

Joana Margarida Silvestre da Costa dos Santos

# Imunomodulação no tratamento na doença de Alzheimer

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Margarida Silvestre da Costa Santos

# Imunomodulação no tratamento na doença de Alzheimer

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

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Margarida Silvestre da Costa dos Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010149968, 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, 13 de setembro de 2016.

---

(Joana Margarida Silvestre da Costa dos Santos)

O Tutor da Monografia

---

(Professor Doutor Bruno Neves)

A Aluna

---

(Joana Margarida Silvestre da Costa dos Santos)

## **Agradecimentos**

Ao meu pai, que todas as noites me presenteia com os mais belos mantos de estrelas para cobrir a dor da saudade.

À minha mãe por ter desempenhado o seu papel tão majestosamente bem.

Aos meus pais por me terem ensinado que a bondade é a mais bela das virtudes, que o estudo, o trabalho e dedicação nos são motor daquilo que somos, que o conhecimento nunca é em demasia e que, tão importante como saber, é aprender. Aos meus pais que fizeram de quatro paredes um mundo cheio de encanto e que nunca me impediram de o ver arco-íris mesmo quando ele era pintado em tons de cinza. Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela humanidade, pelas utopias, pelo par de asas e pelo coração inteiro.

Ao Filipe, pedaço de luz eterno, por ser o bom-dia, o boa-tarde, o boa-noite, todos os dias, durante oito anos volvidos; por me ver como um ser especial, por me inundar o coração de amor, tanto amor; por me fazer acreditar nas minhas capacidades, por ser a realidade dos meus sonhos, a consciência das minhas asas; por ter o olhar mais doce, o abraço mais mundo- por me ser casa, mundo, vida.

Ao Professor Doutor Bruno Neves, pela liberdade na escolha do tema, pela preocupação perante ausência, pela disponibilidade, pela excelência.

À minha família de quatro patas e às pessoas com quem compartilho a minha vida, com as quais crio laços fortes, inabaláveis, resistentes à distância e ao tempo.

A todos os que sempre admiraram os meus olhos, espelhos da alma, filtros do mundo, e que sempre me dizem que há um lugar para mim no mundo farmacêutico.

À arte, em todas as suas formas, que me permite libertar de monstros, ver com mais clareza, estender um pouco mais as asas.

## Índice

Lista de Abreviaturas .....	1
Lista de Figuras.....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	4
1. Introdução.....	5
1.1. Fisiopatologia.....	5
1.1.1. Precursor da Proteína Amiloide.....	5
1.1.2. Peptídeo A $\beta$ .....	6
1.1.3. Proteína Tau.....	6
1.1.4. Hipótese Cascata Amiloide .....	7
1.1.5. DA familiar e esporádica.....	7
1.1.6. Sintomatologia .....	8
1.2. Marcadores biológicos da doença de Alzheimer .....	8
1.3. Terapêutica medicamentosa .....	8
2. Estratégias imunomoduladoras.....	9
2.1. Imunoterapia A $\beta$ ativa.....	10
2.1.1. Vacinas de segunda geração .....	12
2.1.2. Imunização com DNA .....	13
2.1.3. Terapia celular.....	13
2.2. Imunoterapia A $\beta$ passiva.....	14
2.2.1. Programas de prevenção.....	18
2.3. Imunoterapia direcionada para a proteína Tau .....	19
3. Desafios.....	20
4. Conclusão.....	22
5. Lista de Referências.....	23

## **Lista de Abreviaturas**

A $\beta$ - *Amyloid Beta*

AD- *Alzheimer's disease*

API- *Alzheimer's Prevention Initiative*

APOE- *Apolipoproteína E*

A4- *Anti-Amyloid Treatment for Asymptomatic Alzheimer's Disease*

BHE- *Barreira hematoencefálica*

DA- *Doença de Alzheimer*

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

DIAN- *Dominantly Inherited Alzheimer Network*

FAD- *Familial Alzheimer's disease*

IgG- *Imunoglobulina humana G*

KLH- *Keyhole limpet hemocyanin*

LCR- *Líquido cefalorraquidiano*

NFTs- *Neurofibrillary tangles*

NMDA- *N-metil-D-Aspartato*

PET-PIB- *Tomografia de emissão de positrões com o composto de Pittsburgh*

PPA- *Percursor da Proteína Amiloide*

SNC- *Sistema Nervoso Central*

## Lista de Figuras

Figura 1- Alvos possíveis para imunoterapia.....	10
Figura 2- Diagrama esquemático que ilustra os estados transicionais moleculares e macromoleculares de A $\beta$ (A) e como eles podem ser influenciados por estratégias de imunização passiva (B-D).....	15
Figura 3- Características comuns dos anticorpos anti- A $\beta$ e anti-Tau. ....	20

## Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência a nível mundial, afetando mais de 30 milhões de pessoas. Atendendo ao aumento da esperança média de vida, é espectável que o peso económico e social desta doença venha a aumentar drasticamente.

A patogénese da doença tem sido associada à ocorrência de micro derrames bem como à agregação, deposição, modificação e acumulação de peptídeos Beta Amiloides ( $A\beta$ ) e fosforilação e agregação da proteína Tau no cérebro. Assim, placas extracelulares, contendo várias formas de  $A\beta$  e nós neurofibrilares intracelulares, constituídos por proteínas Tau hiperfosforiladas, são os dois maiores marcadores patológicos da DA. A hipótese da cascata amiloide refere que a deposição  $A\beta$  é o evento inicial na patogénese da doença e que precede o aparecimento dos sintomas em largos anos.

Atualmente, não existe cura ou maneira de prevenir a doença; as terapêuticas disponíveis apenas dão benefícios sintomáticos temporários. Novas abordagens imunoterapêuticas têm demonstrado ser relativamente eficazes na redução da acumulação  $A\beta$ , indicando que a intervenção é mais eficaz nas fases iniciais da doença, realçando a importância de um diagnóstico o mais precocemente possível.

A terapêutica  $A\beta$  com imunização ativa e passiva tem um potencial elevado para ser eficaz na remoção destes peptídeos no cérebro, podendo, assim, retardar a progressão da patologia. Contudo, atingir resultados eficazes e seguros tem sido um grande desafio. Esforços estão a ser feitos continuamente para tratar indivíduos com risco de DA, antes ou nas fases iniciais do declínio cognitivo, com a esperança de prevenir ou atrasar a progressão da doença.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, Imunoterapia, Imunomodulação, Vacina, Vacinação, Beta-Amiloide, Proteína Tau,  $A\beta$ 42.

## **Abstract**

Alzheimer disease (AD) is the most common cause of dementia, afflicting more than 30 million people worldwide and, with the increase of life expectancy, the social and economic burden from this disease will increase drastically.

The pathogenesis of the disease has been associated with the occurrence of micro-strokes in brain vasculature and with aggregation, deposition, modification and accumulation of amyloid beta peptides (A $\beta$ ) in the brain, as well as phosphorylation and aggregation of Tau protein. Thus, extracellular plaques containing various forms of A $\beta$  and intracellular neurofibrillary tangles, composed of hyperphosphorylated Tau are the two major pathological hallmarks of the AD. The amyloid cascade hypothesis states that A $\beta$  deposition is the initial event in the pathogenesis of the disease and that it precedes the symptoms in many years.

Currently, there is no cure or way to prevent the disease; available therapies provide only temporary symptomatic benefits. However, novel immunotherapeutic approaches have been proven effective in reducing the accumulation of A $\beta$ . These interventions were shown to be more effective in the early stages of the disease, enhancing the importance of an early diagnosis.

A $\beta$  therapy by active and passive immunization has a high potential to be effective in the removal of these peptides in the brain, and may, therefore, slow the progression of the disease. However, achieving effective and safe results has been challenging. Efforts are continuously being made to treat individuals at risk for AD, before or at the earliest stages of cognitive decline with the hope of preventing or delaying disease progression.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Immunotherapy, Immunomodulation, Vaccine, Vaccination, Amyloid-Beta, Tau Protein, A $\beta$ 42.

## **I. Introdução**

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência para a qual, atualmente, não existe cura ou tratamento capaz de prevenir ou retardar a sua progressão. Afeta cerca de 36 milhões de pessoas em todo o mundo: existem cerca de 8 milhões de novos casos por ano e prevê-se que o número de pessoas com demência seja o dobro a cada vinte anos, atingindo os 66 milhões em 2030 e os 115 milhões em 2050<sup>1</sup>.

A DA foi descoberta em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer<sup>2</sup>. Esta doença afeta todos os grupos etários, prevalecendo, maioritariamente em pessoas com mais de 65 anos de idade<sup>3</sup>.

### **I.1. Fisiopatologia**

O mecanismo patológico nesta doença está interligado com a mudança conformacional de proteínas expressas normalmente- peptídeos A $\beta$  e proteínas Tau- que formam folhas beta tóxicas. Os depósitos de A $\beta$  formam placas neuríticas e angiopatia cerebral amiloide e as proteínas Tau hiperfosforiladas agregam com os neurónios, originando filamentos em forma de hélice, os nós neurofibrilares<sup>4</sup>. A agregação e conversão estrutural ocorre sem mudanças na sequência de aminoácidos das proteínas<sup>5</sup>. Outras mudanças no cérebro de uma pessoa portadora de DA incluem inflamação e stress oxidativo e todos estes mecanismos conduzem a uma disfunção cerebral severa, neurodegeneração e perda neuronal<sup>6</sup>. Têm vindo também a ser implicadas na fisiopatologia da DA a ocorrência de alterações a nível da vasculatura cerebral tais como a ocorrência de micro derrames.

