamente maior do que a do colesterol a esse mesmo peptídeo. Para além disso, o resíduo Ser26 não está envolvido na ligação deste fármaco, fazendo com que este se ligue inativamente ao peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>25-35</sub>.

Os estudos apresentados por Fantini e a sua restante equipa estão no cruzamento de dois distintos, mas convergentes campos de investigação. Por um lado, os oligómeros do peptídeo  $\beta$ -amilóide são atualmente reconhecidos como as espécies moleculares tóxicas principais que contribuem para DA, em vez das placas amilóides. Por outro lado, existem várias evidências que sugerem que o colesterol é um cofator epidemiológico chave da DA, uma vez que interage com o peptídeo  $\beta$ -amilóide, facilitando a sua entrada na membrana plasmática das células neuronais e tem um papel importante na formação dos poros amilóides.

Relativamente ao papel do colesterol na doença de Alzheimer ainda não existem novas estratégias terapêuticas, para além da utilização das estatinas na redução dos níveis deste no plasma. No entanto, investigou-se o papel do bexaroteno devido ao facto deste imitar o colesterol e prevenir os efeitos neurotóxicos dos oligómeros induzidos por este. Nesse sentido, o bexaroteno, até então conhecido por ser um antineoplásico, pode ser considerado como um protótipo de uma nova opção terapêutica para a DA. O seu rápido efeito para inibir a formação dos canais amilóides em células em cultura, é consistente com a rápida recuperação das funções cognitivas observadas em modelos animais que possuíam a doença. Assim como, a sua capacidade para se ligar ao peptídeo  $\beta$ -amilóide em solução pode explicar a sua remoção nas células neuronais dos animais em estudo.

Este fármaco como é uma molécula anfifílica penetra facilmente um meio lipídico, ou seja, a membrana plasmática. E, sendo um composto semelhante ao colesterol, ocupa o domínio de ligação do colesterol ao peptídeo, impedindo desta forma a ligação do colesterol às espécies tóxicas.

Por todas estas razões, é de extrema importância descobrir novos medicamentos capazes de atingir os oligómeros tóxicos incorporados na membrana e perturbar a sua associação com o colesterol. Esta abordagem descrita pode servir como uma estratégia de triagem simples para identificar esses fármacos.

## **b) Efeito do bexaroteno na inibição do processo de agregação do peptídeo $\beta$ -amilóide**

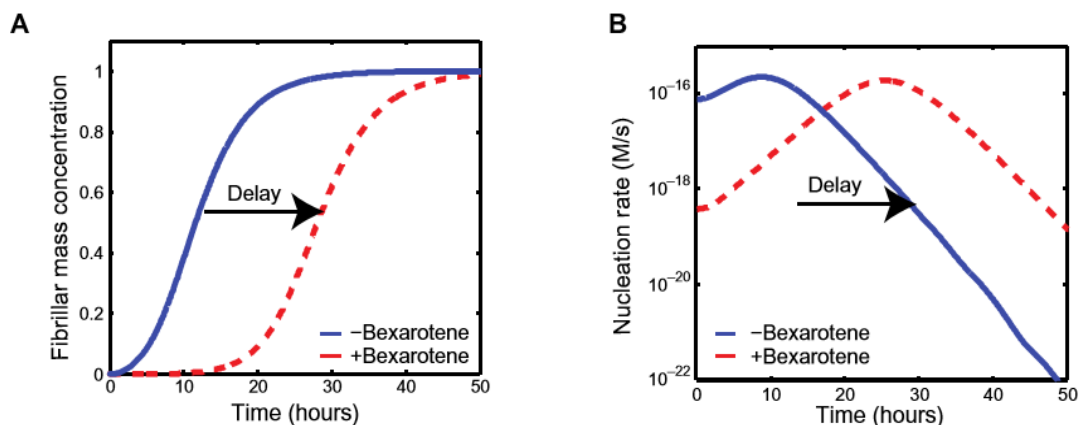
Habchi e a restante equipa (Habchi *et al.*, 2016) tentaram descobrir novos fármacos com efeitos inibitórios na agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Para isso, usaram um número limitado de moléculas já conhecidas e aprovadas pela FDA com algumas características específicas que pudessem induzir o efeito pretendido, sendo que o bexaroteno foi uma das moléculas escolhidas.

Procurou-se também elucidar o mecanismo de agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide e de que maneira a molécula escolhida poderia interferir em processos específicos da reação de agregação (nucleação primária, alongação e nucleação secundária).

A inibição da nucleação primária atrasará significativamente a reação de agregação, mas sem interferir com o número total de oligómeros tóxicos formados. Relativamente aos outros processos, poderá haver um aumento ou diminuição do número de oligómeros tóxicos se suprimirem a alongação ou nucleação secundária, respetivamente.

