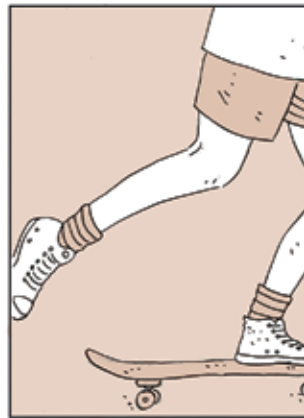
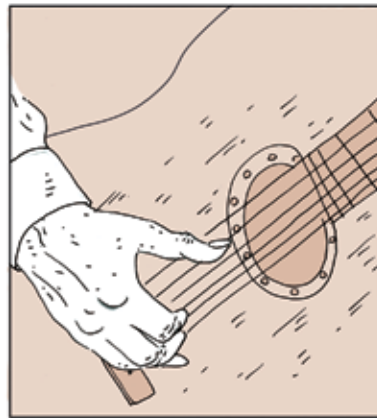




*Artigo
da capa*

Dificuldades e desafios na busca pela cura da doença de Alzheimer

[Artigo 1, páginas de 8 a 19]





Marimelia Porcionatto

Professora associada livre-docente da disciplina de Biologia Molecular, da Escola Paulista de Medicina (EPM), com formação em Biomédica pela EPM, mestrado e doutorado em Biologia Molecular pela EPM, pós-doutorado em Neurobiologia pela Harvard Medical School; é membro da Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT Regenera).

marimelia.porcionatto@gmail.com



RESUMO

O aumento da expectativa de vida da população eleva a prevalência de doenças crônicas. Estima-se que em 2050 haverá cerca de 130 milhões de pessoas no mundo com demência. A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência, caracterizada por neurodegeneração crônica progressiva. Procura-se discutir aspectos biológicos e fisiológicos da DA, para conhecer e entender os mecanismos celulares e moleculares normais, e como os elementos envolvidos no funcionamento normal do Sistema Nervoso Central (SNC) eventualmente apresentam um comportamento anormal sob a DA. Em razão disso, apresenta-se uma revisão de trabalhos publicados com vistas a reavaliar os métodos diagnósticos disponíveis e propor algumas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: demência; neurodegeneração; imunoterapia; terapia gênica; terapia celular.

ABSTRACT

The increase in the population's life expectancy raises the prevalence of chronic diseases. It is estimated that by 2050 there will be around 130 million people in the world with dementia. Alzheimer's Disease (AD) is the main cause of dementia, it is characterized by chronic progressive degeneration. Here we have tried to discuss the biological and physiological aspects of AD, to get to know and understand the standard cellular and molecular mechanisms, and how the elements involved with the normal operation of the Central Nervous System (CNS) eventually present an abnormal behavior when under AD. Because of this, we present a review of papers published in order to reassess the available diagnostic methods and propose some therapeutic strategies.

Keywords: dementia; neurodegeneration; immunotherapy; gene therapy; cell therapy.

INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 900 milhões de pessoas no mundo têm mais de 60 anos. O aumento da expectativa de vida da população aumenta também a prevalência de doenças crônicas, entre elas aquelas que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC). De acordo com o relatório anual da *Alzheimer's Disease International (ADI) – World Alzheimer Report 2015*, o número estimado de pessoas vivendo com demência em 2050 será de cerca de 130 milhões ao redor do mundo, sendo 2 milhões na América do Sul (PRINCE et al., 2015). Esse número representará um aumento de mais de 170% no número de pessoas com mais de 60 anos vivendo com demência em 2050.

A doença de Alzheimer (DA) é considerada a principal causa de demência e, no momento, é uma doença sem cura. A DA é caracterizada por neurodegeneração crônica progressiva, associada com idade avançada, embora não exclusivamente, pois pode acometer indivíduos com menos de 65 anos, quando é denominada DA de início precoce. A incidência da doença é de 15% em indivíduos acima de 65 anos e de 50% naqueles acima de 85 (SMITH, 1998). Como consequência do desenvolvimento da DA, o indivíduo apresenta comprometimento neurológico gradual que envolve perda de memória recente, dificuldade de resolver problemas, dificuldades na fala e alterações na personalidade.