#### **I.1.1. Precursor da Proteína Amiloide**

O peptídeo precursor da proteína amiloide (PPA) é uma proteína transmembranar com um largo domínio extracelular, expressa em diversos tecidos, mas que apresenta maior nível de expressão no cérebro<sup>7</sup>. O seu papel no tecido neuronal passa pela formação e reparação sináptica e a sua expressão é regulada durante a diferenciação e depois do processo de lesão neuronal<sup>8,9</sup>. Dependendo se o PPA é processado via  $\alpha$ -secretase ou via  $\beta$ -secretase<sup>10</sup> e  $\gamma$ -secretase<sup>11</sup> os produtos resultantes são não-amiloidogénicos ou amiloidogénicos, respetivamente<sup>10</sup>.

### 1.1.2. Peptídeo A $\beta$

O peptídeo A $\beta$  é um pequeno fragmento proteolítico resultante da clivagem da proteína precursora amiloide por  $\gamma$  e  $\beta$  secretases que clivam, respetivamente, o componente carboxil e amina da proteína. O peptídeo divide-se em 42 subtipos e tem elevada predisposição para sofrer oligomerização, fibrilação e deposição nas paredes vasculares cerebrais, sendo a forma mais tóxica a A $\beta$ 42<sup>12</sup>.

Os derivados do PPA estão presentes na maior parte dos fluidos fisiológicos, como no plasma e no LCR<sup>13</sup>.

Na DA, a agregação dos peptídeos A $\beta$  monoméricos nas suas formas oligoméricas está associada com mudanças conformacionais e neurotoxicidade, bem como com a potencialização e aceleração da formação dos nós neurofibrilares<sup>13,14</sup>.

Várias proteínas podem promover a conversão conformacional de proteínas e estabilizar a sua estrutura anormal, como é o caso da APOE4 que, na DA, favorece a agregação A $\beta$ <sup>15</sup>.

A mudança conformacional conduz à formação de agregados A $\beta$  que se depositam, o que afeta a viabilidade neuronal através de efeitos tóxicos diretos nos neurónios, através da iniciação ou aumento da formação dos nós neurofibrilares e/ou através do desencadeamento e perpetuação da inflamação no SNC<sup>16</sup>.

### 1.1.3. Proteína Tau

A proteína Tau é uma proteína citoplasmática altamente solúvel encontrada no cérebro e que regula o transporte axonal, a montagem dos microtúbulos e a sua estabilidade.

O desenvolvimento neuronal requer microtúbulos dinâmicos, com alongação, encurtamento e estabilidade e o *splicing* alternativo e a fosforilação da Tau permitem que estas funções sejam desempenhadas através de um único gene.

Existem seis isoformas, como resultado do *splicing* alternativo dos 13 exões codificados pelo gene *MAPT*, sendo que as proteínas diferem por terem três ou quatro repetições de 31-32 aminoácidos de ligação aos microtúbulos cada, ou por possuírem um, dois ou nenhum terminal amina<sup>12</sup>.

A fosforilação da Tau em sítios específicos modula as funções intracelulares; contudo, a sua hiperfosforilação dissocia-a dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal, levando a uma destabilização nos microtúbulos e à formação de filamentos na forma de hélice que precipitam e se organizam em nós<sup>17</sup>. Além disso, as Tau não funcionais interferem com as

Tau normalmente fosforiladas, sequestram-nas, evitando assim que elas se liguem aos microtúbulos o que, por sua vez, leva a uma disfunção neuronal cada vez maior<sup>12</sup>.

#### **1.1.4. Hipótese Cascata Amiloide**

Esta teoria sugere que o aumento da produção dos peptídeos A $\beta$  ou a diminuição da sua eliminação e consequente agregação<sup>18</sup> é o primeiro impulsionador da patologia que, posteriormente, leva à hiperfosforilação da Tau, à formação de nós neurofibrilares (*NFTs*) e à perda neuronal<sup>19</sup>. Tudo tem início nos peptídeos A $\beta$  que agregam, formando dímeros, trímeros e oligómeros e esta agregação conduz a formas insolúveis que acumulam como depósitos A $\beta$ . Este evento conduz a vários processos, como a ativação dos astrócitos e microglia<sup>18</sup>, hiperfosforilação da Tau, acumulação de filamentos helicoidais, distrofia neurítica, alteração da homeostase iónica, *stress* oxidativo e falha sináptica que conduz a perda da função neuronal<sup>19</sup>. Esta hipótese defende que a deposição A $\beta$  reforça a patologia Tau. Esta hipótese é sustentada pelas diversas mutações na região A $\beta$  do PPA, tal como a mutação *Artic* (A $\beta$ PP E693G) que se relaciona com oligómeros solúveis A $\beta$  (protofibrilas) que são tóxicos e que conduzem ao desenvolvimento da doença<sup>20</sup>. A descoberta de uma mutação protetora no gene A $\beta$ PP (A673T) demonstrou uma redução na clivagem do PPA pela  $\beta$ -secretase, uma diminuição na velocidade de declínio cognitivo em populações idosas e uma diminuição do risco de desenvolver DA esporádica. A substituição A673T é adjacente ao sítio de clivagem da  $\beta$ -secretase, o que provoca uma redução de 40% nos níveis de A $\beta$ 42<sup>21</sup>.

#### **1.1.5. DA familiar e esporádica**

A DA familiar representa menos de 5% de todos os casos de DA<sup>12</sup>, uma vez que a forma mais comum é a esporádica.

A DA familiar relaciona-se intimamente com mutações nos genes que codificam enzimas envolvidas na degradação proteolítica do PPA, como os genes presenilina, *PRES1* e *PRES2*, que aumentam o processo amiloidogénico de PPA, aumentando, assim, os níveis de A $\beta$ 42<sup>22</sup>.

A acumulação de formas agregadas de A $\beta$ , tóxicas, é crucial na patogénese da forma familiar da DA. As mutações acima referidas afetam o processamento do PPA, o que leva a uma sobreprodução de A $\beta$  ou à produção dos agregados. Por fim, a síndrome de *Down*, na qual existe uma cópia extra de PPA devido à trissomia 21, está associada com a DA numa idade precoce<sup>23</sup>.

### **1.1.6. Sintomatologia**

A DA afeta diversos processos da função mental: memória, pensamento, comportamento e a capacidade de executar as atividades do dia-a-dia. É fortemente incapacitante, tendo impacto não apenas em quem a possui, mas também nas suas famílias e cuidadores.

Embora os sintomas variem de indivíduo para indivíduo, existem sintomas transversais na doença: nas primeiras fases, a memória a curto-prazo e a capacidade de raciocinar são afetadas; à medida que a doença progride surgem confusão, irritabilidade, agressividade, variações de humor e problemas com a linguagem<sup>24</sup>, acabando a memória a longo-prazo por ser também afetada.

### **1.2. Marcadores biológicos da doença de Alzheimer**

Dois dos principais marcadores da doença são as placas A $\beta$ , que se desenvolvem nas fases iniciais da doença, e os emaranhados neurofibrilares, que se formam posteriormente<sup>25</sup>. Estes peptídeos que se tornam aberrantes são proteínas endógenas: as placas amiloides desenvolvem-se em excesso quando o A $\beta$ 42, um pequeno fragmento proteolítico da PPA, está presente. Este fragmento tem a propensão de construir fibrilas insolúveis e os emaranhados neurofibrilares são formados pela hiperfosforilação da proteína Tau, que é um constituinte normal da estrutura do citoesqueleto das células<sup>26</sup>.

### **1.3. Terapêutica medicamentosa**

A abordagem terapêutica atual para o tratamento da DA visa fundamentalmente amenizar os sintomas associados aos problemas cognitivos sendo constituída por quatro fármacos: três inibidores da acetilcolinesterase (rivastigmina, galantamina e donepezilo)<sup>27</sup> para a DA ligeira a moderada<sup>28</sup> e um antagonista do recetor NMDA (memantina)<sup>27</sup> nas fases mais graves da doença<sup>28</sup>. Estas duas classes medicamentosas têm como alvos os recetores colinérgicos e glutaminérgicos, respetivamente<sup>27</sup>.

Esta doença não tem cura e estas opções de tratamentos limitam-se apenas a reduzir os sintomas, não impedindo a progressão da doença. Assim, é necessária uma intervenção farmacoterapêutica inovadora, que seja eficaz no tratamento da doença. Essa intervenção deve atuar nos mecanismos associados à patologia e demonstrar efeitos clínicos cognitivos positivos. De entre as novas abordagens terapêuticas que têm vindo a ser testadas, a

imunoterapia direcionada para as proteínas A $\beta$  e Tau tem dado origem a resultados bastante promissores.