Os resultados mostraram que na presença de bexaroteno, inibindo a nucleação primária, há um atraso progressivo na reação de agregação dependente de concentrações crescentes desta molécula. Verificou-se também um atraso induzido por este fármaco correspondente a uma diminuição na taxa de nucleação secundária. No entanto, concluíram que o seu efeito é mais seletivo na nucleação primária do que na secundária.

Quando se explorou se o atraso da reação de agregação resultante da inibição da nucleação primária pelo bexaroteno poderia estar associada a um atraso na formação de espécies neurotóxicas, os resultados foram positivos. No entanto, o número total dessas espécies permaneceu inalterado (Figura 6).



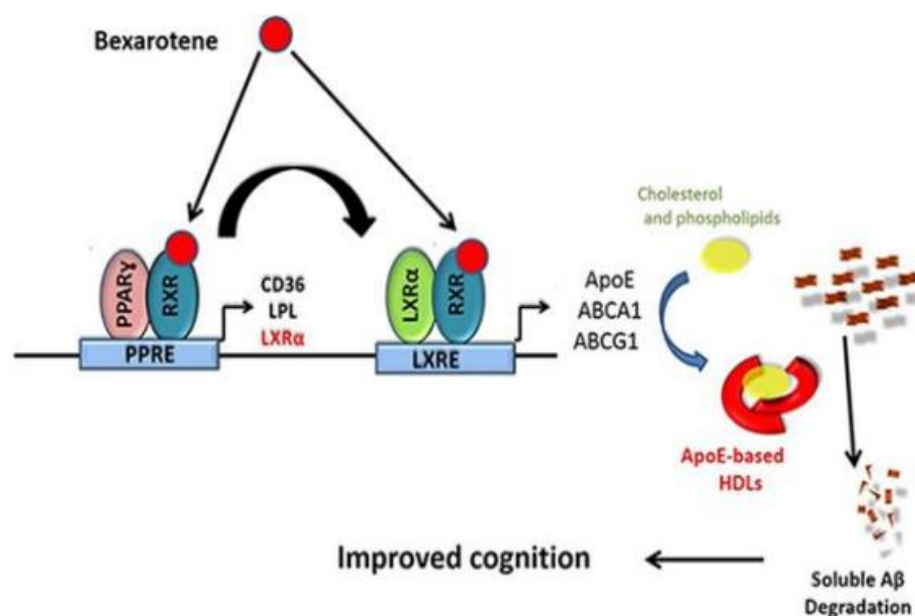
**Figura 6** – O bexaroteno atrasa a formação de espécies tóxicas  $A\beta_{42}$ . (A e B)- Simulações numéricas dos perfis de reação (a) e das taxas de nucleação (B) para uma solução de  $A\beta_{42}$ , na ausência e na presença de um excesso de 20 vezes de bexaroteno. As linhas azuis correspondem a uma reação de agregação de controlo na ausência de bexaroteno. As linhas vermelhas a tracejado mostram o comportamento na presença de bexaroteno. Observou-se um atraso na evolução da taxa de nucleação total (isto é, tanto a nucleação primária e secundária). Verificou-se que a formação de oligómeros segue uma evolução parabólica em que o número de oligómeros formados durante a agregação de  $A\beta_{42}$  sozinho começa a diminuir no ponto em que o número na presença de bexaroteno começou a aumentar (Habchi *et al.*, 2016).

Os resultados anteriores foram verificados medindo a citotoxicidade em células humanas do neuroblastoma (SH-SY5Y) resultantes da agregação de uma solução do peptídeo  $\beta$ -amilóide na ausência e na presença de bexaroteno. Os dados mostraram que o peptídeo na forma monomérica não mostrou toxicidade quer na presença ou ausência do fármaco. Os oligómeros formados na ausência de bexaroteno, revelaram um nível de toxicidade mais elevada do que na presença deste. Em contrapartida, após um maior tempo de incubação, a toxicidade na presença do composto em estudo aumentou para um valor semelhante ao observado na sua ausência e a toxicidade do peptídeo sozinho diminuiu. Tais factos provam que existiu um atraso induzido pelo composto na formação das espécies tóxicas em células do neuroblastoma (Habchi *et al.*, 2016).

Este estudo descreve o desenvolvimento e a aplicação de uma estratégia global para a identificação de moléculas com ação anti-DA. A compreensão dos detalhes moleculares dos processos de inibição, criam oportunidades para identificar de forma racional agentes terapêuticos eficazes que podem eventualmente levar à descoberta de novas moléculas para o tratamento da DA.