Com relação aos aspectos biológicos, a DA é caracterizada pelo depósito anormal do peptídeo amiloide β ($A\beta$) na matriz extracelular do SNC, formando placas amiloides (ou placas senis), e por hiperfosforilação da proteína tau, proteína associada a microtúbulos, que leva à formação de agregados insolúveis dentro dos neurônios. Essas duas condições – depósito de $A\beta$ fora das células do SNC e formação de estruturas anormais de tau dentro dos neurônios – levam, progressivamente, à morte neuronal, acompanhada de um quadro inflamatório (GUALTIEROTTI et al., 2017).

Para compreender os desafios e as dificuldades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que levem à cura da DA, com reversão dos sintomas e dos danos estabelecidos, é necessário conhecer e entender os mecanismos celulares e moleculares normais, e como os elementos envolvidos no funcionamento normal do SNC eventualmente passam a ter um comportamento anormal.

A incidência da doença é de

15%

em indivíduos acima de 65
anos e de

50%

naqueles acima de 85
(SMITH, 1998)

Artigo 1Dificuldades e desafios na busca pela cura da
doença de Alzheimer**GERAÇÃO DO PEPTÍDEO A β E DESENVOLVIMENTO DA DA**

O peptídeo A β é gerado a partir da degradação parcial de uma proteína maior que faz parte da membrana celular dos neurônios, a proteína precursora amiloide (APP), por três enzimas, α , β e γ -secretases (CIRRITO et al., 2008). Em condições fisiológicas, APP é clivada pela α -secretase, gerando um fragmento solúvel, sAPP α , que é secretado para o meio extracelular. O restante da molécula APP sofre uma segunda clivagem enzimática, dessa vez pela enzima γ -secretase, gerando dois peptídeos, AICD (APP *intracelular domain*) e p3, ainda com função desconhecida (PLUMMER et al., 2016). Esta via é denominada como via não amiloidogênica, por não causar a formação de placas amiloides. Acredita-se que o peptídeo sAPP α seja neuroprotetor e apresente pelo menos duas funções fisiológicas: modular a excitabilidade dos neurônios e estimular o crescimento de neuritos, ambas fundamentais para que os neurônios exerçam suas funções (CHOW et al., 2010).

A degradação de APP pode seguir outra via. Isso ocorre quando, em vez de ser inicialmente clivada pela α -secretase, APP é clivada pela β -secretase, seguida de uma clivagem por γ -secretase, gerando o peptídeo A β , que é liberado no meio extracelular. Esta via é denominada amiloidogênica, pois A β secretado pode acumular-se fora da célula e formar agregados insolúveis que culminam na formação das placas amiloides (SHANKAR et al., 2008). Evidências mostram que os agregados, ou oligômeros de A β , inibem a atividade e reduzem a densidade das espículas dendríticas de neurônios e, no longo prazo, induzem à morte neuronal.

Dados da literatura mostram que a degradação de APP por α -secretase na via não amiloidogênica previne contra a produção de A β , porém ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de sinalização que estimulam a via da α -secretase em detrimento da via da β -secretase, a via amiloidogênica.

Diversas mutações no gene que codifica para APP e favorecem a degradação por β -secretase, levando ao aumento da produção do peptídeo A β , já foram identificadas em pacientes com DA de início precoce (ROGER et al., 2016). Nos indivíduos com DA após os 65 anos, mutações em outros genes foram identificadas e, entre essas mutações, destaca-se a mutação no gene da apolipoproteína E (APOE), proteína que participa do transporte de lipídeos e que vem sendo relacionada com a remoção do peptídeo A β do cérebro (ROGER et al., 2016).



Em razão da complexidade do desenvolvimento da DA e dos diferentes mecanismos celulares e moleculares que podem estar afetados, é de se esperar que ainda não seja possível reverter o quadro completamente.

