



# **O PAPEL DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Miguel Alexandre Carvalho Gomes**

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto (FFUL) e coorientação da Professora Doutora Isabel Maria Pires Sebastião Ramalhinho.

**2015**



# **O PAPEL DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Miguel Alexandre Carvalho Gomes**

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto (FFUL) e coorientação da Professora Doutora Isabel Maria Pires Sebastião Ramalhinho.

**2015**

## **O PAPEL DOS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

### *Declaração de autoria do trabalho*

Declaro ser o autor deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

O aluno,

---

Miguel Gomes

Copyright© by Miguel Gomes, “*A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*”

## **Dedicatória e Agradecimentos**

*“Choose a job you love, and you will never have to work a day in your life”*

*Confucius*

Encontrando-me na reta final de uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização desta monografia.

Agradeço aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho, dedicação e educação que me tornaram no que hoje sou como ser humano. À minha irmã pelo companheirismo e amizade, ao longo de toda a minha vida. Aos meus tios, primas e avós que sempre me apoiaram e que estão todos muito felizes por estar prestes a encerrar esta etapa tão importante na minha vida. À minha namorada pela paciência, amor e afeto, presentes nos bons e maus momentos ultrapassados juntos. A todos os meus amigos e colegas de curso, que me acompanharam durante o meu percurso académico, tornando-o numa experiência única e inesquecível.

Gostaria também deixar um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Doutor Rui Pinto, e coorientadora, Professora Doutora Isabel Ramalinho, pela orientação e disponibilidade demonstradas.

E por último, mas não menos importante, agradeço também a todos os professores que lecionam no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, que comigo partilharam do seu saber e contribuíram para a minha formação enquanto farmacêutico.

**A todos,**

**O meu sincero Obrigado!**

## **Resumo**

Ao longo do último século, melhorias nos cuidados de saúde têm contribuído para um aumento da esperança média de vida da população mundial. Este “envelhecimento” global tem sido acompanhado pelo aumento de um síndrome, denominado por Demência, caracterizado por uma deterioração progressiva e irreversível nas funções cognitivas (memória, linguagem, capacidades de planeamento e de execução, etc.) que conduzem a uma perda de autonomia dos doentes na execução das suas rotinas diárias, e mais tarde pode resultar na perda total de autonomia ou mesmo levar à morte.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, responsável por mais de metade dos casos de demência em idosos, podendo, no entanto, ocorrer em qualquer idade adulta. Desta forma, é considerada atualmente um grave problema de saúde pública.

A presente monografia tem como objetivo clarificar a fisiopatologia inerente à DA, através da identificação dos processos e mediadores envolvidos. O início do processo patológico da DA precede, em décadas, o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Nesta fase pré-clínica, já se observa uma perda neuronal gradual. A presença de depósitos extracelulares de proteína  $\beta$ -amiloide e de tranças neurofibrilares intraneuronais, constituídas por filamentos de proteína tau hiperfosforilada, são os principais achados histopatológicos desta doença.

Um diagnóstico definitivo da DA requer, para além da avaliação clínica, uma confirmação histopatológica, através de uma autópsia ou biópsia cerebral. Por sua vez, o diagnóstico clínico é probabilístico, e embora apresente elevado rigor, é realizado já em fase de demência. Com o desenvolvimento de novos fármacos que visam atrasar e reverter a progressão da DA, torna-se importante diagnosticá-la em fase pré-demência. Com esta finalidade, foram elaborados novos critérios de diagnóstico da DA, onde se incluíram as análises clínicas a biomarcadores. Um biomarcador é uma entidade biológica que pode ser medida experimentalmente e indicar a ocorrência de um processo biológico ou patogénico de um organismo ou uma resposta a um agente farmacológico.

Esta monografia é suportada pela revisão bibliográfica efetuada segundo um carácter interpretativo da mesma, e pretende estudar o papel e a importância dos diferentes biomarcadores no diagnóstico da Doença de Alzheimer, em fase pré-demência.

**Termos-chave:** “biomarcadores”; “demência”; “Doença de Alzheimer”; “diagnóstico”.

## **Abstract**

Over the last century, improvements in health care have contributed to an increase in average life expectancy of the World population. This global “aging” has been accompanied by the growth of a syndrome, referred to as Dementia, characterized by a progressive and irreversible deterioration of cognitive functions (memory, language, planning and execution capacities, etc.) that lead to patients loss of autonomy in carrying out their daily routines, and later on can result in complete dependence and even death.

Alzheimer’s Disease (AD) is a neurodegenerative disorder, accounting for over half of all dementia’s cases in the elderly, although it may occur at any time in adulthood. Thus, it currently represents a major public health problem.

The present paper purposes to clarify AD’s physiopathology through the knowledge of the processes and mediators associated. The onset of AD’s pathologic cascade precedes, in decades, the onset of clinical symptoms. At this preclinical stage, it can already be detected an ongoing neuronal loss. The extracellular  $\beta$ -amyloid deposits and the intraneuronal neurofibrillary tangles, consisting of hyperphosphorylated tau protein filaments, are the major histopathological findings of this disease.

A definitive diagnosis of AD requires, besides clinical evaluation, an histopathological confirmation, by means of an autopsy or brain biopsy. In turn, the clinical diagnosis of AD is probabilistic, and despite of exhibiting high accuracy, it can only be performed at a dementia stage. With the development of new drugs which aim to slow and reverse AD’s pathological process, it becomes fundamental to diagnose it at a pre-dementia stage. To this end, new criteria for AD’s diagnosis have been set, which now include clinical analyzes of biomarkers. A biomarker is a biological entity that can be measured experimentally and indicate the occurrence of a biological or pathogenic process in an organism or a response to a pharmacological agent.

This paper is supported by a literature review carried out according to an explanatory outlook, and it intends to study the role and importance of different biomarkers in the diagnosis of Alzheimer’s Disease, at a pre-dementia stage.

**Keywords:** “biomarker”, “dementia”, “Alzheimer’s Disease”, “diagnosis”.

## **Índice**

<b>Resumo.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Quadros.....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Doença de Alzheimer.....</b>	<b>4</b>
2.1 Epidemiologia.....	4
2.2 Manifestações Clínicas.....	5
2.3 Diagnóstico.....	8
2.3.1 Avaliação Clínica e Neuropsicológica.....	9
2.3.2 Biomarcadores no diagnóstico.....	10
2.4 Défice Cognitivo Ligeiro.....	13
2.5 Fisiopatologia.....	16
2.5.1 Hipótese da Cascata Amiloide.....	21
2.5.2 Hiperfosforilação da proteína Tau.....	25
2.5.3 Produção de A $\beta$ .....	27
2.5.4 Degradação e Clearance de A $\beta$ .....	32
2.5.5 Resposta Inflamatória ao nível do Sistema Nervoso Central.....	34
2.6 Estratégias terapêuticas atuais.....	37
2.6.1 Tratamento não-farmacológico.....	37
2.6.2 Tratamento farmacológico.....	38
2.7 Fatores de risco e proteção.....	42
2.7.1 Fatores de risco não-modificáveis.....	43
2.7.2 Fatores de risco modificáveis.....	47
2.7.3 Fatores de proteção.....	50

<b>3. Biomarcadores .....</b>	<b>53</b>
3.1 Definição e utilidade dos biomarcadores .....	53
3.2 Métodos e materiais de recolha.....	56
3.3 Biomarcadores da DA .....	56
3.3.1 Biomarcadores da patologia amiloide .....	58
3.3.2 Biomarcadores de Lesão Neuronal.....	66
3.3.3 Biomarcadores de disfunção sináptica .....	72
3.3.4 Biomarcadores Inflamatórios: Citocinas e Quimiocinas.....	73
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>76</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>78</b>



## **Índice de Figuras**

<b>Figura 2.1.</b>	Representação esquemática da correlação entre a progressão clínica e o processo patológico da Doença de Alzheimer de acordo com o Modelo de Braak&Braak.....	6
<b>Figura 2.2.</b>	Modelo hipotético descritivo da relação entre a magnitude dos biomarcadores nos diferentes estádios da Doença de Alzheimer.....	11
<b>Figura 2.3.</b>	Progressão dos sintomas cognitivos e funcionais durante a transição de Défice Cognitivo Ligeiro para Doença de Alzheimer.....	14
<b>Figura 2.4.</b>	Principais achados histopatológicos característicos da Doença de Alzheimer. ....	16
<b>Figura 2.5.</b>	Localização das funções cognitivas no córtex cerebral.....	17
<b>Figura 2.6.</b>	Principais características morfológicas macroscópicas da Doença de Alzheimer.....	17
<b>Figura 2.7.</b>	Progressão da patologia neurofibrilar de acordo com os seis estádios de Braak&Braak.....	20
<b>Figura 2.8.</b>	Ilustração da Hipótese da Cascata Amiloide.....	22
<b>Figura 2.9</b>	Ilustração representativa da lesão oxidativa induzida pela proteína $\beta$ -amilóide.....	25
<b>Figura 2.10.</b>	Hiperfosforilação da proteína Tau e formação de tranças neurofibrilares.....	26
<b>Figura 2.11.</b>	Ilustração da maturação e tráfego intracelular da APP.....	28
<b>Figura 2.12.</b>	Representação da estrutura e processamento proteolítico da APP.....	29
<b>Figura 2.13</b>	Mecanismos envolvidos na eliminação de $A\beta$ .....	33
<b>Figura 2.14</b>	Resposta Inflamatória na Doença de Alzheimer ao nível do Sistema Nervoso Central.....	35

<b>Figura 2.15</b>	Mecanismo de ação dos Inibidores da Acetilcolinesterase (IACHes).....	39
<b>Figura 3.1.</b>	Distribuição hipotética dos resultados de testes de diagnóstico entre doentes e não-doentes.....	55
<b>Figura 3.2.</b>	Diferenças observadas nas imagens PiB-PET obtidas de um individuo cognitivamente saudável (controlo) e de um Doente de Alzheimer.....	65
<b>Figura 3.3.</b>	Diferenças observadas nas imagens RMN obtidas de um individuo cognitivamente saudável (controlo) e de um Doente de Alzheimer.....	70
<b>Figura 3.4.</b>	Diferenças observadas nas imagens FDG-PET obtidas de um individuo cognitivamente saudável (controlo) e de um Doente de Alzheimer.....	71

## **Índice de Quadros**

<b>Quadro 2.1.</b>	Classificação do Défice Cognitivo Ligeiro de acordo com a sua probabilidade de progressão para Doença de Alzheimer, dada pela combinação de resultados dos dois principais biomarcadores desta doença.....	15
<b>Quadro 3.1.</b>	Tabela de Contingência na avaliação do valor de diagnóstico de um biomarcador.....	53
<b>Quadro 3.2.</b>	CrITÉrios de seleção de um bom biomarcador para o estudo da Doença de Alzheimer.....	55
<b>Quadro 3.3</b>	Classificação dos biomarcadores de diagnóstico da Doença de Alzheimer.....	58

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 3.1.</b>	Desempenho do biomarcador A $\beta$ 42 no LCR na diferenciação entre Doentes de Alzheimer e controlos saudáveis.....	59
<b>Tabela 3.2.</b>	. Desempenho do biomarcador T-tau no LCR na diferenciação entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis .....	67
<b>Tabela 3.3.</b>	Desempenho dos biomarcadores P-tau181 e P-tau231 no LCR na diferenciação entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis.....	68