### c) Reversão dos efeitos patológicos de ApoE4 no cérebro devido ao tratamento com bexaroteno

A transcrição da ApoE é facilitada pela ativação e heterodimerização do RXR com os recetores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPAR) ou com recetores X do fígado (LXR). Estes recetores nucleares também ativam proteínas como *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), que são necessárias para a remoção do peptídeo  $\beta$ -amilóide através da ApoE (Figura 7) (Boehm-Cagan e Michaelson, 2014).



**Figura 7** – Efeito do bexaroteno na remoção do peptídeo  $\beta$ -amilóide através de ApoE (Cummings, J. et al., 2016).

ABCA1 estimula preferencialmente o efluxo de colesterol e a sua ligação a recetores isentos de lípidos, tais como ApoE livre de lípidos.

Portanto, uma série de agonistas de RXR têm sido testados como potenciais agentes terapêuticos, como é o caso do bexaroteno, no que diz respeito ao aumento da remoção do peptídeo  $\beta$ -amilóide pela ApoE.

A ApoE4 é o fator de risco genético mais comum para a DA e sofre menos lipidação do que a sua forma DA benigna correspondente, ApoE3. Tem sido sugerido que os efeitos patológicos da ApoE4 são mediados por mecanismos relacionados com os lípidos.

Anat Boehm-Cagan e Daniel M. Michaelson (Boehm-Cagan e Michaelson, 2014) investigaram os efeitos do bexaroteno nos níveis de ApoE, ABCA1, ApoE3 e ApoE4 em

ratos com DA e avaliaram em que medida é que este fármaco inverte ou aumenta o efeito patológico de ApoE4.

Durante a investigação, demonstrou-se que o tratamento de ratos com o agonista de RXR, bexaroteno, estimula a síntese de ABCA1 e ApoE e que esta leva à eliminação do peptídeo  $\beta$ -amilóide no cérebro e, por sua vez, à reversão de défices cognitivos.

Os níveis imunohistoquímicos de  $A\beta_{42}$  foram maiores nos ratos portadores de ApoE4 do que em portadores de ApoE3. O tratamento com bexaroteno reduziu os níveis de  $A\beta_{42}$ , tanto em portadores de ApoE3 como de ApoE4. No entanto, o efeito foi mais significativo em ratos com ApoE4.

Em conclusão, os resultados mostram que o tratamento com bexaroteno dos ratos com a ApoE4, inverte as alterações cognitivas e neuronais induzidas pela ApoE4 *in vivo* e sugerem que isto é devido à reversão da deficiência de lipidação de ApoE4. Posto isto, existe uma grande possibilidade de que a ativação de RXR e um aumento dos níveis de ABCA1 podem ser úteis no tratamento de humanos portadores de ApoE4 com DA.

## Ensaio clínico com a molécula bexaroteno

A molécula bexaroteno, usada até agora no tratamento do linfoma cutâneo das células T, poderá ter um enorme potencial no tratamento da Doença de Alzheimer, visto que mostrou resultados bastante promissores em modelos animais. No entanto, a investigação contínua do seu mecanismo em diversos processos é fulcral. Como tal, foram feitas algumas experiências em humanos, de maneira a testar os resultados já observados em animais.

Cummings e os seus colaboradores (Cummings, J. L. *et al.*, 2016) estudaram o efeito do bexaroteno em vinte indivíduos com DA e estes foram randomizados para receber 300 mg do fármaco ou placebo durante quatro semanas, também foram realizadas análises pré especificadas pelo genótipo (portadores de ApoE4 e não portadores).

Os doentes eram homens e mulheres com idades entre os 50 e os 90 anos. Para poderem fazer parte do ensaio tinham de ter um *scanner* PET positivo e a pontuação de um Mini Exame do Estado Mental (MMSE) tinha de ser entre 10 e 20 (inclusive). Os indivíduos tinham pelo menos 8 anos de estudos, eram capazes de comunicar eficazmente com a equipa de teste e não tinham doenças não controladas.

Os participantes do estudo receberam 75 mg de bexaroteno ou placebo duas vezes por dia nos primeiros sete dias. A dose foi aumentada para 150 mg duas vezes por dia ou placebo correspondente durante os vinte dias posteriores. Estes, depois das primeiras quatro semanas receberam todos bexaroteno e foram tratados com atorvastatina para níveis elevados de colesterol e clofibrato para os níveis elevados de triglicédeos, quando estes surgiram no decorrer do estudo.

Os resultados mostraram que não foi registada nenhuma alteração entre os doentes que foram tratados com bexaroteno e aqueles que receberam placebo. Nas análises pré especificadas pelo genótipo, houve uma redução significativa da carga amilóide no cérebro dos não portadores de ApoE4. No entanto, nos portadores de Apo4 não se registou nenhuma alteração. Nos doentes tratados com bexaroteno houve um aumento significativo nos níveis séricos de triglicédeos e colesterol. Também não se verificaram alterações nas funções cognitivas. Para além disso, os resultados evidenciam uma correlação significativa entre a redução amilóide cortical e níveis séricos elevados do peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub>, sugerindo que formas solúveis do peptídeo foram transferidas do cérebro para o sangue. Assim como, entre os níveis séricos de triglicédeos elevados e diminuição amilóide cortical, em não portadores de ApoE4.