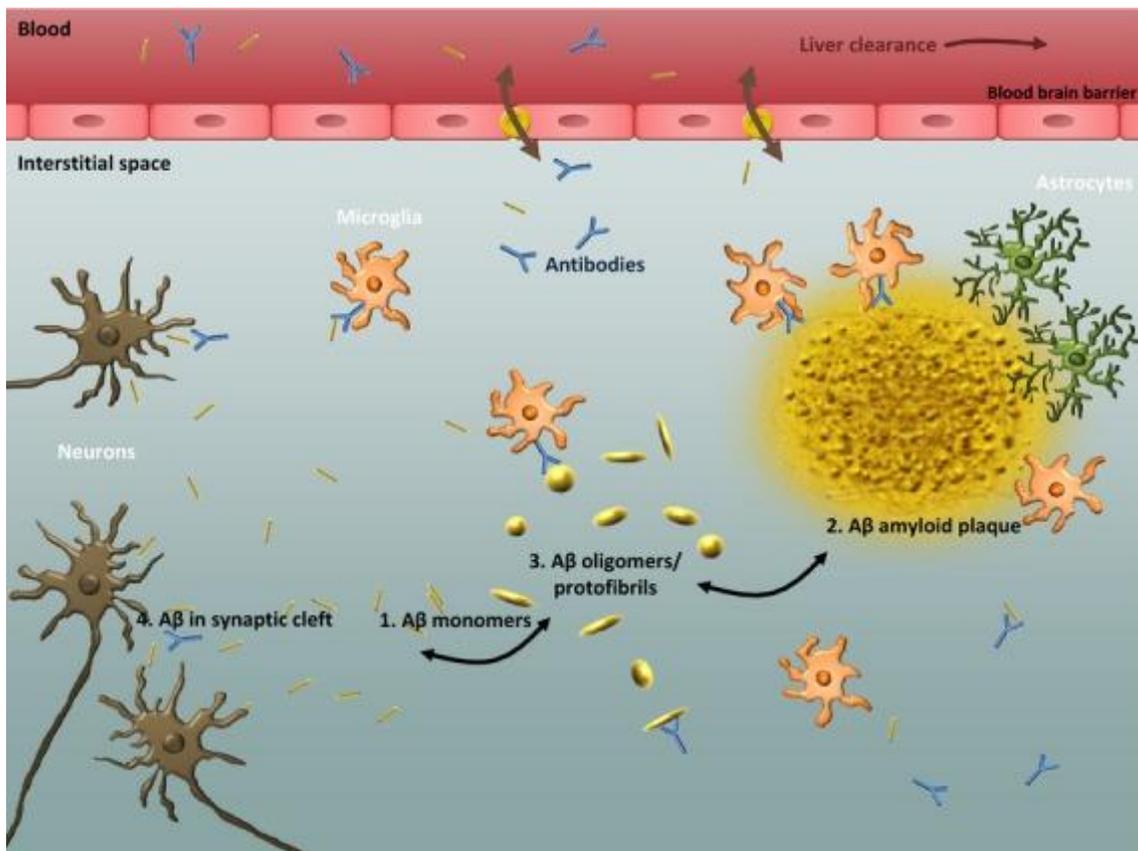
## 2. Estratégias imunomoduladoras

A vacinação com A $\beta$  foi a primeira abordagem que demonstrou ter efeito na DA, uma vez que promove uma resposta humoral, por diversos mecanismos:

- A presença de grande quantidade de anticorpos na circulação periférica pode causar uma força que dirige o movimento de A $\beta$  para fora do SNC- hipótese reservatório periférico<sup>29</sup>;
- Os anticorpos podem também alterar a *clearance* A $\beta$  através da interação com o sistema de transporte que move A $\beta$  para dentro e fora do SNC<sup>30</sup>;
- Os anticorpos que se ligam às formas solúveis de A $\beta$  podem aumentar a *clearance* e o *shift* no equilíbrio, enquanto que aqueles que se ligam as placas amiloides depositadas podem requerer ativação microglial para que se atinja redução da placa<sup>31</sup>;
- Os anticorpos podem disromper ou promover a agregação A $\beta$  ou interferir com a ligação A $\beta$  a outras moléculas, reduzindo assim a toxicidade;
- Os anticorpos podem ligar-se a recetores nas células imunes efectoras e atuar como sinais para gerar ou retardar inflamação;
- Os anticorpos podem ser internalizados em células ou entrar nas fendas sinápticas entre os neurónios, com o potencial de interferir com a transmissão entre células de A $\beta$  e os seus agregados<sup>32</sup>.

Atualmente, as estratégias de intervenção direcionam-se para os peptídeos A $\beta$  e visam:

- reduzir a produção de A $\beta$ <sup>28</sup>, através da modulação de  $\gamma$ -secretase e  $\beta$ -secretase<sup>33</sup>;
- facilitar a eliminação de A $\beta$ <sup>28</sup>, através da imunização ativa e passiva<sup>33</sup>;
- prevenir a agregação de A $\beta$ <sup>28</sup> através de disjuntores de folhas  $\beta$  e com inibidores de chaperonas patológicas<sup>33</sup>.



**Figura I-** Alvos possíveis para imunoterapia: 1. Ligação às formas solúveis de A $\beta$  e aumento da eliminação. 2. Ligação às placas amiloides depositadas e promoção da remoção das placas através da ativação microglial. 3. Ligação a oligómeros/protofibrilas de A $\beta$  e sua eliminação. 4. Entrada na fenda sináptica e interferência com a transmissão célula-a-célula de A $\beta$  e seus agregados. Imagem retirada de <sup>27</sup>.

## 2.1. Imunoterapia A $\beta$ ativa

Tendo em conta que a acumulação de A $\beta$ 42 no cérebro está intimamente ligada ao aparecimento e desenvolvimento da DA, realizaram-se estudos de imunização contra A $\beta$  para determinar se esta podia, efetivamente, levar a uma redução dos níveis amiloides no cérebro<sup>34</sup>.

A imunoterapia ativa envolve a imunização com um antígeno o que leva à ativação do sistema imunitário com consequente resposta celular e humoral, comandas pelos linfócitos T e B, respetivamente. A vacinação ativa contra o A $\beta$ 42 é composta pelo antígeno e por um adjuvante (*immune boosting adjuvant*) que aumenta a resposta imune, para garantir elevados níveis de anticorpos.

Este tipo de imunoterapia é bastante atrativa, uma vez que induz a produção de anticorpos a longo-termo em grande parte dos pacientes inoculados, tendo também um baixo custo<sup>35</sup>. Este tipo de imunização estimula uma resposta imunitária natural na qual os níveis de anticorpos anti-A $\beta$  podem persistir com baixa dose de antígeno e com um número mínimo de administrações<sup>19</sup>. Contudo, uma vacina deste tipo pode aumentar o risco de uma resposta imunitária nociva, especialmente se o sistema imunitário reconhecer o antígeno como uma proteína sua (*self protein*) o que leva à expansão de células T reguladoras A $\beta$  específicas<sup>35</sup>. Além disso, o mecanismo de ação desta abordagem baseia-se na resposta imunitária do próprio paciente, o que varia de indivíduo para indivíduo<sup>19</sup> e que merece particular atenção em doentes idosos, que muitas vezes têm os sistemas imunitários mais enfraquecidos, o que pode não provocar uma resposta imunológica tão eficaz contra o antígeno.

Os primeiros passos nesta área foram dados em 1999 quando Schenk e os seus colegas publicaram resultados favoráveis sobre a imunização ativa contra o peptídeo com o comprimento total A $\beta$ 1-42 em modelos animais: verificaram uma redução dos níveis A $\beta$  e uma melhoria nas tarefas de memória nos ratos<sup>36</sup>.

Posteriormente, surgiu a primeira vacina em ensaios clínicos para o tratamento da DA, a AN1792, que teve o seu uso interrompido em 2002 devido ao desenvolvimento de meningoencefalite em 6% dos pacientes com DA moderada a severa<sup>37</sup>. Esta vacina AN1792 era constituída pelo peptídeo A $\beta$ 1-42, formulado com um forte adjuvante (saponina QS-21) e polisorbato 80, de forma a aumentar a solubilidade do peptídeo e a melhorar a solubilidade da vacina. Com a administração da vacina, em 1-3 doses, verificou-se uma redução dos níveis A $\beta$  em zonas específicas do cérebro<sup>35</sup> e, embora os dados obtidos por autópsia indicassem sucesso na *clearance* amiloide, os benefícios cognitivos clínicos foram bastante modestos em comparação com o grupo placebo<sup>38</sup>. Desconhece-se o mecanismo concreto que levou ao desenvolvimento de meningoencefalite, mas as possíveis causas incluem o forte adjuvante que pode induzir fortemente uma resposta Th1<sup>39</sup>, o uso de polisorbato 80 e o reconhecimento do antígeno pelas células T específicas para A $\beta$ <sup>35</sup>. A exacerbação de uma resposta de tipo Th1, como causa mais plausível, é apoiada por resultados experimentais mostrando que quando estimuladas *in vitro* com A $\beta$ , as células mononucleares da maioria dos participantes mostraram um aumento na produção de interleucina 2 e interferão gama<sup>40</sup>.