## **Lista de Abreviaturas**

<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína $\beta$ -amiloide
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios Não-Esteroides
<b>APH-1</b>	Faringe Anterior Defetiva 1
<b>APLP1 e 2</b>	Proteína tipo-percursora amiloide 1 e 2
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína Percursora de Amiloide
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BACE-1</b>	<i>B-Site APP Cleaving Enzyme 1</i>
<b>BHE</b>	Barreira Hemato-Encefálica
<b>CaMK II</b>	Proteína Cinase dependente de Cálcio-Calmodulina II
<b>cdk5</b>	Cinase dependente de ciclina 5
<b>CDR</b>	<i>Clinical Dementia Rating Scale</i>
<b>Ck-1</b>	Caseína Cinase 1
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DCL</b>	Défice Cognitivo Ligeiro
<b>DGS</b>	Direção Geral de Saúde
<b>DHA</b>	Ácido Docosahexanóico
<b>DLB</b>	Demência com Corpos de Lewy
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPA</b>	Ácido Eicosapentaenóico
<b>EuroCoDe</b>	<i>European Collaboration on Dementia</i>
<b>FDG</b>	2-Fluoro-2-Desoxi-Glucose
<b>FTD</b>	Demência Frontotemporal
<b>GDS</b>	<i>Global Deterioration Scale</i>
<b>GGAs</b>	<i>Golgi-localized <math>\gamma</math>-ear containing ADP ribosylation-binding factor</i>
<b>GSK-3</b>	Glicogénio Sintase Cinase-3
<b>IACHe</b>	Inibidores da Acetilcolinesterase
<b>IDE</b>	Enzima Degradadora de Insulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal

<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>LRP1</b>	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
<b>LTD</b>	<i>Long Term Depression</i>
<b>LTP</b>	<i>Long Term Potentiation</i>
<b>MAPs</b>	<i>Microtubule-Associated Proteins</i>
<b>MAPT</b>	<i>Microtubule-Associated Protein Tau</i>
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MMSE</b>	<i>Mini Mental State Examination</i>
<b>MoCA</b>	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
<b>NCT</b>	Nicestrina
<b>NEP</b>	Neprisilina
<b>NIA-AA</b>	<i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>P-tau</b>	Proteína Tau Hiperfosforilada
<b>PEN2</b>	Potenciador da Presinilina 2
<b>PET</b>	Tomografia por Emissão de Positrões
<b>pg</b>	Picograma
<b>PiB</b>	Composto B de Pittsburgh
<b>PKA</b>	Proteína Cinase A
<b>PKC</b>	Proteína Cinase C
<b>PP2A e 1</b>	Fosfatase 2A e 1
<b>PSEN1 e 2</b>	Presenilina 1 e 2
<b>RAP</b>	<i>Ras-Related Protein</i>
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SAPKs</b>	Proteínas Cinases ativadas pelo <i>stress</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>SPECT</b>	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
<b>T-tau</b>	Proteína Tau Total
<b>TAC</b>	Tomografia Computorizada
<b>Th-T</b>	Tioflavina-T
<b>TC</b>	Tomografia Computorizada
<b>TNFs</b>	Tranças Neurofibrilares
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral

## **1. Introdução**

A demência pode ser definida como um comprometimento adquirido da memória associado ao declínio de pelo menos um dos outros domínios cognitivos, tais como: linguagem, capacidade de planeamento e de execução, de reconhecimento de coisas e pessoas, etc. A Doença de Alzheimer (DA) é uma síndrome neurodegenerativa, descrita pela primeira vez em 1907 pelo psiquiatra alemão *Alois Alzheimer* e, hoje em dia, apresenta-se como a forma mais prevalente de demência na sociedade moderna.(1)(2)

Com o aumento da esperança média de vida e o conseqüente envelhecimento da população, a prevalência dos casos de demência tem vindo a crescer abruptamente, sendo já considerada um grave problema de saúde pública. Estima-se que cerca de 1% dos indivíduos na faixa etária dos 60-64 anos, 5 a 7% entre os 75 e os 79 anos e quase um terço dos idosos a partir dos 85 anos sejam afetados por esta enfermidade.(3) Para além da idade, outros fatores de risco têm sido associados à incidência da DA, tais como: o género, herança genética, depressão, baixa escolaridade, estilo de vida e doenças a ele relacionadas (diabetes, hipertensão, dislipidemia e obesidade), etc.(4)

A maioria dos doentes de Alzheimer passa por um estado de transição intermédio, que se situa entre o envelhecimento cognitivo normal e o estado de demência instalado. Esta fase é atribuída ao Défice Cognitivo Ligeiro (DCL), em que os sintomas iniciais de perda de memória episódica e de outras capacidades cognitivas passam geralmente despercebidos pelo doente, familiares e pessoas próximas, não interferindo com a realização das rotinas diárias para que se justifique o diagnóstico clínico de demência. Como tal, depreende-se que doentes com DCL sejam mais propensos a progredir para DA.(5)

A DA pode ser subdividida em dois grupos de acordo com a idade de início dos sintomas clínicos. A DA de início precoce (ou familiar) representa cerca de 1 a 5% do total de casos de DA e, normalmente, inicia-se antes dos 65 anos, tendo como etiologia uma predisposição genética (mais de 85% dos casos de DA de início precoce), nomeadamente, mutações autossómicas dominantes ao nível dos genes da proteína precursora de amiloide (APP) e das presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2). Por sua vez, a DA de início tardio (ou esporádica), costuma ter início a partir dos 65 anos, correspondendo a cerca de 95% do total de indivíduos afetados por esta síndrome.(6)

Hoje em dia, sabe-se que os mecanismos fisiopatológicos da DA antecedem, em décadas, o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Os achados histopatológicos mais importantes subjacentes a esta patologia são: os depósitos extracelulares de  $\beta$ -amiloide, também denominados por placas senis, e as tranças neurofibrilares (TNFs) intraneuronais, constituídas por filamentos de proteína tau hiperfosforilada.(7)

Estima-se que em 2050, o número de casos de DA no mundo corresponderá a, aproximadamente, 80 milhões de indivíduos, 43% dos quais se prevê necessitarem de um nível elevado de cuidados.(8) Como tal, o desenvolvimento de biomarcadores capazes de efetuar um diagnóstico preciso e precoce desta doença e rastrear a sua progressão, são uma “peça-chave” uma vez que possibilitam que futuros fármacos capazes de modificar a patologia da DA sejam administrados numa fase inicial e de eficácia comprovada da terapêutica. Porém, a terapêutica farmacológica atualmente disponível para a DA é apenas sintomática e não desacelera, previne ou reverte a progressão da mesma.(9)

De acordo com o *Biomarkers Definitions Working Group*, um biomarcador ou marcador biológico, é uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador dos processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma determinada terapêutica.(10) Estes podem ser encontrados em diferentes tecidos ou fluidos do corpo humano. A análise imunohistoquímica *post-mortem* do tecido cerebral, com evidências significativas da presença de placas senis e tranças neurofibrilares, é necessária para o diagnóstico definitivo da DA. As autópsias ou, raramente, biopsias cerebrais permitem rastrear as alterações fisiopatológicas no cérebro de um doente de Alzheimer, mas não são apropriadas para análises de rotina. Por sua vez, o líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido muito útil no que compete ao diagnóstico da DA, pois devido ao seu contato direto com o cérebro, reflete os processos metabólicos que lá ocorrem. Contudo, a sua utilização é limitada devido ao método de colheita invasivo por punção lombar. As medições no plasma e soro são consideradas *gold standard* nos laboratórios de análises clínicas, uma vez que são minimamente invasivas e, portanto, facilmente colhidas e processadas. A sua principal vantagem assenta no facto dos doentes poderem ser monitorizados através de análises de rotina, durante vários anos. Porém, os biomarcadores presentes neste fluido apresentam pequenas variações muito heterogéneas, não tendo necessariamente a ver com a DA.(11)(12)

Por conseguinte, com a elaboração desta monografia pretende-se fazer uma revisão bibliográfica das características dos biomarcadores da DA já validados e também dos que ainda se encontram em fase de estudo, e ilustrar o seu papel e importância no diagnóstico



precoce desta síndrome. Para tal, foi realizada uma pesquisa bibliográfica entre Setembro de 2014 e Janeiro de 2015, tendo-se consultado livros, artigos e *sites* de informação médica. O acesso aos artigos obteve-se através de meios informáticos, tais como: em bases de dados “PubMed” (*US National Library of Medicine National Institutes of Health*), “ScienceDirect”, Google Académico e “B-On” (Biblioteca do conhecimento online – Fundação para a Computação Científica Nacional). Na pesquisa de artigos deu-se preferência aos mais atuais, redigidos em inglês ou português.

## **2. Doença de Alzheimer**

### **2.1 Epidemiologia**

Os casos de demência no mundo eram em 2011 estimados em 33,9 milhões, segundo uns autores, ou em 24 milhões, segundo outros, sendo a maioria relativos à DA.(13)(14) Qualquer que seja o número certo, devido ao rápido envelhecimento da população, a previsão é que vá triplicar nas próximas décadas.(13) As estimativas de prevalência de demência no mundo apontam para valores mais elevados nalguns países asiáticos e na América Latina e mais baixos na Índia e na África subsariana (embora os estudos nestas regiões sejam considerados menos fiáveis). As previsões são para que o número de pessoas atingidas com demência (essencialmente doença de Alzheimer e demência vascular, pois a soma das duas representa habitualmente 90% do total dos casos de demência) cresça progressivamente, à medida que aumenta a esperança média de vida no mundo.(15) As estimativas sobre o número de casos de DA no mundo para 2050, são de 1 em cada 85 indivíduos, 43% dos quais se prevê necessitarem de um nível elevado de cuidados. São números assustadores e que deverão impelir a sociedade e cada um de nós a fazer o seu melhor na sua prevenção e diagnóstico precoce.(8)

Num estudo levado a cabo no âmbito do projeto EuroCoDe (*European Collaboration on Dementia*), promovido e financiado pela Comissão Europeia e coordenado pela *Alzheimer Europe*, com a finalidade de determinar a prevalência da demência na Europa, foi demonstrado que neste continente existem mais de 7,3 milhões de pessoas com demência. Prevê-se também que face ao envelhecimento da população nos estados-membros da União Europeia, estes números deverão duplicar nas próximas décadas na Europa Ocidental, e triplicar na Europa de Leste. Todos os anos, 1,4 milhões de cidadãos europeus desenvolvem demência, o que significa que a cada 24 segundos um novo caso é diagnosticado.(16) Em Portugal, os mais recentes dados epidemiológicos apontam para a existência de 153 mil pessoas com demência, das quais 90 mil têm DA. Ou seja, cerca de 1% da população nacional sofre desta síndrome.(17)

A prevalência da DA segue a curva do envelhecimento: cerca de 1% até aos 65 anos, 5% entre os 65-70 anos e até mais de 30% aos 80 anos. O que, em grande parte, dificulta o diagnóstico, atribuindo-se muitas das vezes os sintomas ao próprio envelhecimento.(16)