Um dos mecanismos de remoção de A β é pelo transporte através da barreira hematoencefálica, mediado por APOE e clusterin (CLU). Após cruzar a barreira hematoencefálica, o complexo A β -CLU-APOE é reconhecido pela proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP1) e pode ser endocitado, ou seja, transportado para dentro da célula e degradado. Alternativamente, A β presente na circulação sanguínea se liga à forma solúvel de LRP1, sendo que cerca de 70-90% de A β circulante no sangue está ligado à LRP1 (SAGARE et al., 2007). Modelos animais e pacientes de DA apresentam menor quantidade de LRP1 na barreira hematoencefálica (DEANE et al., 2008a, 2008b), indicando que a deficiência na remoção de A β contribuiria para seu acúmulo e consequente agregação no tecido nervoso. Uma via alternativa de remoção de A β envolve a fagocitose dos oligômeros pela micróglia, e mutações nos genes que codificam moléculas-chave nesse processo também estão relacionadas com o desenvolvimento de DA (ROGER et al., 2016).

Em resumo, pelo menos dois mecanismos de acúmulo de A β são propostos atualmente: a) produção excessiva do peptídeo A β pela ação da enzima b-secretase e b) diminuição da remoção de A β por meio da barreira hematoencefálica por deficiência no mecanismo de transcitose mediado por LRP1. Independentemente do mecanismo afetado, a consequência é a mesma: acúmulo de peptídeo A β no tecido nervoso e formação de agregados tóxicos que causam a morte neuronal, por mecanismos que ainda são pouco conhecidos.

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA DA

Em razão da complexidade do desenvolvimento da DA e dos diferentes mecanismos celulares e moleculares que podem estar afetados, é de se esperar que ainda não seja possível reverter o quadro completamente. Além da complexidade da fisiopatologia, um dos fatores

Artigo 1Dificuldades e desafios na busca pela cura da
doença de Alzheimer

complicadores do desenvolvimento de tratamentos eficientes é que o diagnóstico se dá quando a doença já está instalada, ou seja, quando os sintomas cognitivos são perceptíveis, e as placas amiloides causadas pelo depósito de oligômeros do peptídeo A β estão instaladas no cérebro do paciente. Já foi demonstrado que os depósitos de A β podem preceder os sintomas por pelos menos 20 anos (BATEMAN et al., 2012). Além das estratégias terapêuticas que serão discutidas a seguir, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que possam antecipar a confirmação da DA em indivíduos sem manifestações cognitivas tem sido alvo de muitos estudos. Tanto a detecção de biomarcadores no sangue ou no líquido cefalorraquidiano quanto exames de imagem são de grande valor para a detecção precoce. Uma revisão recente de mais de 450 trabalhos publicados (WEINER et al., 2017) chegou a importantes conclusões referentes ao uso dos métodos diagnósticos disponíveis atualmente e ao curso da DA:

- 1 Mudanças conformacionais e funcionais, incluindo mudanças sutis no formato e na textura do hipocampo, atrofia de áreas fora do hipocampo e interrupção de circuitos funcionais, são detectáveis em indivíduos pré-sintomáticos, antes da ocorrência de atrofia hipocampal;
- 2 Em indivíduos com depósito anormal de A β , biomarcadores tornam-se anormais na ordem predita pela hipótese da mudança na degradação de APP por β -secretase (via amiloidogênica) em detrimento da degradação por α -secretase (via não amiloidogênica);
- 3 O declínio cognitivo está mais intimamente relacionado com a hiperfosforilação de tau que com o acúmulo de A β ;
- 4 Os fatores de risco de doenças cerebrovasculares podem interagir com A β , aumentando as anormalidades da substância branca e podendo acelerar a progressão da DA, em conjunto com anormalidades relacionadas com a proteína tau;
- 5 Diferentes padrões de atrofia estão associados com perda de memória e perda de funções executivas, e podem estar na base dos sintomas psiquiátricos;
- 6 As conexões entre fatores estruturais, funcionais e metabólicos são perturbadas com a progressão da DA. O modelo de espalhamento da patologia causada pelo acúmulo de A β , similar ao que ocorre com o prion, pelos circuitos neurais pode prever o padrão de depósito de A β , bem como o declínio no metabolismo de glicose;
- 7 Novos fatores de risco bem como mutações protetoras foram identificados utilizando uma abordagem biologicamente informativa.