A persistência da patologia relacionada com a Tau em áreas em que houve eliminação A $\beta$  indica que a intervenção possa ter ocorrido tarde demais. Deste modo, a precocidade da imunização e os consequentes baixos níveis de A $\beta$  podem prevenir a formação dos nós

neurofibrilares, que parecem ser resultado da toxicidade  $A\beta$ , podendo, assim, a vacinação providenciar melhores efeitos cognitivos<sup>41,42</sup>.

Como estas abordagens de imunização ativa apresentaram grande potencial de retardar o estabelecimento da doença, esforços foram feitos para desenvolver estratégias imunoterapêuticas mais eficazes e seguras, de forma a evitar reações autoimunes. Assim, desenvolveram-se estratégias de imunoterapia passiva, bem como vacinas ativas de segunda geração, onde as partes responsáveis pela ativação das células T foram eliminadas e onde apenas permaneceram os componentes responsáveis pela geração dos anticorpos específicos  $A\beta$ <sup>43</sup>: vacinas concentradas nos epítomos das células B, vacinas de DNA, entre outras<sup>35</sup>. Como os epítomos das células T residem maioritariamente na porção central de  $A\beta$ , estas abordagens alternativas recorrem à região N-terminal de  $A\beta$ , epítomo este reconhecido pelas células B, evitando assim uma potencial resposta celular inflamatória<sup>19</sup>.

### **2.1.1. Vacinas de segunda geração**

Atualmente, várias vacinas ativas de segunda geração estão a ser testadas em ensaios clínicos, como a CAD 106, da Novartis, a ACC001 da Elan Corporation e Affitope da Affiris AG<sup>12</sup>. Estas vacinas são concentradas nos epítomos das células B,  $A\beta$ 1-6 ou  $A\beta$ 1-15, de forma a produzir anticorpos sem desencadear uma resposta inflamatória pelas células T, com o objetivo de prevenir a deposição de placas e/ou ajudar na *clearence*  $A\beta$ <sup>12</sup>.

A vacina CAD 106 compreende múltiplas cópias do peptídeo  $A\beta$ 1-6 acopladas a um transportador que possui 180 cópias do bacteriófago de revestimento de proteína QBeta<sup>44</sup>. Em modelos animais, mostrou reduzir significativamente os níveis amiloides, sem provocar os efeitos secundários relacionados com a estimulação das células T. Além disso, foi mais eficaz nas fases iniciais da acumulação amiloide, tendo grande potencial quando administrado antes da deposição amiloide começar. Os mesmos resultados verificaram-se em ensaios clínicos humanos, em doentes com DA ligeira a moderada<sup>45</sup>.

O ACC-001 é um conjugado de múltiplas cópias do peptídeo  $A\beta$ 1-7 ligado a uma variante não tóxica da toxina da difteria (CRM197)<sup>46</sup>. Tal como a molécula anterior, ele gera anticorpos  $A\beta$  N-terminais que não induzem uma resposta mediada pelas células T. De momento, decorrem ensaios clínicos em doentes com DA ligeira a moderada, de forma a investigar qual a dose mais eficaz, a sua segurança, entre outros<sup>19</sup>. Num ensaio clínico realizado em pacientes japoneses, foi usado QS-21, que mostrou ser bem tolerado e seguro, provocando uma resposta imunitária eficaz. No entanto, neste estudo, surgiram alguns efeitos adversos, tal como nasofaringite, fadiga, náuseas, mialgias, entre outros<sup>19</sup>.

Os compostos Affitope (AD01 e AD02) são vacinas KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) com peptídeos curtos (cerca de seis aminoácidos) que mimetizam o N-terminal de A $\beta$ <sup>47</sup>. Estes compostos exibem um bom perfil de segurança, uma vez que são não-endógenos, evitando assim o desenvolvimento de tolerância, e uma vez que a sua especificidade controlada previne reatividade cruzada com o PPA<sup>47</sup>.

O Lu AF20513 é um peptídeo A $\beta$ 1-12 no qual os epítomos das células *T-helper* foram substituídos por dois epítomos *T-helper* da toxina tetânica, que estimula as células do tipo Th2 de memória existentes que, por sua vez, promovem a produção de anticorpos pelas células B<sup>48</sup>. Os resultados para esta molécula têm-se mostrado promissores, uma vez que os anticorpos A $\beta$  estimulam uma resposta pelas células T eficaz, sem que ocorra ativação microglial, astrocitose ou angiopatia cerebral amiloide, e protegem as células neuronais da toxicidade provocada pelas fibrilas e oligómeros de A $\beta$ 42<sup>48</sup>.

### **2.1.2. Imunização com DNA**

Uma alternativa para a imunização ativa com péptidos passa pela imunização com DNA, o qual é injetado na pele ou músculo<sup>12</sup>. O DNA é então transcrito e traduzido no local de injeção e as células dendríticas locais processam o antígeno e migram até aos nódulos linfáticos, apresentando a proteína aos linfócitos, iniciando, assim, uma resposta imunitária<sup>12</sup>. Este tipo de imunização, em que o peptídeo é produzido no indivíduo imunizado, mostrou ser muito eficaz, reduzindo em 41% os níveis de A $\beta$ 2 no cérebro de modelos animais, e em 50% as placas amiloides<sup>49</sup>.

Esta abordagem gera uma resposta imunitária celular Th2 bastante forte<sup>50</sup>, tendo potencial neuroprotetor e neuroregenerativo. Tal foi demonstrado em modelos animais com doenças neurodegenerativas, verificando-se uma resposta de cicatrização depois de uma lesão mecânica nas células nervosas<sup>51</sup>.

### **2.1.3. Terapia celular**

Outra abordagem de imunoterapia ativa passa pela utilização de células dendríticas, nomeadamente as células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico geradas *in vitro* (moDCs)<sup>52</sup>. Nos doentes com DA, estas células mostram mais componentes pró-inflamatórios e redução da capacidade de apresentar antígenos<sup>53</sup>. Assim, isto indica que na

presença de DA, estas células podem contribuir para o dano cerebral, através de mecanismos de reativação de respostas inflamatórias<sup>52</sup>.

Dado o potencial que as células dendríticas têm na regulação da resposta imunitária durante a neurodegeneração, têm sido elaborados estudos para que possam ser utilizadas como ferramentas de vacinação<sup>52</sup>. Assim, em animais com DA, esta estratégia tem sido utilizada para reduzir a acumulação A $\beta$  e atenuar os défices cognitivo<sup>54</sup>. Um estudo recente demonstrou que as células dendríticas desempenham um papel importante na regulação da entrada das células T no cérebro, nos espaços perivascular e leptomeningeal<sup>55</sup>. São ainda necessários mais estudos para verificar, em humanos, a potencial capacidade desta abordagem em providenciar uma resposta imunitária contra as proteínas desreguladas<sup>52</sup>.

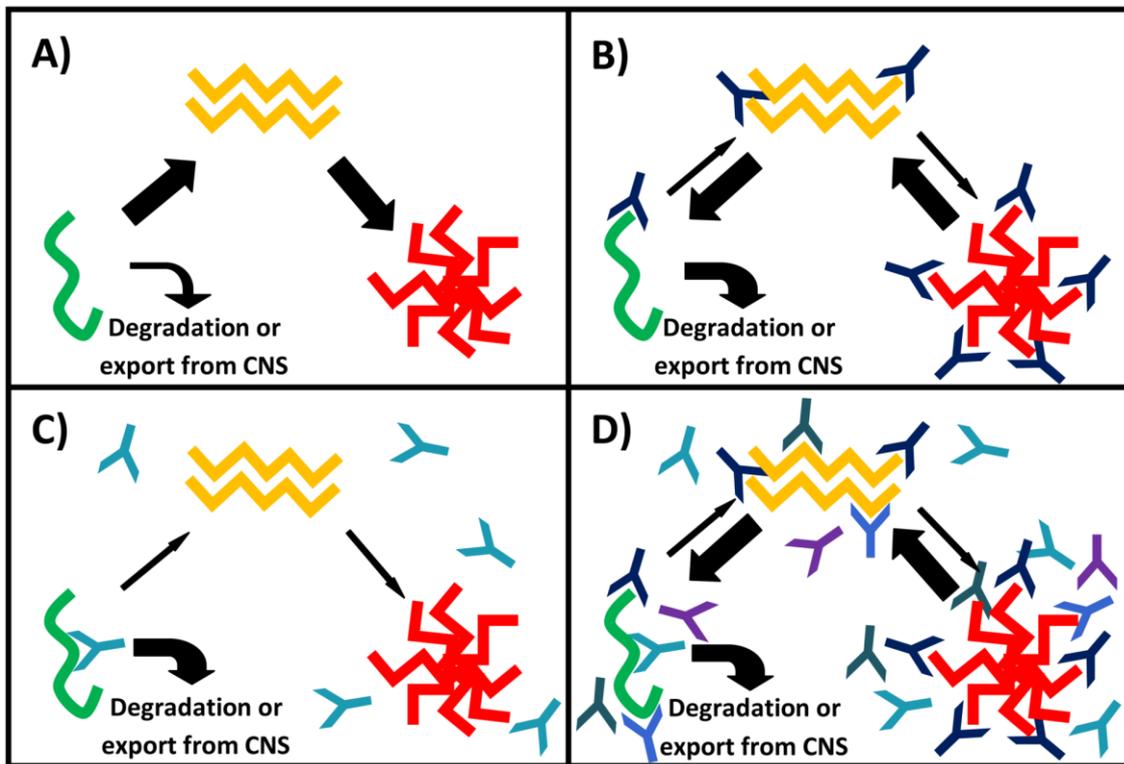
## **2.2. Imunoterapia A $\beta$ passiva**