Em suma, a maior frequência da DA com o envelhecimento, associado à longa duração desta doença, é um dos grandes responsáveis pela elevada prevalência mundial desta patologia. Deste modo, a idade apresenta-se como o fator de risco mais importante no desenvolvimento desta síndrome, contribuindo para que a mesma constitua um problema de Saúde Pública de grande impacto nas próximas décadas.(6)

## **2.2 Manifestações Clínicas**

Quando a DA foi descrita pela primeira vez, pensou-se tratar de uma afeção que atingia apenas um pequeno número de indivíduos relativamente jovens. Nessa altura, considerava-se que o declínio cognitivo nos idosos era parte integrante do processo normal de envelhecimento, causado por aterosclerose das artérias cerebrais. Mais tarde, estudos neuropatológicos vieram transformar essa visão afirmando que o processo patológico associado à DA era comum também em idosos.(1)

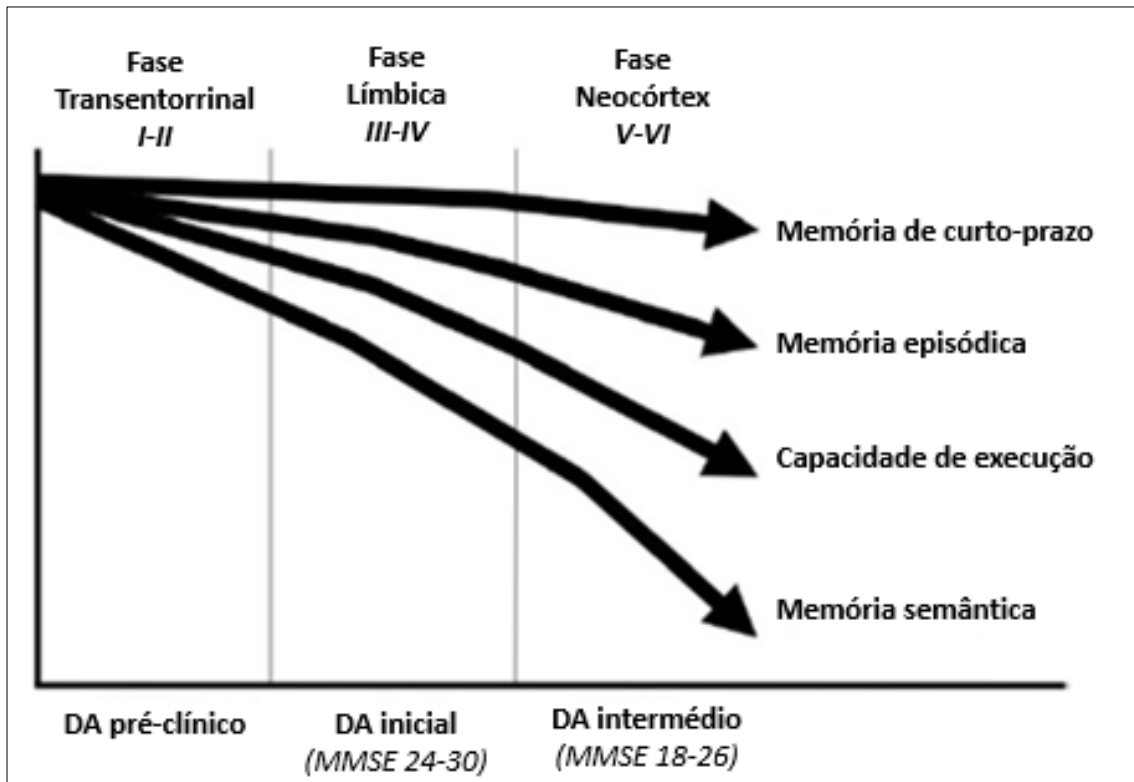
Apesar do início dos sintomas de DA ser bastante variável, esta é normalmente subdividida em DA de “início precoce” e DA de “início tardio”. Ambas apresentam semelhantes achados neuropatológicos e sintomas clínicos, diferindo apenas na idade em que estes se iniciam.(6)

A DA de “início precoce” ou familiar, é essencialmente causada por mutações autossómicas dominantes nos genes das proteínas APP, PSEN1 ou PSEN2, e constitui apenas 1-5% do total de casos de DA. Inicia-se sempre antes dos 65 anos e os sintomas progridem mais rapidamente. Esta forma de DA é relativamente fácil de se diagnosticar, uma vez que os sintomas subjacentes diferem da maioria dos sintomas característicos das doenças mais frequentes nestas faixas etárias.(6)(18)

Quanto à DA de “início tardio” ou esporádica, os doentes começam normalmente a exibir sintomas após os 65 anos, embora em doentes cujo alelo ApoE ε4 esteja presente os sintomas tendam a manifestar-se ligeiramente mais cedo, entre os 60 e 70 anos. Acredita-se também que 60-80% dos casos neste tipo de DA sejam determinados geneticamente.(19)(20) Também nesta forma de DA se sabe que o processo patológico se inicia duas a três décadas antes do aparecimento de qualquer sintoma clínico. Ou seja, e de acordo com um estudo, um doente de Alzheimer que morra aos 75 anos terá 5-10% de probabilidade de ser diagnosticado *antemortem* (avaliação clínica), e 20-40% de probabilidade de ser detetado com a patologia característica da DA aquando de um

diagnóstico histopatológico *postmortem* (autópsia). A esperança de vida destes doentes, após diagnóstico clínico, pode chegar aos 20 anos, mas é em média de 8 anos.(12)(21)

Os doentes de Alzheimer não sofrem os mesmos sintomas pela mesma ordem, ou pelo mesmo nível de gravidade. No entanto, existe um padrão geral de evolução da doença que permite descrever e ordenar os seus principais estádios. O modelo de *Braak&Braak* subdivide a progressão das alterações neuropatológicas características da DA em seis estádios, e correlaciona-as com os sintomas clínicos subsequentes (figura 2.1).(22)



**Figura 2.1.** Representação esquemática da correlação entre a progressão clínica e o processo patológico da Doença de Alzheimer de acordo com o Modelo de Braak&Braak. Adaptado de *Braak*.(22)

A fase pré-clínica da DA (assintomática) é normalmente semelhante aos estádios I-II de *Braak&Braak*, ou fase transentorrinal. Nesta fase já existe uma perda neuronal gradual em estruturas do sistema límbico, como o hipocampo, córtex entorrinal e transentorrinal, núcleo basal de Meynert e amígdala, que como referido anteriormente, se estima que tenha início cerca de 20 a 30 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. A perda de neurónios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, responsável pela perda de inervação colinérgica cortical, é um dos mecanismos fisiopatológicos desta doença e também o principal alvo terapêutico até ao momento.(22)(23)

Este período assintomático é frequentemente finalizado por um início insidioso de declínio da memória episódica, justificado neuropatologicamente pela severa lesão que

se verifica sobretudo no córtex entorrinal e hipocampo. Esta nova fase corresponde aos estádios III-IV de Braak&Braak, também denominada por fase límbica. O doente ainda não pode ser diagnosticado clinicamente como “demente”, uma vez que a sua incapacidade de funcionamento social ainda não é grave. Contudo, os problemas de memória começam-se a agravar, a aprendizagem de algo novo torna-se numa tarefa cada vez mais árdua e trabalhar requer cada vez mais esforço e tempo, o que pode desencadear problemas paralelos de *stress*, irritação e depressão. As recordações recentes encontram-se enfraquecidas e o doente deverá então ser remetido a um médico por parte de um familiar, amigo ou cuidador. Em termos clínicos, diz-se que nesta fase o doente sofre de Défice Cognitivo Ligeiro (DCL), sendo que a etiologia dos sintomas permanece uma incógnita. Caso se verifique que a etiologia dos sintomas tenha resultado dos processos patológicos característicos da DA, a esta fase dá-se o nome de DA prodrómica. Progressiva e lentamente, o défice cognitivo começa a interferir nas rotinas diárias, tornando-se aos poucos um desafio para os doentes manterem tarefas como: as finanças sob controlo, seguir instruções no trabalho, conduzir veículos, fazer compras e manter o lar, podendo em alguns casos ocorrer anosognosia, em que o doente não tem consciência destas alterações. O doente experimenta também estados de confusão com alterações no seu meio envolvente que levam a que este se perca a andar ou a conduzir. (2)(22)(23)

Quando o diagnóstico clínico de DA é finalmente estabelecido, o processo neuropatológico encontrar-se normalmente nos estádios V-VI de Braak&Braak, também chamada de Fase do Neocórtex. Nesta fase, o córtex entorrinal e o hipocampo encontram-se bastante deteriorados e há também o acometimento do córtex pré-frontal e temporoparietal. O doente torna-se incapacitado para trabalhar, perde-se e confunde-se com facilidade, o que já exige o supervisionamento por parte de um cuidador. Há um comprometimento progressivo da linguagem, compreensão e fluência verbal. Ocorre também afasia, circunlocução e apraxia. Esta última, quando aparece, impede os doentes de executar tarefas motoras sequenciais. À medida que a doença progride e os neurónios vão sendo destruídos, ocorre uma atrofia neocortical geral, que conduz a um declínio mais acentuado nos domínios cognitivos, em especial na função executiva. Por fim e na fase terminal da doença, o doente perde o discernimento, o raciocínio e as capacidades cognitivas e por vezes experimenta episódios de delírio. O culminar na morte resulta habitualmente de desnutrição, infeções secundárias, embolia pulmonar ou cardiopatia.(2)(22)(23)

### **2.3 Diagnóstico**

O cérebro pode ser examinado na sua função (testes neuropsicológicos), morfologia, ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada (TAC), metabolismo, tomografia por emissão de positrões (PET), atividade elétrica, eletroencefalograma (EEG), e existe ainda a possibilidade de avaliar a presença de dano cerebral através da análise clínica de biomarcadores no LCR ( $A\beta$  e tau) ou realizar testes genéticos, tais como, genotipagem da apolipoproteína E (ApoE), proteína precursora de amiloide (APP) e presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2).(24)

De acordo com a norma da Direção Geral de Saúde (DGS) nº053/2011 de 27 de Dezembro de 2011, os critérios de diagnóstico de demência mais utilizados são os propostos no *Diagnostic and Statistical Manual*, 4ª edição revista (DSM-IV-TR) e os definidos na *International Classification of Diseases* (CID-10). Para o diagnóstico de Déficit Cognitivo Ligeiro (DCL) existem também diversos critérios, sugerindo-se os propostos pelo *European Alzheimer's Disease Consortium* ou os mais recentes do *National Institute on Aging and Alzheimer's Association* (NIA-AA).(25) Existem também critérios para o diagnóstico específico das formas mais prevalentes de demência.