A busca por novas abordagens terapêuticas soma-se aos estudos para melhor compreender os eventos biológicos envolvidos no aparecimento e desenvolvimento da DA, bem como na melhoria dos métodos diagnósticos. Essas estratégias incluem imunoterapia, terapia gênica e terapia celular. Segundo o banco de registros de ensaios clínicos *Clinical Trials* (www.clinicaltrials.gov), atualmente estão cadastrados 2.143 ensaios, sendo 1.085 nos Estados Unidos e 64 na América do Sul, e desses, 28 são no Brasil como parte de estudos multicêntricos. Alguns desses ensaios têm como objetivo buscar tratamentos para melhoria dos sintomas, outros buscam determinar a segurança da estratégia terapêutica pretendida e alguns já têm resultados, porém nenhum ensaio já concluído relatou resultados positivos.

IMUNOTERAPIA

De acordo com a hipótese amiloidogênica, na qual o acúmulo de peptídeo A β é a causa inicial da DA, estratégias de vacinação na tentativa de instruir o sistema imunológico para remover o excesso de A β parecem promissoras. Ensaios clínicos com enfoque na imunoterapia têm sido realizados desde o ano 2000, porém ainda com resultados negativos. Um ensaio clínico cujo objetivo foi imunizar pacientes portadores de DA utilizando um peptídeo similar ao A β levou ao desenvolvimento de meningoencefalite com infiltração de células T (células do sistema imunológico) no cérebro dos pacientes vacinados e foi interrompido (GILMAN et al., 2005). A análise *post-mortem* dos cérebros de pacientes que participaram desse estudo indicou que placas senis foram desfeitas, porém houve uma aceleração da degeneração neuronal (PAQUET et al., 2015).

Ensaios clínicos utilizando o anticorpo monoclonal anti-A β mostraram que o anticorpo reduziu o acúmulo de A β porém sem melhoras clínicas nos pacientes. Mais importante, porém, é que uma meta-análise realizada recentemente mostra mais resultados



Alguns desses ensaios têm como objetivo buscar tratamentos para melhoria dos sintomas, outros buscam determinar a segurança da estratégia terapêutica pretendida e alguns já têm resultados, porém nenhum ensaio já concluído relatou resultados positivos.



Poucos ensaios clínicos estão descritos nos quais a terapia gênica ou a terapia celular é utilizada para tratamento da DA.

adversos que positivos no longo prazo e os autores sugerem que essa imunoterapia não deva ser utilizada em pacientes com DA (ABUSHOUK et al., 2017).

Finalmente, a imunização utilizando vacinas de DNA está em estudo, porém no momento só existem estudos realizados em animais, nos quais foi mostrada redução de mais de 50% nos depósitos de A β (ROSENBERG et al., 2016). Embora os resultados pareçam motivadores, os ensaios clínicos que mostraram redução de placas senis pelo uso de anticorpos monoclonais não mostraram melhora no quadro clínico, ao contrário, estudos foram suspensos por piora nos pacientes submetidos aos tratamentos.

TERAPIA GÊNICA E TERAPIA CELULAR

Poucos ensaios clínicos estão descritos nos quais a terapia gênica ou a terapia celular é utilizada para tratamento da DA. O uso de terapia gênica, modalidade de terapia na qual um vírus contendo o gene que codifica a proteína que se quer expressar é injetado no paciente, para tratamento de DA ainda é experimental e são poucos os estudos registrados. Um desses estudos propõe a injeção intracerebral de um adenovírus contendo o gene que codifica para NGF (*nerve growth factor*), um importante fator neurotrófico, cuja principal função no cérebro adulto é promover a sobrevivência de neurônios¹.