A abordagem mais promissora para imunoterapia para a DA passa pela imunoterapia passiva, que envolve a injeção direta intravenosa de anticorpos monoclonais humanizados pré-formados contra o A $\beta$ 42<sup>12</sup>, ou de anticorpos policlonais humanos derivados de um dador<sup>19</sup>, não havendo desenvolvimento de uma resposta autoimune pelo sistema imunitário<sup>12</sup>. Estes anticorpos provêm de uma fonte externa ao paciente ou de dadores humanos<sup>27</sup>. Existem várias vantagens nesta abordagem, uma vez que pode ser parada imediatamente se surgirem reações adversas e podem ser marcados epítomos específicos ou conformações patogénicas sem que ocorram distúrbios noutras formas das proteínas de interesse. Este tipo de imunização tem em vista uma redução do conteúdo amiloide do cérebro dos doentes com DA, através de diversos mecanismos, tais como: facilitação da fagocitose do conteúdo amiloide pela microglia; inibição da agregação amiloide; ligação dos anticorpos ao conteúdo amiloide no sangue, causando um gradiente de concentração que provoca o efluxo de A $\beta$ 42 do cérebro<sup>12</sup>.

Contudo, este tipo de imunização é mais dispendioso, uma vez que requer a produção de anticorpos monoclonais humanizados e injeções mensais no médico, tornando-se menos prático para tratamentos a longo-termo numa grande população, comparado com a imunização ativa. Além disso, doses repetidas com anticorpos, ao longo do tempo, podem levar à formação de anti-anticorpos, que podem potencialmente ter um efeito neutralizante e/ou conduzir a efeitos laterais como vasculite ou glomerulonefrite<sup>35</sup>. Também a passagem de anticorpos através da BHE, a perda de anticorpos para um reservatório periférico, edema vasogénico e micro hemorragias são outras das suas limitações<sup>5</sup>.

Existem três mecanismos distintos para direcionar uma resposta para A $\beta$ :

- anticorpos que reconhecem o epítipo N-terminal presente em todas as formas de A $\beta$ ;
- anticorpos que reconhecem as sequências centrais dos epítipos, mascaradas pela transição para as formas oligoméricas ou agregadas de A $\beta$ ;
- anticorpos policlonais que reconhecem potenciais epítipos abundantes através de diversas espécies e formas transicionais de A $\beta$  que caracterizam a DA<sup>16</sup>.



**Figura 2-** Diagrama esquemático que ilustra os estados transicionais moleculares e macromoleculares de A $\beta$  (A) e como eles podem ser influenciados por estratégias de imunização passiva (B-D).

A) O composto monomérico A $\beta$  (verde) pode ser degradado ou pode agregar e formar espécies A $\beta$  oligoméricas solúveis (amarelo). Estes oligômeros agregam e conduzem à deposição de placas A $\beta$  insolúveis nos cérebros de pessoas com DA; B) Os anticorpos que reconhecem a região N-terminal dos epítipos de A $\beta$  ligam-se aos monômeros solúveis, oligômeros e espécies A $\beta$  depositadas, alterando o equilíbrio da formação das placas para a sua degradação ou exportação do SNC. C) Os anticorpos que reconhecem os epítipos centrais de A $\beta$  reconhecem os monômeros solúveis mas, à medida que a agregação ocorre, o epítipo esconde-se, o que previne a ligação aos oligômeros solúveis e ao conteúdo A $\beta$  insolúvel depositado, promovendo a degradação ou remoção do conteúdo monomérico e diminuindo a formação dos oligômeros e a deposição do conteúdo insolúvel; D) Os anticorpos policlonais ligam-se a vários alvos antigênicos nas três formas conformacionais de A $\beta$ , alterando o equilíbrio da formação de placa para a degradação ou exportação do SNC. Imagem retirada de <sup>16</sup>.

Em 2000, Bard e os seus colegas demonstraram que uma injeção sistêmica de anticorpos monoclonais específicos para o N-terminal da A $\beta$  (3D6 mAb) em ratos com DA, resultou na transferência dos anticorpos para o cérebro, onde se ligaram às placas e induziram a fagocitose microglial dos depósitos A $\beta$ <sup>56</sup>. Este anticorpo foi o ponto de partida para o desenvolvimento de outras moléculas, como o Bapineuzumab, primeiro anticorpo monoclonal humanizado a ser usado como imunoterapia passiva em doentes com DA. Infelizmente, apesar de se ligar aos depósitos A $\beta$ 42 fibrilares, bem como às placas amiloides, este anticorpo não demonstrou eficácia e benefícios suficientes nos ensaios clínicos, tendo sido reportados casos de edema vasogénico, pelo que o seu uso foi descontinuado<sup>26</sup>.

O Solanezumab é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à região média do epítopo A $\beta$  (A $\beta$ 13-28)<sup>26</sup>. Esta molécula da farmacêutica Lilly encontra-se em estudo e, até ao momento, demonstra um bom perfil de segurança, diminui o declínio cognitivo e remove a *clearance* do excesso de A $\beta$ , uma vez que ele se liga às formas solúveis de A $\beta$ , tendo a capacidade de mobilizar o A $\beta$  dos depósitos amiloides no cérebro<sup>57</sup>.

O Gantenerumab da Hoffmann-La Roche é o único anticorpo monoclonal humano utilizado que deteta dois epítomos separados no A $\beta$ 42 (A $\beta$ 3-11 e A $\beta$ 19-28)<sup>12</sup>. Este anticorpo não se liga às formas solúveis de A $\beta$  mas sim às formas fibrilares de A $\beta$ <sup>12</sup>, às placas amiloides cerebrais<sup>27</sup>. Verificou-se, *in vitro*, que consegue induzir a fagocitose das fibrilas A $\beta$  pela microglia do cérebro e, verificou-se, através de PET que os pacientes tratados com este anticorpo tinham uma diminuição considerável de A $\beta$  no cérebro<sup>58</sup>.

O Crenezumab da Genentech é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à região do epítopo A $\beta$  (A $\beta$ 12-23) e que foi modificado para transportar o isótopo IgG4 da IgG, que possui baixada afinidade de ligação para os recetores nos leucócitos e baixas probabilidades de causar respostas imunes inflamatórias<sup>12</sup>. Este anticorpo liga-se às formas monoméricas e oligoméricas, inibindo a agregação de A $\beta$  e promovendo a sua desagregação<sup>27</sup>. Os resultados do uso deste anticorpo têm sido, até ao momento, satisfatórios.

Por fim, o Aducanumab (BIIB037), um anticorpo monoclonal humano, mostrou reagir seletivamente com os agregados A $\beta$ , incluindo os oligómeros solúveis e as fibrilas insolúveis<sup>59</sup>.

Em estudos pré-clínicos foi utilizado um análogo deste anticorpo e verificou-se que ele é capaz de atravessar a BHE, atuando no seu alvo e eliminando os compostos A $\beta$  dos cérebros dos ratos transgénicos. Foram estes resultados que impulsionaram o início dos ensaios clínicos<sup>60</sup>.

Assim, o ensaio clínico de Fase Ib consistiu na infusão intravenosa mensal de uma substância placebo e de Aducanumab, durante um ano, com doses de 1, 3, 6 ou 10 mg/kg, em 165 doentes com sinais iniciais de DA, tendo sido feito o diagnóstico com imagem PET<sup>61</sup>. O estudo mostrou que o anticorpo penetra no cérebro e promove a diminuição do conteúdo A $\beta$  e que os resultados dependem da dose do anticorpo e do período de tratamento. Por imagem PET verificou-se uma diminuição das placas A $\beta$  nos doentes que tinham tomado Aducanumab em contraste com o grupo de controlo, sujeito à substância placebo, no qual se verificou uma manutenção nos níveis A $\beta$ ; também se verificou uma maior redução no conteúdo A $\beta$  na dose maior de anticorpo. Os resultados cognitivos obtidos suportam a hipótese que a redução do conteúdo A $\beta$  confere um benefício clínico<sup>59</sup>. Contudo, estes resultados não se obtêm repentinamente: a redução do conteúdo A $\beta$  apenas se detetou seis meses após o início do estudo, e os efeitos clínicos só se verificaram após um ano. As principais preocupações relacionam-se com a segurança do composto, uma vez que se verificou o desenvolvimento de efeitos adversos como dores de cabeça, infeções do trato urinário e trato respiratório superior e edema vasogénico, sendo este último o mais preocupante. Os efeitos adversos são mais frequentes nas doses mais elevadas: surgiram em 3% dos pacientes que receberam a dose de 1mg/kg, em 6% dos doentes que receberam a dose de 3 mg/kg, em 37% dos doentes que receberam a dose de 6 mg/kg e em 41% dos doentes que receberam a dose de 10 mg/kg<sup>59</sup>.