No caso da Doença de Alzheimer referem-se os critérios de diagnóstico da DSM-IV-TR e os propostos pelo NIA-AA, revistos recentemente.(25)(26) O grupo de trabalho responsável pela revisão destes critérios tentou assegurar a sua aplicação quer por profissionais de saúde, muitas vezes sem acesso a testes neuropsicológicos, testes laboratoriais e técnicas avançadas de imagiologia, quer por investigadores especializados, envolvidos em pesquisas científicas ou ensaios clínicos e com acesso a estas tecnologias mais avançadas. Para tal, o grupo subdividiu o termo DA em “DA provável”; “DA possível” e “DA provável com evidência do processo fisiopatológico”. Sendo que os dois primeiros conceitos pretendem ser usados em contexto clínico e o terceiro em contexto de investigação.(26)

Segundos os autores, os principais critérios utilizados no diagnóstico clínico de demência implicam um declínio cognitivo e comportamental, detetáveis através da combinação da história clínica do doente e avaliação cognitiva objetiva (exame ao estado mental ou teste neuropsicológico), que interferem com a capacidade de trabalho e execução das atividades diárias do doente e não são justificáveis por delírios ou outras desordens psiquiátricas. Referem também que a diferença entre demência e DCL assenta

no facto do declínio cognitivo ter ou não uma interferência significativa na capacidade do doente em trabalhar e executar as suas rotinas diárias.(26)

A DA provável é diagnosticada quando o doente cumpre os critérios de demência e, em adição, apresenta: história clara de um início insidioso em que os sintomas clínicos apresentam uma evolução gradual; agravamento cognitivo comprovado e sem evidências de patologias concomitantes, tais como, doenças cerebrovasculares, neurológicas, etc. No caso da DA provável com evidência do processo fisiopatológico, os critérios são os mesmos com o acréscimo de análises clínicas a biomarcadores, que refletem de certa forma o processo patológico da DA, de modo a minimizar o erro de diagnóstico.

No caso da DA possível, é também diagnosticada quando o doente cumpre os critérios de demência, mas apresenta um início repentino dos sintomas clínicos ou há a evidência da presença em simultâneo de outras patologias, neurológicas ou não-neurológicas, ou uso de medicamentos com efeitos substanciais no domínio cognitivo.(26)

### **2.3.1 Avaliação Clínica e Neuropsicológica**

É sabido que os mecanismos fisiopatológicos inerentes à DA conduzem gradualmente a uma perda neuronal gradual e destruição das sinapses em regiões do cérebro responsáveis pela memória e funcionamento cognitivo e, posteriormente, levam a alterações nestes domínios cognitivos.

A avaliação neuropsicológica é uma peça fundamental no diagnóstico diferencial da demência, pois os diferentes quadros demenciais apresentam algumas características específicas. Nesta devem constar, a avaliação da capacidade visuoespacial (teste do desenho do relógio), memória episódica, linguagem, atenção, velocidade de processamento e função executiva.(26)

Existem diversos testes para realizar esta avaliação, entre os quais se destacam: o *Mini Mental State Examination* (MMSE) e o *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA).(27) O MMSE é um teste simples que contém algumas perguntas sobre funções cognitivas básicas, tais como: orientação, atenção, cálculo, memória de curto-prazo, linguagem e construção visuo-espacial. Não avalia funções executivas nem memória a longo-prazo.(28) Para colmatar algumas falhas que existem no MMSE, foi desenvolvido outro teste cognitivo, o MoCA. Este teste tem a capacidade de avaliar um maior número de áreas cognitivas, apresentando tarefas mais complexas, em comparação ao teste anterior. Nele são avaliados oito domínios cognitivos: memória a longo-prazo, aptidões visuo-

espaciais, funções executivas, atenção, concentração, memória de curto-prazo, linguagem e orientação. O facto de ser um teste mais sensível a alguns parâmetros permite que seja mais eficaz a detetar casos de DCL, por exemplo.(29)

Internacionalmente são também usadas essencialmente duas escalas clínicas, a *Clinical Dementia Rating Scale* (CDR) e a *Global Deterioration Scale* (GDS), que avaliam qualitativamente a progressão da doença, com base em entrevistas clínicas aos doentes e aos seus acompanhantes. A escala GDS define sete estádios – Estádio 1: sem declínio cognitivo; Estádio 2: declínio cognitivo muito ligeiro; Estádio 3: declínio cognitivo ligeiro; Estádio 4: demência em estágio inicial; Estádio 5: demência em estágio moderado; Estádio 6: demência moderada; Estádio 7: demência grave. Por sua vez, a escala CDR define cinco parâmetros: CDR-0: sem défice cognitivo; CDR-0,5: défice cognitivo ligeiro (DCL); CDR-1: demência ligeira; CDR-2: demência moderada; CDR-3: demência grave.(30)(31)

### **2.3.2 Biomarcadores no diagnóstico**

Como referido anteriormente, o diagnóstico definitivo da DA apenas pode ser realizado *post mortem*, por análise histopatológica do tecido cerebral durante a autópsia, ou, muito raramente, através de uma biópsia cerebral. Este exame deve revelar evidências significativas da presença dos biomarcadores histopatológicos característicos da DA, ou seja, depósitos extracelulares de A $\beta$  e tranças neurofibrilares, resultantes da acumulação intracelular de proteína tau hiperfosforilada (P-tau).(32)

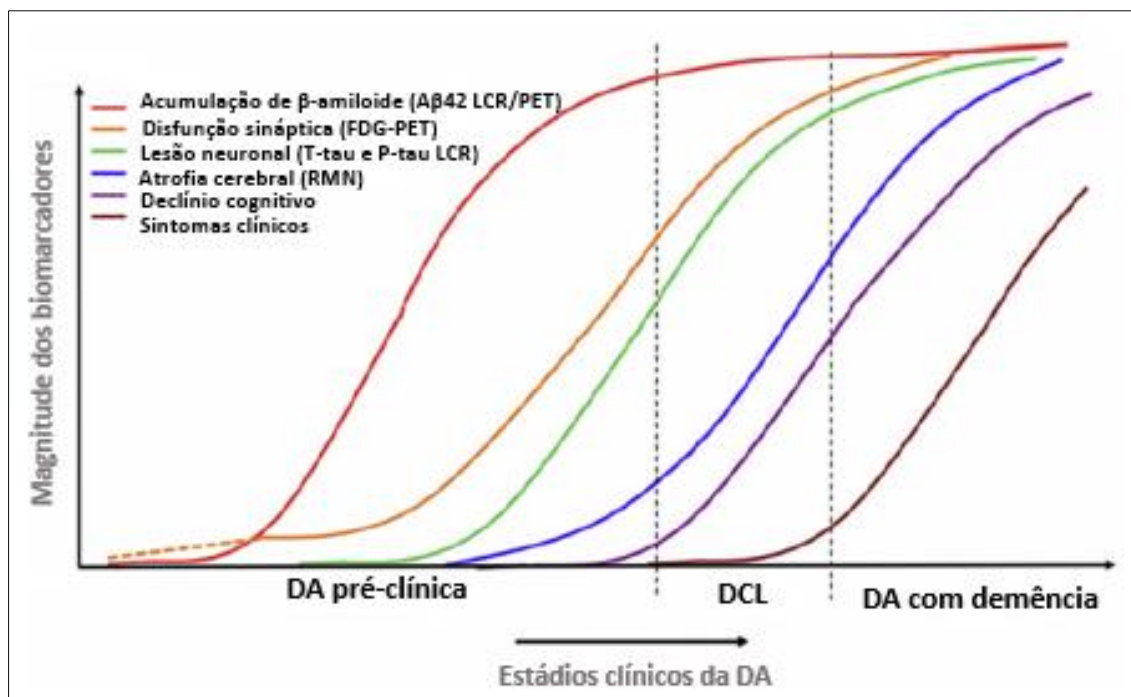
A importância do diagnóstico precoce da DA explica-se pelo facto de caso apareça uma terapêutica capaz de modificar a patologia inerente a esta doença, a eficácia da mesma será maior quanto mais cedo for administrada. Nos critérios propostos pelo NIA-AA, como foi referido anteriormente, incluíram a análise clínica de biomarcadores no processo de diagnóstico com a finalidade de aumentar o grau de precisão do diagnóstico numa fase pré-demência.(26)

Atualmente, os principais biomarcadores da Doença de Alzheimer encontram-se divididos em duas categorias, tendo por base a biologia das suas medições. Na primeira categoria encontram-se os biomarcadores de deposição da proteína  $\beta$ -amiloide, tais como: níveis diminuídos de A $\beta$ 42 no LCR e aumento da deposição amiloide identificada na PET-PiB. Na segunda categoria situam-se os biomarcadores de lesão neuronal, tais como: níveis elevados de tau (P-tau e T-tau) no LCR; atrofia das estruturas dos lobos temporais



mesiais (hipocampos) e parietais em RMN e redução do metabolismo de glicose no cérebro, identificado na FDG-PET (em fase de estudo).(11)

Com o objetivo de descrever a relação entre a flutuação nos níveis dos biomarcadores nos diferentes estádios da doença de Alzheimer, propôs-se a divisão da DA em 3 fases diferentes: “DA pré-clínica”; “DCL devido a DA” e “DA com demência” (figura 2.2).(33)



**Figura 2.2.** Modelo hipotético descritivo da relação entre a magnitude dos biomarcadores nos diferentes estádios da Doença de Alzheimer. Adaptado de Jack.(33)

A fase de “DA pré-clínica” encontra-se subdividida em três etapas. Na primeira etapa, os doentes apresentam patologia amiloide, evidenciada pela PET-PiB “positiva” ou pela diminuição dos níveis de Aβ42 no LCR, mas não demonstram sinais de degeneração neuronal, volumetria normal na RMN e níveis normais de tau (T-Tau e P-tau) no LCR. Na segunda etapa, para além da patologia amiloide também se observa degeneração neuronal, evidenciada pelos níveis aumentados de tau no LCR ou por sinais de lesão neuronal em métodos imagiológicos. Por fim, na terceira etapa, os doentes para além de manifestarem as patologias características da DA (deposição amiloide e lesão neuronal), manifestam também um declínio cognitivo subtil, que não é suficientemente grave para ser considerado DCL.(33)(34)

Na fase de “DCL devido a DA”, foi demonstrado que doentes com DCL, acompanhados durante 4 a 5 anos, têm o triplo do risco de progredirem para DA, quando comparados com indivíduos cognitivamente saudáveis. Porém, uma vez que o DCL é uma condição muito heterogênea, estes doentes também podem evoluir para outro tipo de

demências ou permanecer relativamente estáveis. A combinação de baixos níveis de A $\beta$ 42 e níveis elevados de tau no LCR possibilita um diagnóstico discriminativo acurado entre doentes com DCL estável e aqueles com DCL devido a DA, com uma sensibilidade e especificidade de 95% e 83%, respetivamente, após um período de acompanhamento de cinco anos.(35) No mesmo estudo, após mais quatro anos de *follow up* (nove anos desde o início do estudo), verificou-se que mais doentes tinham progredido para DA. A razão A $\beta$ 42/P-tau no início do estudo há nove anos atrás, previu esta progressão com uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 85 a 90%. Doentes com DCL que progrediram para DA nos primeiros 5 anos de *follow up* tinham níveis significativamente mais elevados de tau (P-tau e T-tau) no LCR do que aqueles que progrediram mais tarde. Por sua vez, os níveis de A $\beta$ 42 no LCR entre estes dois grupos de indivíduos era semelhante.(36)