O genótipo ApoE4 está associado a uma maior carga amilóide, conforme medido por imagem amilóide. Os portadores do gene ApoE4 têm uma maior deposição amilóide cortical e vascular do que os não portadores. A função da ApoE e a sua capacidade para se ligar ao peptídeo  $\beta$ -amilóide são influenciadas pelo seu estado de lipidação, que é deficiente em portadores de ApoE4.

Este estudo teve um pequeno número de participantes, e os subgrupos do genótipo ApoE também foram pequenos, limitando assim, as conclusões que podem ser extraídas. Os indivíduos foram excluídos quando apresentaram níveis anormais de lipídios no início do estudo (seis indivíduos foram excluídos nesta base) ou quando tinham alguma doença não controlada (seis foram excluídos nesta base). Neste sentido, os resultados devem ser interpretados com cautela, visto que os efeitos de bexaroteno nestas situações são desconhecidos. Para além disso, o período de exposição deverá ser mais longo, de modo a avaliar os efeitos sobre os resultados clínicos, para determinar se a remoção amilóide em portadores de ApoE4 é observada e se há alteração das funções cognitivas.

O desfecho primário deste estudo não foi muito positivo, pois os dados sugerem que o bexaroteno reduziu os níveis da deposição amilóide no cérebro, aumentou a quantidade do peptídeo  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub> no soro em não portadores ApoE4 e os níveis séricos de triglicéridos e colesterol mostraram-se elevados, podendo representar um maior risco cardiovascular. Posto isto, bexaroteno não deve ser administrado fora de um ambiente de pesquisa.

## Conclusões

Perante os estudos apresentados, podemos concluir que o papel do bexaroteno no tratamento do Alzheimer é um pouco controverso. Embora tenha mostrado resultados bastante promissores em modelos animais na inibição competitiva da ligação do colesterol ao peptídeo  $\beta$ -amilóide, na inibição da reação de agregação desse mesmo peptídeo e na redução dos efeitos patológicos da ApoE4 no cérebro, o mesmo não acontece quando este foi testado em humanos. Posto isto, é de extrema importância continuar a investigação neste campo, mas com bastante cautela, visto que esta molécula apresentou alguns riscos associados ao aumento de colesterol e triglicéridos após a sua administração.

## Bibliografia

AN, S. S. A.; KIM, S. - The genetics of Alzheimer ' s disease. 2014) 535–551.

BENNETT, D. *et al.* - Clinical manifestations. 165:1 (2015) 200–220. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.006.Epigenomics.

Bexarotene \_ C24H28O2 - PubChem - [s.d.].

BIGNANTE, E. A. *et al.* - NIH Public Access. 34:11 (2013) 2525–2537. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.021.Amyloid.

BOEHM-CAGAN, A.; MICHAELSON, D. M. - Reversal of apoE4-driven brain pathology and behavioral deficits by bexarotene. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. . ISSN 1529-2401. 34:21 (2014) 7293–301. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5198-13.2014.

CUMMINGS, J. *et al.*-Bexarotene - First Clinical Results Highlight Contradictions. (2016) 2–8.

CUMMINGS, J. L. *et al.* - proof-of-concept trial of bexarotene in moderate Alzheimer ' s disease. **Alzheimer's Research & Therapy**. . ISSN 1758-9193. (2016) 1–9. doi: 10.1186/s13195-016-0173-2.

FANTINI, J. *et al.* - Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides. **ACS chemical neuroscience**. . ISSN 1948-7193. 5:3 (2014) 216–24. doi: 10.1021/cn400183w.

HABCHI, J. *et al.* - An anticancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A b 42 aggregates linked with Alzheimer ' s disease. February (2016).

KNOPMAN, D. S. - **402 – Alzheimer Disease and Other Dementias** [Em linha]. Twenty Fift ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2016 Disponível em WWW:URL:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455750177004025>. ISBN 9781455750177 (acedido a 5 de junho de 2016).

SIMONCINI, C. *et al.* - Alzheimer's pathogenesis and its link to the mitochondrion. **Oxidative medicine and cellular longevity**. . ISSN 1942-0994. (2015):2015) 803942. doi: 10.1155/2015/803942.

SPIRES-JONES, T. L.; HYMAN, B. T. - **Alzheimer ' s disease**. ISBN 4401316511895.

TOUSI, B. - The emerging role of bexarotene in the treatment of Alzheimer ' s disease: current evidence. (2015) 311–315.