Este estudo foi efetuado numa amostra pequena, de forma a determinar a segurança e tolerabilidade do anticorpo, bem como o seu efeito farmacológico; no entanto, é necessário continuar o estudo da molécula nas próximas fases clínicas, de forma a obter mais conclusões.

Outras moléculas utilizadas que têm como alvo terapêutico os agregados solúveis são as imunoglobulinas intravenosas- preparações de anticorpos policlonais derivadas do plasma de dadores saudáveis<sup>27</sup>. As IVIg contêm a maioria dos anticorpos IgG, das quais aproximadamente 0,5% se ligam a A $\beta$ <sup>27</sup>. Estes anticorpos naturais exibem pouca ligação aos A $\beta$  monoméricos, mas reconhecem neoepítomos conformacionais encontradas nos agregados A $\beta$ , tais como oligómeros e fibrilas<sup>62,63</sup>.

Um exemplo deste tipo é a molécula Gammagard da Internacional Baxter, que mostrou alguns benefícios mas não ajudou na diminuição do declínio cognitivo e funcional dos doentes<sup>12</sup>. No estudo que envolveu esta molécula, os doentes com DA moderada receberam injeções concentradas de Ig de pessoas saudáveis, para que fossem utilizados anticorpos que ocorrem naturalmente e que especificamente reconhecem e bloqueiam os efeitos tóxicos de

A $\beta$ . Verificou-se uma diminuição nos níveis de A $\beta$  no soro dos doentes quando se precedia à injeção e um aumento quando se suspendia o tratamento, pelo que se inferiu que os anticorpos A $\beta$  que ocorrem naturalmente mobilizam A $\beta$  do cérebro<sup>12</sup>. Outro estudo com este tipo de moléculas, o Octagam da Octafarma, concluiu que a abordagem IVIg tem uma segurança aceitável, sendo, no entanto, necessários mais estudos para retirar outras conclusões<sup>12</sup>.

### **2.2.1. Programas de prevenção**

Um dos argumentos mais válidos para a falta de mais resultados positivos nos ensaios clínicos de imunoterapias direcionadas para a DA é que o tratamento se inicia tarde demais. A presença de concentrações elevadas de A $\beta$ 42 no LCR<sup>12</sup> e a deposição A $\beta$  no cérebro, visíveis por PET-PIB, precedem os sintomas clínicos da doença em largos anos<sup>26</sup>, pelo que uma terapia eficaz para prevenir ou tratar a DA deve começar antes que os sintomas surjam<sup>12</sup>.

Assim, em 2013, surgiram três grandes estudos preventivos com o objetivo de obter mais informação sobre a DA:

DIAN: Estudo conduzido pelas empresas Lilly, Roche e pela Associação de Alzheimer, em doentes com elevada probabilidade de desenvolver precocemente DA, sendo portadores de mutações genéticas que causam a FAD<sup>12</sup>. Neste estudo é testada a molécula Gantenerumab<sup>19</sup>.

API: Estudo conduzido pela Genentech, o Instituto Banner e o Instituto Nacional de Saúde em 300 indivíduos de uma grande família colombiana com o gene mutante (PSI E280A), portadores de FAD, e que desenvolvem precocemente a DA<sup>35</sup>. Esta mutação conduz à deposição de placas A $\beta$  numa idade relativamente jovem<sup>64</sup>, que é seguida dentro de 10 a 15 anos por um progressivo declínio na função cognitiva e clínica<sup>65</sup>. As pessoas acabam por desenvolver demência por volta dos 50 anos, décadas mais cedo que os casos esporádicos de DA<sup>26</sup>. Neste estudo é testada a molécula Crenezumab<sup>19</sup>.

A4: Estudo que testa Solanezumab em 1000 indivíduos de 70 anos ou mais, isentos de predisposição genética para a DA, mas que possuem scans PET positivos para a deposição A $\beta$  no cérebro, não demonstrando, ainda, sintomas clínicos<sup>35</sup>.

### 2.3. Imunoterapia direcionada para a proteína Tau

Na DA os NFTs resultantes da hiperfosforilação da proteína Tau surgem na fase mais avançada da doença, depois da acumulação de A $\beta$ .

Nos últimos anos, o interesse na imunoterapia Tau para a DA tem vindo a aumentar e já se efetuaram estudos para determinar a sua eficácia e segurança.

Num estudo efetuado, verificou-se que os resultados de uma imunização com um peptídeo Tau de 30 aminoácidos provocou uma redução na formação dos NFTs em ratos imunizados e observaram-se benefícios comportamentais nos mesmos<sup>66</sup>. O único efeito adverso relatado é o desenvolvimento de encefalite autoimune induzida<sup>12</sup>.

Dados pré-clínicos em modelos animais sugerem que este tipo de imunoterapia com peptídeos fosforilados reduz os níveis de fosforilação da Tau e a carga de NFTs, quando o tratamento é precoce<sup>67,68</sup>. A AADvac1 é a primeira vacina desenvolvida recorrendo a esta abordagem<sup>69</sup>. Esta vacina consiste num peptídeo Tau conjugado com KLH que é administrado com um adjuvante, hidróxido de alumínio<sup>69</sup>, desenvolvido pela Axon Neuroscience SE<sup>12</sup>. A vacinação com esta molécula em modelos animais melhorou défices neurocomportamentais, e reduziu a degeneração neurofibrilar e morte neuronal<sup>69</sup>.

A ACI-35 é uma vacina lipossomal que contém um peptídeo de 16 aminoácidos que corresponde à sequência humana da proteína Tau 393 a 408, com resíduos S396 e S404 fosforilados<sup>19</sup>. Os dados pré-clínicos obtidos até à data mostram uma rápida produção policlonal de anticorpos e específica para a tau fosforilada<sup>70</sup>.

A imunização passiva com anticorpos anti-tau, mAbs PHF, que reagem com resíduos de serina fosforilados das proteínas Tau hiperfosforiladas, veio reafirmar os resultados obtidos através dos estudos de imunização ativa: redução na patologia e atraso no declínio funcional motor<sup>71</sup>.

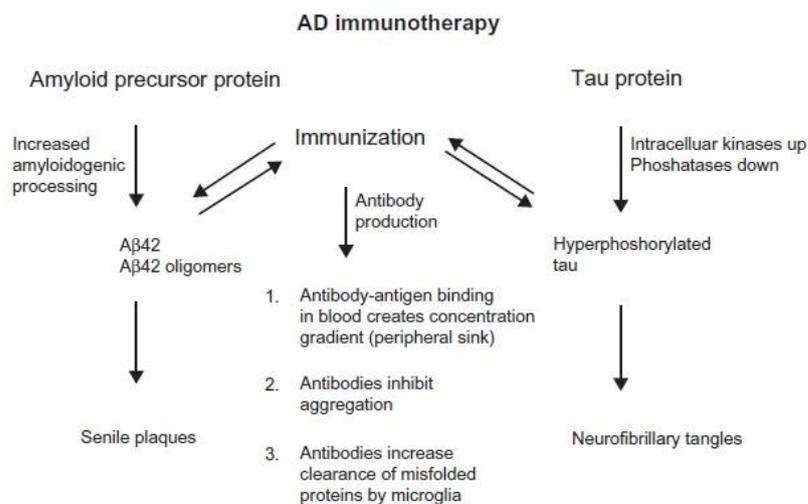
São vários os mecanismos pelos quais os anticorpos direcionados para a Tau podem inibir ou diminuir a progressão da doença:

- podem passar a BHE e entrar nos neurónios, bem como modular a fosforilação e/ou degradar a Tau diretamente<sup>72</sup>;

- podem eliminar as espécies Tau envolvidas no espalhamento intracelular da patologia Tau e podem prevenir a iniciação da agregação Tau<sup>73</sup>;

- podem ajudar suportando as funções de eliminação dos astrócitos<sup>74</sup>;

- podem facilitar a *clearance* de Tau do cérebro para a periferia, como um aumento nas concentrações tau observadas no sangue, devido à imunização<sup>75</sup>.



**Figura 3-** Características comuns dos anticorpos anti- Aβ e anti-Tau. Ambos os marcadores da DA são causados pela sobreprodução, agregação e enrolamento incorreto dos antígenos *self* do cérebro. Imagem retirada de<sup>12</sup>.

### 3. Desafios

Embora o campo de investigação da imunoterapia na DA tenha crescido muito ao longo dos últimos anos, ainda existem alguns problemas que devem ser ultrapassados para que se obtenham resultados clínicos eficazes e seguros a longo prazo.

Apenas uma pequena percentagem de anticorpos atravessa a BHE, sendo necessário arranjar uma forma de melhorar a penetração dos anticorpos no cérebro. Algumas possibilidades incluem o uso de proteínas chaperonas, meios químicos ou radiológicos capazes de abrir temporariamente a BHE ou ainda a infusão direta dos anticorpos no SNC.

Também a redução do conteúdo amiloide após a perda dos neurónios não tem sido totalmente eficaz até ao momento, o que sugere que o tratamento deva começar mais precocemente.