Por último, na fase de “DA com demência”, os níveis de T-tau no LCR são 300% maiores em doentes de Alzheimer do que em indivíduos cognitivamente saudáveis (controlo). Este biomarcador não é específico para a DA e, portanto, níveis aumentados do mesmo podem ocorrer em doentes com outros tipos de demência, doença de Creutzfeldt-Jakob, AVC ou traumatismo craniano.(37) No diagnóstico diferencial entre a DA e outro tipo de demências, a P-tau pode ter um papel importante, uma vez que é mais específica para a DA. Por exemplo, num estudo foram detetados níveis mais elevados de P-tau em doentes de Alzheimer quando comparados com doentes com demência frontotemporal (FTD) e demência com corpos de Lewy (DLB), com especificidades de 92% e 64%, respetivamente.(38)

Vários estudos demonstraram que, a combinação dos três biomarcadores do LCR (A $\beta$ 42, T-tau e P-tau) possibilita realizar um diagnóstico diferencial acurado entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis, com uma sensibilidade e especificidade superiores a 80%.(39) Um estudo em particular, que analisou o desempenho destes três biomarcadores em doentes de Alzheimer de diferentes faixas etárias, verificou que embora a precisão no diagnóstico diminuísse com a idade, a combinação dos valores preditivos destes biomarcadores era suficientemente acurada no diagnóstico de doentes mais idosos.(40) Também se analisou a flutuação nos níveis destes biomarcadores com a progressão/agravamento dos sintomas clínicos da DA, tendo-se concluído que os níveis de A $\beta$ 42 e P-tau permanecem praticamente inalterados ao longo do tempo, enquanto os dados disponíveis para a T-tau se demonstraram inconclusivos. Contudo, os níveis

elevados de T-tau e P-tau parecem estar associados a um aumento da intensidade da doença e também a uma progressão mais rápida da mesma.(41)

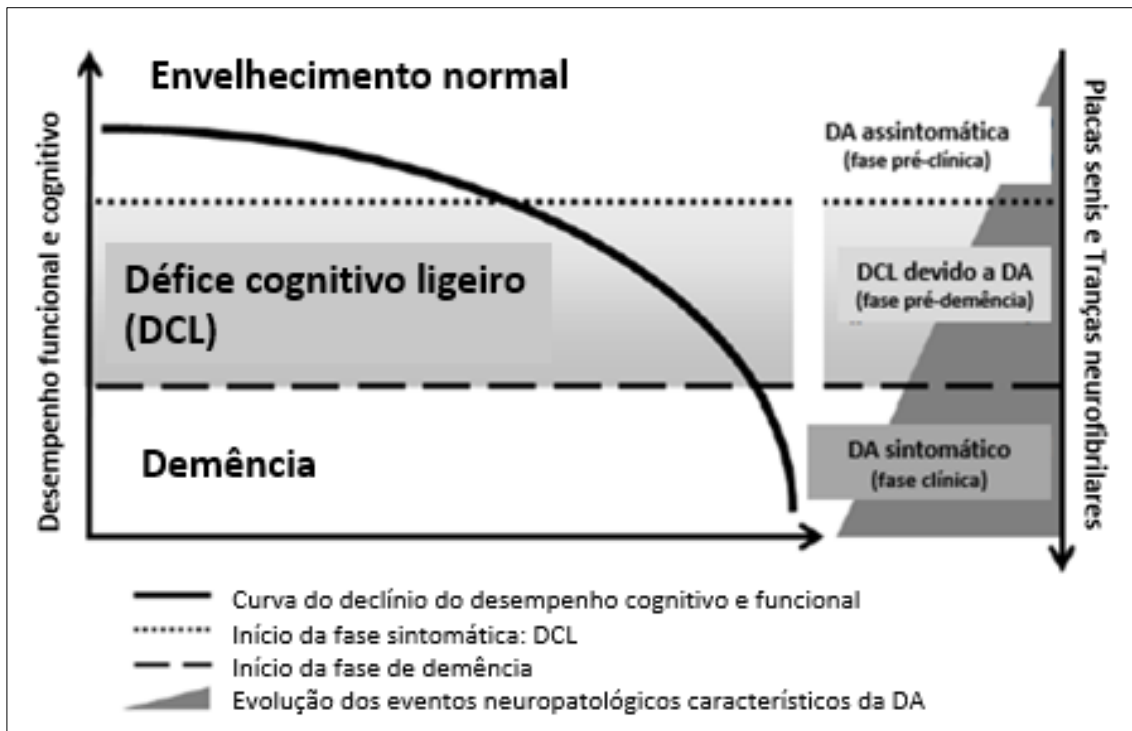
#### **2.4 Défice Cognitivo Ligeiro**

Défice Cognitivo Ligeiro (DCL) é o termo atribuído a doentes com um ligeiro défice cognitivo detetado por critérios clínicos, mas que não provoca comprometimento do seu funcionamento diário. É definido como o estado clínico de transição entre o envelhecimento cognitivo normal e as primeiras manifestações de desordens demenciais, particularmente de DA, embora a transição não tenha obrigatoriamente que ocorrer. Nesta categoria, estão incluídos indivíduos que apresentam défice em pelo menos um domínio cognitivo, geralmente o da memória de curto-prazo, mas, no entanto, continuam a realizar as suas rotinas diárias de forma independente.(5)

Os sintomas mais importantes, notados habitualmente por familiares ou amigos, que o doente pode experienciar são: (42)

- Perda de memória subtil e anormal para a idade: esquecimento frequente de coisas, acontecimentos importantes e compromissos ou eventos sociais;
- Perda de uma linha de raciocínio;
- Aprisionamento mental na tomada de decisões e planeamento de etapas para realização de uma tarefa, ou na interpretação de instruções;
- Dificuldade em encontrar o caminho de volta para casa, ou sítios familiares ao doente;
- Impulsividade e agitação;
- Diminuição do sentido crítico.

A probabilidade dos indivíduos com DCL virem a desenvolver demência é 5 a 10 vezes maior do que a dos indivíduos cognitivamente saudáveis. Muitos indivíduos com DCL que eventualmente poderão vir a evoluir para DA durante alguns anos permanecerão neste estado intermédio, ou seja, um diagnóstico de DCL significa que o doente continua capaz de ser independente e autónomo na maioria das situações (figura 2.3).(5)(43)



**Figura 2.3.** Progressão dos sintomas cognitivos e funcionais durante a transição de Défice Cognitivo Ligeiro (DCL) para Doença de Alzheimer (DA). Adaptado de Forlenza.(43)

Segundo a revisão “*Key Symposium: MCI*” (em inglês, *Mild Cognitive Impairment*) feita em 2003, propõe-se uma classificação para o DCL em DCL amnésico (aDCL) e DCL não-amnésico (naDCL). Os doentes com aDCL apresentam baixa performance nos testes neuropsicológicos de memória episódica. Teremos naDCL quando se observa um fraco desempenho nos testes neuropsicológicos de outros domínios cognitivos que não a memória. Acrescenta-se ainda que o DCL pode restringir-se a um ou estar presente em mais domínios cognitivos, definindo-se assim DCL de domínio único e DCL de múltiplos domínios. Assim sendo, um paciente diagnosticado com DCL deverá pertencer a um destes quatro subtipos:(44)

- I. aDCL, domínio único (apenas a memória está comprometida);
- II. aDCL, domínios múltiplos (comprometimento da memória e outros domínios da cognição);
- III. naDCL, domínio único (comprometimento de um domínio que não a memória);
- IV. naDCL, múltiplos domínios (comprometimento de outros domínios que não a memória).

Num estudo mais recente do NIA-AA, propõe-se o termo “DCL devido a DA”, que se refere à fase sintomática de pré-demência da DA. Com recurso aos dois principais biomarcadores da DA, que preveem a progressão de DCL para DA, o DCL pode ser classificado em três categorias:

- A. “DCL devido a DA” probabilidade intermédia;
- B. “DCL devido a DA” elevada probabilidade;
- C. “DCL devido a DA” improvável.

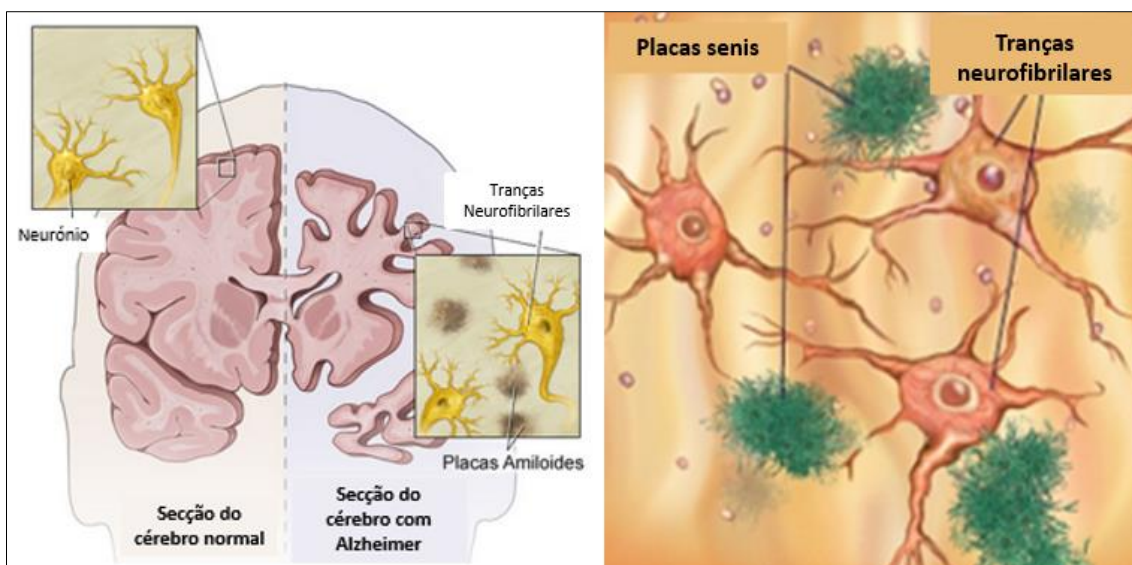
A combinação da informação dada por estes dois biomarcadores permite medir a possibilidade de identificar os casos de DCL com potencial de evoluir para DA, ou seja, casos de DCL, cuja fisiopatologia de base é a da DA (Quadro 2.1).(44)(45)

**Quadro 2.1.** Classificação do Défice Cognitivo Ligeiro de acordo com a sua probabilidade de progressão para Doença de Alzheimer, dada pela combinação de resultados dos dois principais biomarcadores desta doença.(45)

<b><u>“DCL devido a DA”</u></b>	<b><u>Marcadores de deposição A<math>\beta</math></u></b>	<b><u>Marcadores de lesão neuronal</u></b>
<b>Probabilidade intermédia</b>	Positivo	Não testado
	Não testado	Positivo
<b>Alta probabilidade</b>	Positivo	Positivo
<b>Improvável</b>	Negativo	Negativo