Outro estudo faz uma combinação de terapia celular e terapia gênica, num modelo denominado *ex vivo*. Resumidamente, na terapia *ex vivo* células do indivíduo são isoladas e manipuladas *in vitro* e são, posteriormente, devolvidas ao paciente. Esse estudo prevê a retirada de uma biópsia de pele dos pacientes portadores de DA, isolamento e cultivo de fibroblastos que serão posteriormente infectados com vírus contendo o gene que codifica o fator neurotrófico NGF. Os fibroblastos que passarem a produzir e secretar NGF serão transplantados no cérebro dos pacientes².

Em ambos os casos, o papel de NGF seria o de proteger neurônios colinérgicos da degeneração, que é parte da progressão da DA, e aumentar a função dos neurônios colinérgicos sobreviventes.

1 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00087789 – Randomized, Controlled Study Evaluating CERE-110 in Subjects With Mild to Moderate Alzheimer’s Disease.

2 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00017940 – Gene Therapy for Alzheimer’s Disease Clinical Trial.

CONCLUSÃO

Apesar de todo o investimento mundial, tanto dos fundos de pesquisa governamentais quanto de companhias farmacêuticas, nenhum tratamento, seja com drogas, anticorpos, vacinas, terapias celular e gênica, mostrou-se eficiente na reversão da neurodegeneração causada pela DA. Uma característica das estratégias terapêuticas utilizadas tem sido a de focar em uma parte do processo, como, por exemplo, desfazer as placas amiloides, aumentar a remoção de A β ou inibir a ação da β -secretase. Possivelmente uma abordagem mais ampla, combinando diferentes terapias, será necessária para frear o desenvolvimento dessa doença tão terrível para os pacientes e seus familiares e amigos. ☹

Artigo 1Dificuldades e desafios na busca pela cura da
doença de Alzheimer**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M. (2015) World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerreport2015summary.pdf>
- 2 Smith MA. (1998) Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol.* 42:1-54.
- 3 Gualtierotti R, Guarnaccia L, Beretta M, Navone SE, Campanella R, Riboni L, Rampini P, Marfia G. (2017) Modulation of neuroinflammation in the central nervous system: role of chemokines and sphingolipids. *Adv Ther.* Epub 4/jan/17 DOI: 10.1007/s12325-016-0474-7.
- 4 Cirrito JR, Kang J-E, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM. (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58:42-51.
- 5 Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. (2016) The neuroprotective properties of the amyloid precursor protein following traumatic brain injury. *Aging Dis.* 7(2):163-179.
- 6 Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. (2010) An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* 12:1-12.
- 7 Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 14:837-842.
- 8 Roger N, Rosenberg MD, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W. (2016) Genomics of Alzheimer disease *JAMA Neurol.* Epub DOI:10.1001/jamaneurol.2016.0301.
- 9 Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic BV. (2007) Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 13:1029-1031.
- 10 Deane R, Sagare A, Zlokovic BV. (2008a) The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 14:1601-1605.
- 11 Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV. (2008b) apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 118:4002-4013.
- 12 Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC. (2012) Dominantly inherited Alzheimer network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 367(9):795-804.

- 13 Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Laurel A, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, Harvey D, Jack CR Jr, Jagust W, Morris JC, Peterson RC, Saykin AJ, Shaw LM, Toga AW, Trojanowski JQ, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2017) Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials. *Alzheimer's Dement.* e1-e85
- 14 Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM, AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 64(9):1553-1562.
- 15 Paquet C, Amin J, Mouton-Liger F, Nasser M, Love S, Gray F, Pickering RM, Nicoll JA, Holmes C, Hugon J, Boche D. (2015) Effect of active A immunotherapy on neurons in human Alzheimer's disease. *J Pathol.* 235(5):721-730.
- 16 Abushouk AI, Elmaraezy A, Aglan A, Salama R, Fouda S, Fouda R, Al Safadi AM. (2017) *Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials.* *BMC Neurol.* 4;17(1):66. .