A acumulação Aβ precede a formação de NFTs e influencia a patologia Tau, bem como a Tau pode influenciar o conteúdo Aβ<sup>12</sup>. A Tau inibe a disfunção neuronal induzida por Aβ e os oligómeros Aβ induzem a fosforilação da Tau em resíduos específicos, que transformam os neurónios em células aberrantes sem divisão, o que leva à morte e perda neuronal<sup>76</sup>.

São necessários mais estudos para testar se ter como alvo simultâneo Aβ e Tau pode melhorar a eficácia terapêutica na imunoterapia para DA<sup>12</sup>.

O desenvolvimento de vacinas multivalentes que têm como alvo múltiplos epítomos na mesma molécula podem permitir uma resposta imune mais forte e completa. Apostar numa tecnologia que permita a penetração dos anticorpos no SNC também será uma boa

hipótese. Por último o recurso a vacinas de células dendríticas para eliciar uma resposta adaptativa anti-Tau ou anti-A $\beta$  pode representar uma abordagem promissora.

A progressão da doença é monitorizada pela combinação de técnicas que medem componentes físicos, como a atrofia cerebral (ressonância magnética volumétrica) e a perda neuronal ou disfunção (ressonância magnética funcional ou PET)<sup>19</sup>. Contudo, são necessárias melhorias nas técnicas de medição destes parâmetros para que sejam mais sensíveis e estáveis para permitir detetar tão cedo quanto possível mudanças cognitivas subtis nos doentes com DA precoce<sup>19</sup>. Encontrar a dose mais eficaz e mais segura para um determinado composto é também um desafio.

#### 4. Conclusão

A DA é a causa mais comum de demência. A sua patogénese começa décadas antes do desenvolvimento dos sintomas clínicos e relaciona-se com a agregação dos peptídeos A $\beta$ 42, com os derivados da hiperfosforilação e agregação da proteína Tau- NFTs-, inflamação e stress oxidativo.

Atualmente não existe cura ou maneira de prevenir a doença. No entanto, as abordagens imunoterapêuticas têm demonstrado resultados clínicos promissores quando são iniciadas o mais precocemente possível. Sendo o conteúdo A $\beta$  o impulsionador da patogénese da doença, a imunoterapia contra A $\beta$ , ativa ou passiva, tem demonstrado potencial elevado na remoção destes peptídeos no cérebro. Também a imunoterapia Tau, direcionada para a patologia Tau, pode ser eficaz na diminuição do declínio cognitivo pelo que, exercida em conjunto com a imunoterapia A $\beta$ , poderá prevenir ou atrasar a DA no futuro.

Apesar das contínuas descobertas serem esperançosas, é necessário continuar os estudos para obter resultados eficazes e seguros, de forma a prevenir ou a atrasar a progressão da doença.

## 5. Lista de Referências

1. JINDAL H, BHATT B, SK S, SINGH MALIK J. - **Alzheimer disease immunotherapeutics: then and now.** Hum Vaccin Immunother. 2014;10(9):2741-3.
2. BERCHTOLD NC, COTMAN CW. - **Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s.** Neurobiol Aging 1998; 19:173-89.
3. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. - **2013 Alzheimer's disease facts and figures.** *Alzheimers Dement* 2013, 9(2):1-71.
4. BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H. - **Alzheimer's disease.** Lancet 2006; 368:387-403.
5. WISNIEWSKI T, KONIETZKO U. - **Amyloid-beta immunisation for Alzheimer's disease.** Lancet Neurol. 2008;7(9):805-11.
6. WYSS-CORAY T. - **Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?** Nat Med. 2006; 12(9):1005-1015.
7. LAMBRACHT-WASHINGTON D, ROSENBERG RN. - **Anti-amyloid beta to tau - based immunization: Developments in immunotherapy for Alzheimer disease.** Immunotargets Ther. 2013;2013(2):105-114.
8. PRILLER C, BAUER T, MITTEREGGER G, KREBS B, KRETZSCHMAR HA, HERMS J. – **Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein.** J Neurosci. 2006;26(27):7212-7221.
9. WESTMARK CJ. - **What's happening at synapses? The role of amyloid  $\beta$ -protein precursor and  $\beta$ -amyloid in neurological disorders.** Mol Psychiatry. 2013;18(4):425-434.
10. WILQUET V, DE STROOPER B. – **Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration.** Curr Opin Neurobiol. 2004;14(5):585-588.
11. JICHA GA. - **Is passive immunization for Alzheimer's disease 'alive and well' or 'dead and buried'?** Expert Opin Biol Ther. 2009;9(4):481-91.
12. LAMBRACHT-WASHINGTON D, ROSENBERG RN. - **Anti-amyloid beta to tau - based immunization: Developments in immunotherapy for Alzheimer disease.** Immunotargets Ther. 2013;2013(2):105-114.
13. WINKLHOFER KF, TATZELT J, HAASS C. – **The two faces of protein misfolding: gain-and-loss-of-function in neurodegenerative diseases.** EMBO J. 2008;27:336-349.

14. KNOBLOCH M, FARINELLI M, KONIETZKO U, NITSCH RM, MANSUY IM. – **Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase I-dependent mechanisms.** J Neurosci. 2007;27:7648-7653.
15. SADOWSKI MJ, PANKIEWICZ J, SCHOLTZOVA H, MEHTA PD, PRELLI F, QUARTERMAIN D. - **Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 18787-18792.
16. BRODY DL, HOLTZMAN DM. - **Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders.** Annu Rev Neurosci 2008;31:175-93.
17. LEE G, LEUGERS CJ. – **Tau and Tauopathies.** Prog Mol Biol Trans Sci. 2012;107:263-293.
18. HARDY J. - **The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal.** J Neurochem 2009, 110:1129-1134.
19. LANNFELT L, MOLLER C, BASUN H, et al. - **Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- $\beta$  protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease.** Alzheimers Res Ther. 2014;6(2):16.
20. NILSBERTH C, WESTLIND-DANIELSSON A, ECKMAN CB, CONDRON MM, AXELMAN K, FORSELL C, STENH C, LUTHMAN J, et al. - **The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation.** Nat Neurosci. 2001;4:887-893.
21. JONSSON T, ATWAL JK, STEINBERG S, SHAAEDAL J, JONSSON PV, et al. – **A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline.** Nature. 2012;488:96-99.
22. CITRON M, OLTERSDORF T, HAASS C, et al. – **Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production.** Nature. 1992;360(6405):672-674.
23. LEMERE CA, BLUSZTAJN JK, YAMAGUCHI H, WISNIEWSKI T, SAIDO TC, SELKOE DJ. – **Sequence of deposition of heterogeneous amyloid  $\beta$ -peptides and APO E in Down Syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation.** Neurobiol Dis. 1996;3:16-32.
24. SELKOE DJ. - **The origins of Alzheimer disease: A is for amyloid.** JAMA 2000; 283: 1615-1617.
25. HARDY J, SELKOE DJ. – **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** Science. 2002;297:353-356.

26. LAMBRACHT- WASHINGTON D, ROSENBERG RN. - **Advances in the development of vaccines for Alzheimer's disease.** Discov Med. 2013;15(84):319-26.
27. LANNFELT L, RELKIN NR, SIEMERS ER. - **Amyloid- $\beta$ -directed immunotherapy for Alzheimer's disease.** J Intern Med. 2014;275(3):284-95.
28. PRINS ND, SCHELTENS P. - **Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: current status and outlook for the future.** Alzheimers Res Ther. 2013;5(6):56.
29. DE MATTOS RB, BALES KR, CUUMMINS DJ, DODORT JC, PAUL SM, HOLTZMAN DM. – **Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma Abeta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 8850-5.
30. ZLOKOVIC BV. - **Clearing amyloid through the blood-brain barrier.** J Neurochem 2004; 89: 807-11.
31. BARD F, CANNON C, BARBOUR R et al. - **Peripherally administered antibodies against amyloid b-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease.** Nat Med 2000; 6: 916-19.
32. ARBEL M, YACOBY I, SOLOMON B. - **Inhibition of amyloid precursor protein processing by beta-secretase through sitedirected antibodies.** Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 7718-23.
33. WISNIEWSKI T, SADOWAKI M. – **Preventing  $\beta$ - amyloid fibrillization and deposition:  $\beta$ - sheet breakers and pathological chaperone inhibitors.** BMC Neurosci. 2008;9(Suppl2):S5.
34. SCHENK D, BARBOUR R, DUNN W, et al. – **Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like-pathology in the PDAPP mouse.** Nature. 1999;400(6740):173-177.
35. LEMERE CA. - **Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles.** Mol Neurodegener. 2013;8(1):36.
36. GAMES D, ADAMS D, ALESSANDRINI R, BARBOUR R, BERTHELETTE P, BLACKWELL C, CARR T, CLEMENS J, DONALDSON T, GILLESPIE F, GUIDO T, HAGOPIAN S, JOHNSON-WOOD K, KHAN K, LEE M, LEIBOWITZ P, LIEBERBURG I, LITTLE S, MASLIAH E, MCCONLOGUE L, et al. - **Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein.** Nature. 1995; 373(6514): 523-527.