## **2.5 Fisiopatologia**

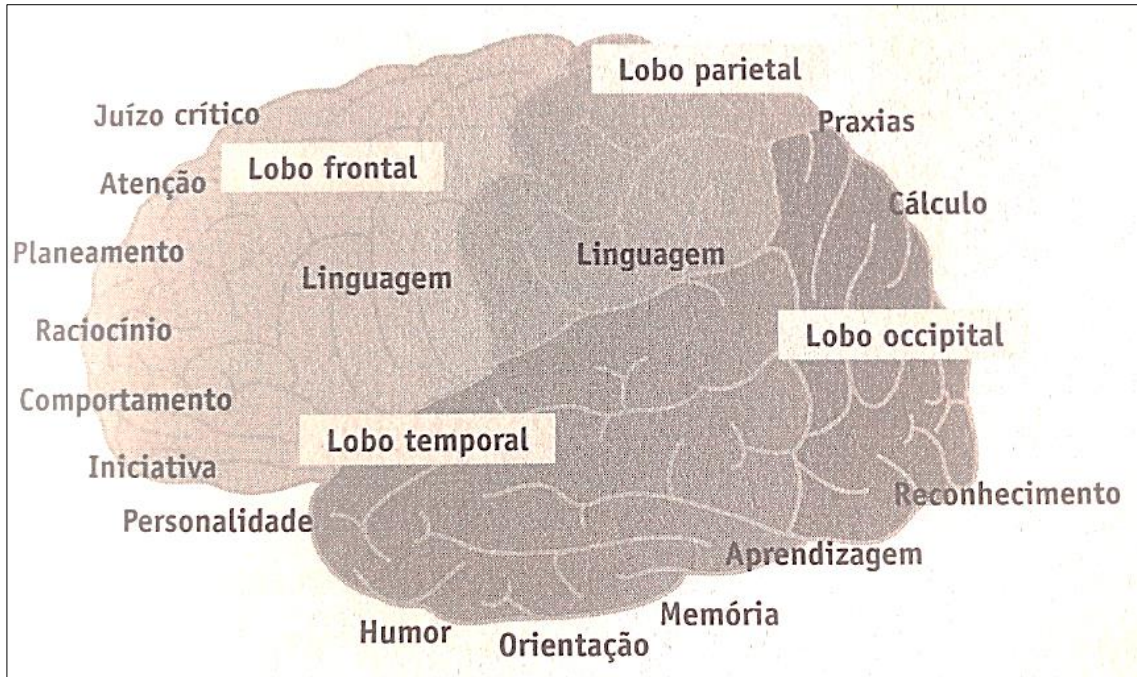
A doença de Alzheimer manifesta características fisiopatológicas específicas no cérebro, que permitem o seu diagnóstico. Os achados histopatológicos mais importantes subjacentes a esta patologia são: as placas de amiloide extracelulares, também denominadas por placas senis ou placas neuríticas, e as tranças neurofibrilares (TNFs) intracelulares (figura 2.4). Ao contrário das tranças neurofibrilares, o aparecimento de placas senis em grandes quantidades é considerado uma característica específica da DA.(7)(46)



**Figura 2.4.** Principais achados histopatológicos característicos da Doença de Alzheimer. Adaptado de *Perl*.(46)

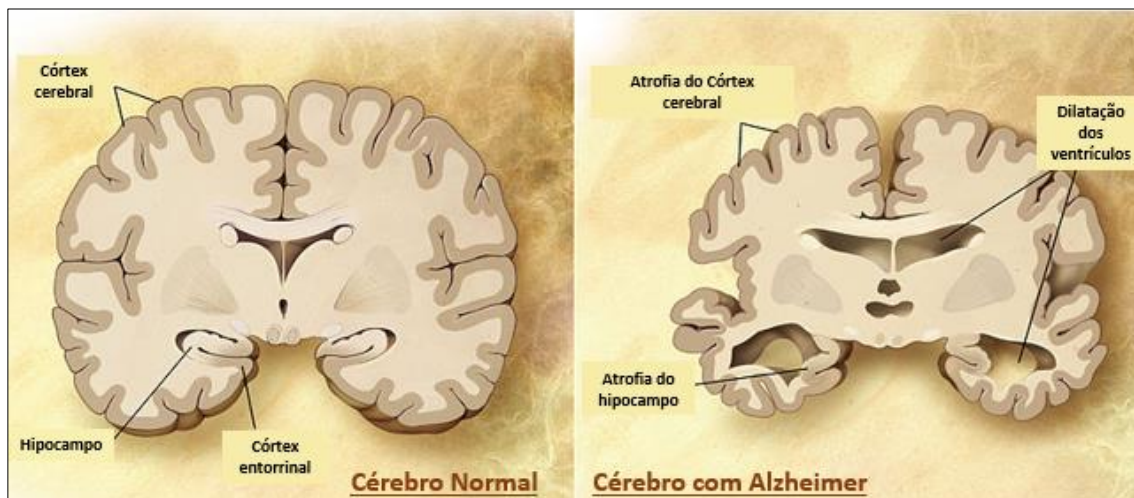
Estas lesões acumulam-se em pequeno número durante o envelhecimento normal do cérebro, mas ocorrem em excesso na DA. As primeiras tranças neurofibrilares surgem habitualmente no chamado córtex entorrinal, progridem para outras áreas límbicas corticais e finalmente atingem o neocórtex. Por sua vez, as placas neuríticas depositam-se em maior número nos lobos temporais e occipitais, numa quantidade intermédia nos lobos parietais e menor nos lobos frontais e córtex límbico. Deste modo, encontramos também uma progressão dos sintomas clínicos em função da área cerebral atingida. Os primeiros sintomas são habitualmente esquecimentos, relativos a memórias imediatas, função que se localiza nas regiões internas dos lobos temporais. A desorientação espacial é também relativamente frequente nas fases iniciais, e relaciona-se com a disfunção nos lobos occipitais e parietais (figura 2.5).(47)(48)





**Figura 2.5.** Localização das funções cognitivas no córtex cerebral. Adaptado de *Netter*.(48)

Pensa-se que estas anomalias conduzem à ativação de cascatas neurotóxicas, processos inflamatórios (tais como astrogliose e ativação da micróglia), mudanças citoesqueléticas que eventualmente acabarão por causar uma redução da densidade das sinapses, perda de neurónios e degenerescência vacuolar dos neurónios principalmente nas zonas do córtex e hipocampo. A nível macroscópico, recorrendo a exames de imagiologia (em especial, RMN), a perda de neurónios, principalmente nas regiões do hipocampo e córtex, apresenta-se como uma atrofia significativa nessas regiões, para além da dilatação simétrica dos ventrículos laterais (figura 2.6).(43)(49)(50)



**Figura 2.6.** Principais características morfológicas macroscópicas da doença de Alzheimer. Adaptado de *Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging*.(50)

As placas senis são depósitos extracelulares constituídos por um núcleo central de proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) rodeado por astrócitos, micróglia, macrófagos, neurites distróficas, apolipoproteína E,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina e outras proteínas. Resultam da deposição e acumulação anormal do péptido  $\beta$ -amiloide, maioritariamente as isoformas  $A\beta$ 40 e  $A\beta$ 42.(46) A  $A\beta$  é um péptido com 39 a 42 aminoácidos que resulta da proteólise da proteína precursora amiloide (APP), regulada pelas enzimas  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases. Uma vez que a isoforma  $A\beta$ 42 é mais propensa a agregar e formar oligómeros, dadas as suas características mais hidrofóbicas, e embora represente apenas 10% de todo o  $A\beta$  produzido, vai ocorrer em maior abundância nas placas senis.(51)

A classificação morfológica das placas senis baseia-se na sua coloração não-específica com corantes específicos para conformações em folha- $\beta$ , tais como: Tioflavina-T (Th-T) e Vermelho do Congo.(52) É através deste ensaio histopatológico que, atualmente, se realiza o diagnóstico definitivo *post-mortem* da DA. Os depósitos de  $A\beta$  quando corados pelo Vermelho do Congo adquirem uma aparência vermelho-alaranjada na microscopia de luz e produzem birrefringência quando observada à luz polarizada, que resulta da disposição ordenada do corante nas fibrilhas amiloides. Por sua vez, a tioflavina-T produz uma fluorescência amarelo-esverdeado. A Th-T é uma sonda fluorescente bastante utilizada como método de deteção de agregados de  $A\beta$  em solução. A utilização desta sonda permite determinar se esses agregados são ordenados (placas neuríticas) ou não (placas difusas). Tal propriedade advém do facto da tioflavina-T, na ausência de placas neuríticas, ter propriedades ótimas de emissão a 445 nm e de excitação a 385 nm, mas na presença destas placas, quando excitada a um comprimento de onda de 450 nm, ocorre uma alteração na estrutura desta sonda, alterando o máximo de emissão para os 482 nm.(53) Embora se saiba pouco acerca do mecanismo de interação desta sonda com as placas neuríticas, alguns estudos defendem que o aumento de fluorescência observado na presença destes agregados de proteína  $A\beta$  ordenada, não se deve à ligação regular de muitas moléculas de Th-T, mas sim à limitação do espaço físico disponível para a Th-T e consequente restrição da sua dinâmica molecular.(54) Desta forma, a presença de placas neuríticas, constituídas tanto por  $A\beta$ 42 como por  $A\beta$ 40, costuma ocorrer juntamente com neurites distróficas, astrócitos reativos, ativação da micróglia, estando associados à perda sináptica e ao declínio cognitivo, e como tal, a acumulação excessiva destas placas é considerada uma característica específica da DA. Pelo contrário, as placas difusas são depósitos amorfos de  $A\beta$  que costumam ocorrer numa fase precoce da DA mas também no cérebro de idosos saudáveis, sendo formadas essencialmente por



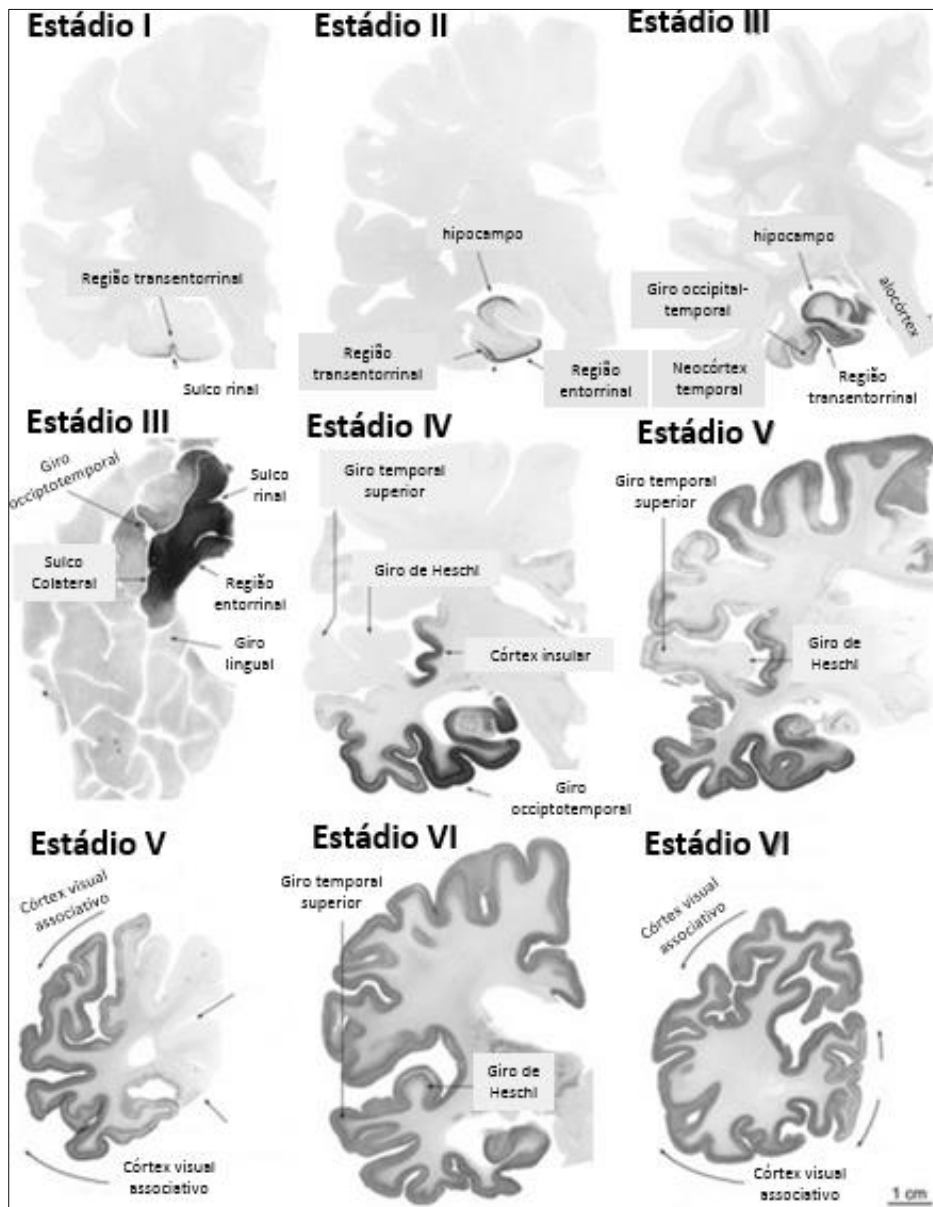
A $\beta$ 42, e normalmente a sua presença não é acompanhada por ativação da microglia ou perda sináptica, e por isso não são consideradas específicas da DA.(55)

Estima-se que a acumulação de depósitos de A $\beta$  atinja o seu *plateau* aquando do início dos primeiros sintomas cognitivos e não se verifica um agravamento significativo da patologia amiloide à medida que a doença progride.(56) De acordo com estas evidências, chegou-se à conclusão de que, a acumulação de A $\beta$  não se correlaciona com a progressão dos sintomas clínicos da DA.(57) Além disso, a evolução espaciotemporal da patologia A $\beta$  não é tão previsível quanto a das TNFs. Porém, as placas A $\beta$  costumam acumular-se maioritariamente no isocórtex, ao passo que no córtex entorrinal, hipocampo, cerebelo e gânglios da base se acumulam mais tardiamente e em menor extensão.(22) Por outro lado, há também evidências de que a formação de agregados de A $\beta$  não fibrilares e solúveis têm um papel mais importante na cascata neurodegenerativa da DA do que as placas senis (insolúveis).(49)

A proteína tau, abundante no SNC e menos comum noutros locais, facilita a polimerização da tubulina celular, promovendo desta forma a formação dos microtúbulos. É, portanto, importante e necessária à organização e estabilização dos microtúbulos na célula neuronal. Estes, juntamente com neurofilamentos e microfilamentos, constituem o citoesqueleto, uma infraestrutura neuronal que tem como função o transporte axonal de nutrientes, glicoproteínas e outras substâncias e também o de assegurar a manutenção da integridade estrutural do neurónio. A interação da Tau com a tubulina consiste num processo dinâmico regulado pelo balanço entre os estados de fosforilação e desfosforilação desta proteína, gerando mudanças conformacionais que influenciam a sua interação com as proteínas constituintes do microtúbulo. Na DA, ocorre uma hiperfosforilação da Tau o que implica que este processo decorra anormalmente, desestabilizando a estrutura do microtúbulo e, conseqüentemente, levando a um comprometimento do transporte axonal e da integridade estrutural do neurónio.(58)

As tranças neurofibrilares (TNFs) são o outro achado histopatológico importante da DA, embora não sejam específicas para esta doença. São constituídas por filamentos helicoidais de proteína tau hiperfosforilada e localizam-se no citoplasma dos neurónios.(59) Ao contrário da patologia A $\beta$ , a evolução espaciotemporal das TNFs é relativamente previsível. A acumulação das TNFs inicia-se no córtex transentorrinal e entorrinal, e progride para o hipocampo e isocórtex associativo, enquanto as áreas sensoriais, motoras e visuais do isocórtex são as últimas a serem afetadas.

Esta degeneração neurofibrilar encontra-se representada no modelo de Braak&Braak (figura 2.7). Para além disto, alguns estudos verificaram que, a propagação topográfica das TNFs pelo cérebro encontra-se diretamente correlacionada com a patologia clínica da DA, ou seja, com o aparecimento e evolução dos sintomas clínicos.(23)(57) Contudo, apesar desta evidência, ainda não se esclareceu se as TNFs são as causadoras da patologia clínica, ou se estão apenas relacionadas com a perda neuronal.(60)

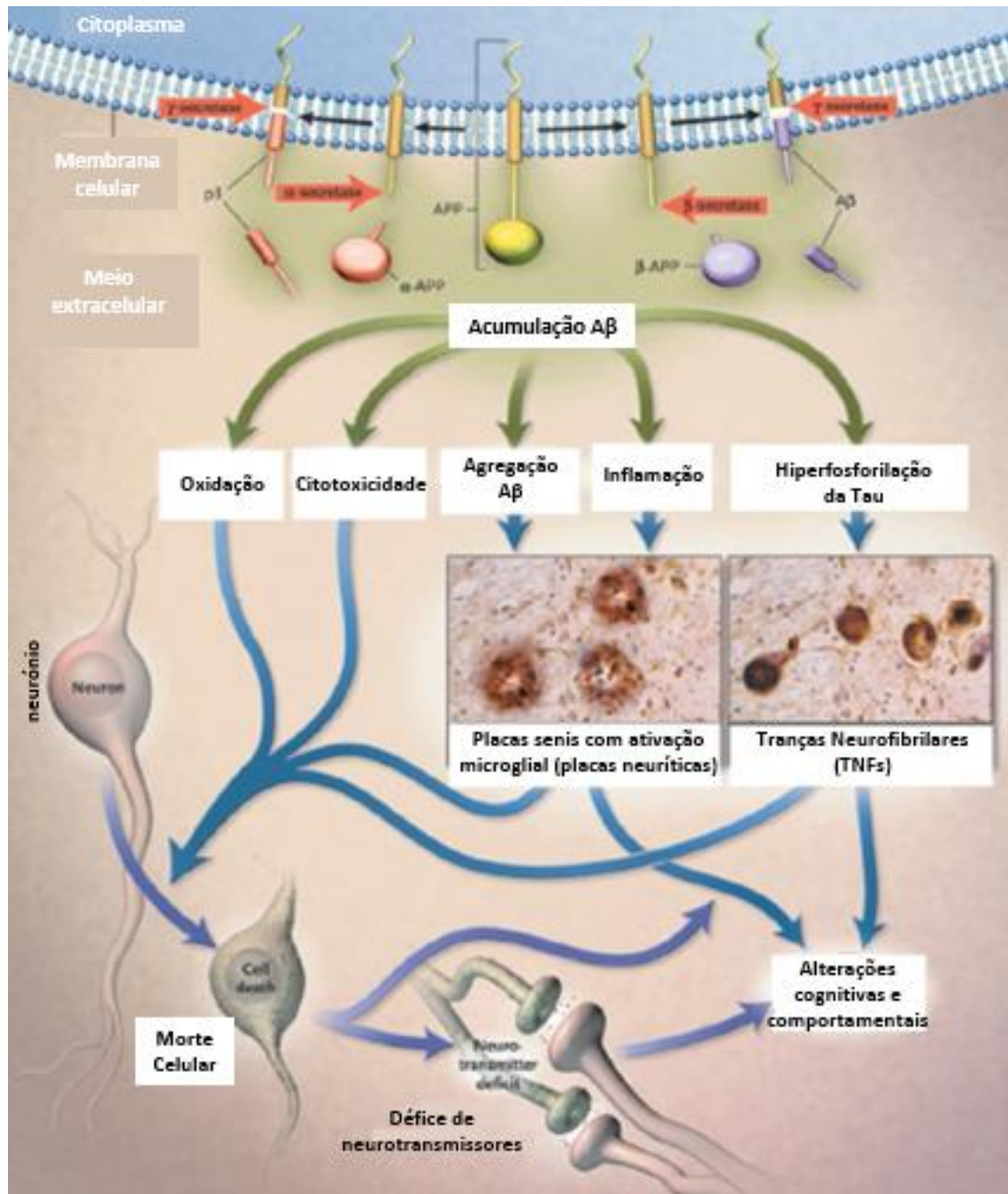


**Figura 2.7.** Progressão da patologia neurofibrilar de acordo com os seis estádios de Braak&Braak. A acumulação de TNFs inicia-se no córtex entorrinal e transentorrinal e progride para o hipocampo antes de se iniciarem os sintomas clínicos (Fase Transentorrinal; estádios I-II). Posteriormente, aumenta a extensão da patologia neurofibrilar na zona do hipocampo, e também atinge o lobo temporal medial, sendo que nesta fase costumam aparecer os sintomas de DCL ou DA (Fase Límbica; estádios III-IV). Finalmente, a patologia das TNFs agrava-se ainda mais na zona do lobo temporal e alastra-se para as áreas do córtex visual associativo (Fase Neocortical, estádios V-VI). Adaptado de Braak.(60)

### **2.5.1 Hipótese da Cascata Amiloide**

O conjunto dos mecanismos fisiopatológicos que estão na base da patologia da DA ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Porém, e embora já tenham sido formuladas várias teorias, a “Hipótese da Cascata Amiloide” é atualmente a teoria globalmente mais aceite (figura 2.8).(61)(62) Esta hipótese foi publicada há mais de duas décadas e defende que a acumulação anormal de proteína  $\beta$ -amiloide no espaço extracelular constitui o primeiro evento na patologia da DA, sendo também responsável por desencadear as alterações fisiopatológicas subsequentes. De acordo com ela, as causas responsáveis pela acumulação exagerada de  $A\beta$  são: mutações nos genes APP, PSEN 1 ou PSEN2, no caso da DA familiar, e defeitos nos mecanismos de produção e *clearance* de  $A\beta$ , no caso da DA esporádica. O aumento dos níveis de  $A\beta$  leva à formação de oligómeros  $A\beta$ , constituídos essencialmente pelas isoformas  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ , e posterior deposição em placas insolúveis. Os oligómeros  $A\beta$  solúveis exibem efeitos tóxicos nas sinapses. Estes eventos desencadeiam uma resposta inflamatória levando à ativação da microglia e recrutamento dos astrócitos. Esta é acompanhada pelo *stress* oxidativo, induzido por uma alteração na homeostasia iónica neuronal, que, por sua vez, altera a atividade das cinases e fosfatases que catalisam então a hiperfosforilação da Tau. Os depósitos de proteína tau hiperfosforilada acumulam-se nos neurónios, levando à formação de tranças neurofibrilares (TNFs). Por fim, estes eventos culminam numa redução da densidade das sinapses e perda gradual de neurónios. (61)(63)