37. GILMAN S, KOLLER M, BLACK RS, JENKINS L, GRIFFITH SG et al. - **ANI792(QS-21)-201 Study Team. Clinical effects of Abeta immunization (ANI792) in patients with AD in an interrupted trial.** Neurology 2005; 64:1553-62.
38. HOLMES C, BOCHE D, WILKINSON D, YADEGARFAR G, et al. – **Long-term effects on A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomized placebo-controlled phase I trial.** Lancet. 2008;372:216-223.
39. WISNIEWSKI T, FRANGIONE B. - **Immunological and anti-chaperone therapeutic approaches for Alzheimer's disease.** Brain Pathol 2005;15:72-77.
40. PRIDE M, SEUBERT P, GRUNDMAN M, HAGEN M, ELDRIDGE J, BLACK RS. - **Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into ANI792-associated meningoencephalitis.** Neurodegener Dis 2008;5:194-196.
41. GOTZ J, CHEN F, VAN DJ, NITSCH RM. - **Formation of neurofibrillary tangles in P301 $\tau$  transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils.** Science 2001;293:1491-1495.
42. KNOPMAN DS, PARISI JE, SALVIATI A, et al. - **Neuropathology of cognitively normal elderly.** J Neuropathol Exp Neurol 2003;62:1087-1095.
43. RYAN JM, GRUNDMAN M. - **Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing.** J Alzheimers Dis. 2009; 17(2):243.
44. WINBLAD B, ANDREASEN N, MINTHON L, FLOESSER A, IMBERT G, DUMORTIER T, MAGUIRE RP, BLENNOW K, LUNDMARK J, STAUFENBIEL M, ORGOGOZO JM, GRAF A. - **Safety, tolerability, and antibody response of active A $\beta$  immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study.** Lancet Neurol. 2012;11(7):597-604.
45. WIESSNER C, WIEDERHOLD KH, TISSOT AC, FREY P, DANNER S, JACOBSON LH, JENNINGS GT, LUOND R, ORTMANN R, REICHWALD J, ZURINI M, MIR A, BACHMANN MF, STAUFENBIEL M. - **The second-generation active A $\beta$  immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects.** J Neurosci 2011, 31:9323-9331.
46. HAGEN M, SEUBERT P, JACOBSEN S, SCHENK D, PRIDE M, ARUMUGHAM R, WARNER G, KINNEY G. -**The A $\beta$  peptide conjugate vaccine, ACC-001, generates N-terminal anti-A $\beta$  antibodies in the absence of A $\beta$  directed T-cell responses.** Alzheimers Dement 2011, 7:S460-S461.

47. SCHNEEBERGER A, MANDLER M, OTAWA O, ZAUNER W, MATNNER F, SCHMIDT W. - **Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD) – from concept to clinical testing.** J Nutr Health Aging 2009, 13:264-26.
48. DAVTYAN H, GHOCHIKYAN A, PETRUSHINA I, HOVAKIMYAN A, DAVTYAN A, POGHOSYAN A, MARLEAU AM, MOVSESYAN N, KIYATKIN A, RASOOL S, LARSEN AK, MADSEN PJ, WEGENER KM, DITLEVSEN DK, CRIBBS DH, PEDERSEN LO, AGADJANYAN MG. - **Immunogenicity, efficacy, safety, and mechanism of action of epitope vaccine (Lu AF20513) for Alzheimer's disease: prelude to a clinical trial.** J Neurosci 2013, 33:4923-4934.
49. QU BX, XIANG Q, LI L, JOHNSTON SA, HYNAN LS, ROSENBERG RN. - **A $\beta$ 42 gene vaccine prevents A $\beta$ 42 deposition in brain of double transgenic mice.** J Neurol Sci 2007, 260:204-213.
50. QU B, BOYER PJ, JOHNSTON SA, HYNAN LS, ROSENBERG RN. - **A $\beta$ 42 gene vaccination reduces brain amyloid plaque burden in transgenic mice.** J Neurol Sci. 2006; 244:151-158.
51. HENDRIX S, NITSCH R. - **The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration.** J Neuroimmunol. 2007; 184(1–2):100-112.
52. BOSSÙ P, SPALLETTA G, CALTAGIRONE C, CIARAMELLA A. - **Myeloid Dendritic Cells are Potential Players in Human Neurodegenerative Diseases.** Front Immunol. 2015;6:632.
53. CIARAMELLA A, BIZZONI F, SALANI F, VANNI D, SPALLETTA G, SANARICO N, et al. - **Increased pro-inflammatory response by dendritic cells from patients with Alzheimer's disease.** J Alzheimers Dis (2010) 19(2):559-72.
54. NABAR NR, YUAN F, LIN X, WANG L, BAI G, MAYL J, et al. - **Cell therapy: a safe and efficacious therapeutic treatment for Alzheimer's disease in APP+PS1 mice.** PLoS One (2012) 7(12).
55. FISHER Y, NEMIROVSKY A, BARON R, MONSONEGO A. - **Dendritic cells regulate amyloid- $\beta$ -specific T-cell entry into the brain: the role of peri-vascular amyloid- $\beta$ .** J Alzheimers Dis (2011) 27(1):99-111.
56. BARD F, CANNON C, BARBOUR R, BURE R-L, et al. – **Peripherally administered antibodies against amyloid  $\beta$ - peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease.** Nat Med. 2000;6:916-919.

57. LAINO, C. - **News from The American Neurological Association Annual Meeting: Anti-Amyloid-Beta Drug Modestly Slows Cognitive Decline in Mild to Moderate AD.** *Neurology today.* 2012; 12 (21), 34-38.
58. BOHRMANN B, BAUMANN K, BENZ J, et al. - **Gantenerumab: a novel human anti-A $\beta$  antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- $\beta$  binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- $\beta$ .** *J Alzheimers Dis.* 2012;28(1):49-69.
59. SEVIGNY J, CHIAO P, BUSSIÈRE T, et al. - **The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease.** *Nature.* 2016;537(7618):50-6.
60. SEVIGNY J, et al. - **Amyloid PET screening for enrichment of early-stage Alzheimer disease clinical trials: experience in a phase Ib clinical trial.** *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 30, 1-7 (2016).
61. SEVIGNY, J, et al. - **Amyloid PET screening for enrichment of early-stage Alzheimer disease clinical trials: experience in a phase Ib clinical trial.** *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2016;30:1-7.
62. SZABO P, MUJALLI DM, ROTONDI ML, et al. - **Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood.** *J Neuroimmunol* 2010; 227: 167-74.
63. BATEMAN RJ, XIONG C, BENZINGER TL, et al. - **Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease.** *N Engl J Med.* 2012;367(9):795-804.
64. LEMERE CA, LOPERA F, KOSIK KS, et al. - **The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A $\beta$ 42 deposition and severe cerebellar pathology.** *Nat Med,* 1996;2(10):1446-500.
65. LOPERA F, ARDILLA A, MARTINEZ A, MADRIGALL C, et al. - **Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation.** *JAMA.* 1997;277:793-799.
66. ASUNI AA, BOUTAJANGOUT A, QUARTERMAIN D, SIGURDSSON EM. - **Immunotherapy targeting pathological prevents cognitive decline in a new tangle mouse model.** *J Neurosci.* 2010;30(49):16559-66.
67. ASUNI AA, BOUTAJANGOUT A, QUARTERMAIN D, SIGURDSSON EM. - **Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements.** *J Neurosci* 2007, 27:9115-9129.
68. BOIMEL M, GRIGORIADIS N, LOURBOPOULOS A, HABER E, ABRAMSKY O, ROSENMAN H. - **Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice.** *Exp Neurol* 2010, 224:472-485.

69. NOVAK M. - **Tau immunotherapy – the way how to crack the immune code of misfolded protein tau [abstract S4-02-02]**. In Presented at the International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD). Boston, MA, USA; 2013.
70. THEUNIS C, CRESPO-Biel N, GAFNER V, PIHLGREN M, LOPEZ-DEBER MP, REIS P, HICKMAN DT, ADOLFSSON O, CHUARD N, NDAO DM, BORGHGRAEF P, DEVIJVER H, VAN LEUVEN F, PFEIFER A, MUHS A. - **Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein tau, assessed in Tau.P301L mice that model tauopathy**. PLoS One 2013, 8:e72301.
71. BOUTAJANGOUT A, INGADOTTIR J, DAVIES P, SIGURDSSON EM. - **Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain**. J Neurochem. 2011;118(4):658-667.
72. ASUNI AA, BOUTAJANGOUT A, QUATERMAIN D, SIGURDSSON EM. - **Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements**. J Neurosci. 2007;27(34):9115-9129.
73. FROST B, JACKS RL, DIAMOND MI. - **Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell**. J Biol Chem. 2009;284(19): 12845-12852.
74. BI M, ITTNER A, KE YD, GOTZ J, ITTNER LM. - **Tau-targeted immunization impedes progression of neurofibrillary histopathology in aged P301L tau transgenic mice**. PLoS One. 2011;6(12):e26860.
75. TROQUIER L, CAILLIEREZ R, BURNOUF S, et al. - **Targeting phospho-Ser422 by active Tau immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach**. Curr Alzheimer Res. 2012;9(4):397-405.
76. DE FELICE FG, WU D, LAMBERT MP, et al. - **Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers**. Neurobiol Aging. 2008;29(9):1334-1347.