Devido à falta de detalhe, a “Hipótese da Cascata Amiloide” tem atraído muitos críticos, tendo sido sugeridas outras hipóteses na tentativa de explicar os mecanismos fisiopatológicos na origem da DA. Por exemplo, a “Hipótese da Dupla Via” afirma que a acumulação de  $A\beta$  e a formação de tranças neurofibrilares ocorre em paralelo, conduzindo de forma independente à perda neuronal e demência.(64)



**Figura2.8.** Ilustração da Hipótese da Cascata Amiloide. Adaptado de *Christensen*.(62)

Um argumento normalmente apresentado para criticar a “Hipótese da Cascata Amiloide”, baseia-se no facto da quantidade de placas neuríticas não se correlacionar com a progressão do declínio cognitivo. Porém, como referido anteriormente, existe uma boa correlação entre a progressão da patologia neurofibrilar (TNFs) e o declínio cognitivo na DA.(63) Em alguns estudos, surgiu também a evidência de que os oligómeros Aβ solúveis, mas não os monómeros ou fibrilas insolúveis, estão relacionados com a extensão da disfunção sináptica e com os sintomas cognitivos adjacentes.(65) Por exemplo, num

desses estudos verificou-se que oligómeros A $\beta$  solúveis isolados a partir do córtex cerebral de um indivíduo com DA e introduzidos em ratos saudáveis, são capazes de bloquear a potenciação de longa duração (LTP, em inglês *Long Term Potentiation*), que consiste num aumento persistente da força sináptica após estimulação de alta frequência de uma sinapse química, sendo considerado um dos principais mecanismos na base da aprendizagem e memória(66), estimular a depressão de longa duração (LTD, em inglês *Long Term Depression*) e interromper a captação sináptica de glutamato, levando à perda de densidade das sinapses. Por sua vez, as placas de A $\beta$  insolúveis, isoladas a partir dos mesmos doentes de Alzheimer e introduzidas em cérebros de ratos saudáveis, não se mostraram capazes de inibir a LTP, a não ser que fossem primeiramente dissolvidas de forma a libertar os dímeros de A $\beta$  solúveis, que demonstram algum efeito tóxico nas sinapses.(67)

Outro argumento utilizado para criticar a “Hipótese da Cascata Amiloide”, é o facto dos ratos transgénicos para a DA, e com deposição gradual de A $\beta$ , normalmente não apresentarem perda neuronal significativa.(68) Contudo, existem várias explicações plausíveis para este facto, tais como, as diferenças na vulnerabilidade neuronal e nos mediadores inflamatórios entre as duas espécies e também o curto período de exposição dos ratos à patologia A $\beta$ . Na verdade, os ratos transgénicos para a APP humana desenvolvem distrofia neurítica e disfunção sináptica ao longo do tempo, durante aproximadamente dois a três anos, que é a esperança média de vida de um rato de laboratório. Este período de tempo é de facto muito curto para que seja alcançada a perda neuronal induzida pela patologia A $\beta$ .(69)

A relação entre a A $\beta$  e a tau tem sido alvo de diversos estudos com a finalidade de esclarecer os mecanismos fisiopatológicos na base da DA. Existem vários estudos que indicam que a acumulação de A $\beta$  precede a patologia neurofibrilar, e outros que demonstram que a Tau é necessária para mediar a toxicidade de A $\beta$  na patologia da DA. Num desses estudos, demonstrou-se que os neurónios que expressam a proteína tau (humana ou de rato) degeneram na presença de depósitos de A $\beta$ , ao passo que os neurónios onde não se encontra expressa esta proteína são resistentes à degeneração aquando da presença de placas de A $\beta$ .(70) Noutro estudo, foi demonstrado que baixos níveis endógenos de proteína Tau evitam alterações comportamentais em ratos transgénicos para a APP humana, mesmo com níveis elevados de A $\beta$ .(71)

Num estudo com primatas propôs-se identificar o papel das placas de A $\beta$  na fosforilação da proteína tau. Para tal, injetou-se A $\beta$  no córtex cerebral de primatas *Rhesus* envelhecidos, resultando não só numa degenerescência neuronal, como também na indução da fosforilação da Tau nos neurónios situados na periferia do local da injeção. Em suma, estes dados vêm reforçar a capacidade de A $\beta$  induzir a hiperfosforilação da tau, que se deposita no interior dos neurónios levando à formação de tranças neurofibrilares (TNFs).(72)

Todos estes mecanismos moleculares juntamente com outras alterações celulares são responsáveis pelo desencadear de um mecanismo patogénico importante na DA, o *stress* oxidativo (figura 2.9). Este caracteriza-se por um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes que pode ocorrer devido a um excesso de agentes oxidantes, um défice de agentes antioxidantes e/ou a combinação de ambos.(73) A sobreprodução de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) como o anião superóxido (O $_2^-$ ), o peróxido de hidrogénio (H $_2$ O $_2$ ), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO $^-$ ) são responsáveis pelos danos celulares e sinais de apoptose, pois iniciam uma série de reações secundárias entre radicais livres e outras biomoléculas. A presença de radicais livres em excesso é responsável pela indução de uma entrada massiva de cálcio (Ca $^{2+}$ ) no neurónio. O excesso de A $\beta$  induz a formação de concentrações elevadas e não usuais de ROS bem como a depleção de anti-oxidantes endógenos, o que causa dano celular e morte neuronal. Como fator agravante, as placas de  $\beta$ -amiloide contêm metais como cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe) que para além de facilitarem a agregação promovem uma reação com o peróxido de hidrogénio, formando um oxidante forte e radical hidroxilo. As alterações no metabolismo do ferro nas células neuronais são responsáveis por alterações de mecanismos de transdução nessas mesmas células com conseqüente neurodegeneração. As células neuronais não são as únicas intervenientes neste processo e a ativação da microglia também se encontra na base deste *stress* oxidativo.(74)

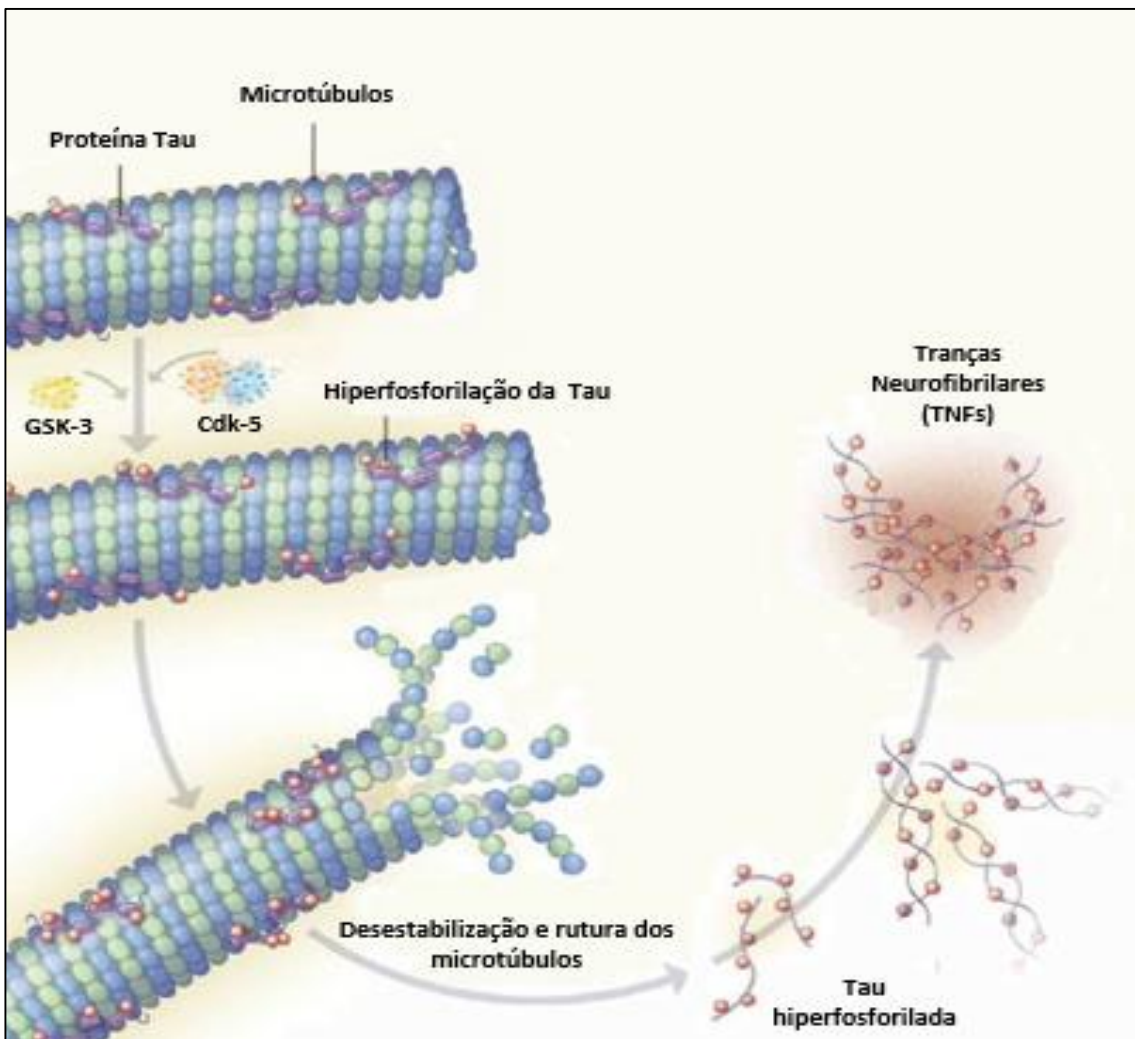




vesículas e organelos por proteínas motoras.(59) A interação da Tau com a tubulina é regulada pelo seu estado de fosforilação. Por sua vez, o balanço entre a atividade das proteínas cinases e fosfatases, regula o estado de fosforilação da Tau.(76)

Assim, os estados de fosforilação da Tau têm um papel muito importante na dinâmica dos microtúbulos. Por exemplo, um estado de hiperfosforilação da Tau, leva a uma menor afinidade entre esta proteína e a tubulina, desencadeando uma destabilização e rutura na estrutura dos microtúbulos, impedindo-os de desempenhar as funções acima mencionadas. Alguns investigadores defendem que este pode ser um dos motivos pelo qual a hiperfosforilação da tau conduz à neurodegeneração na DA.(76)

Na DA, a tau encontra-se hiperfosforilada e, como consequência, começa a destacar-se dos microtúbulos, o que conduz à rutura dos mesmos. A tau hiperfosforilada é insolúvel e, por isso, enrola-se em filamentos helicoidais que se acumulam no citoplasma dos neurónios, levando à formação de tranças neurofibrilares (figura 2.10).(77)



**Figura 2.10.** Hiperfosforilação da proteína Tau e formação das Tranças Neurofibrilares. Adaptado de Henry.(77)



Até ao momento, foram identificados um total de 84 locais possíveis de fosforilação nos seus resíduos de serina, treonina e tirosina. São conhecidas várias cinases que se sabe estarem envolvidas na fosforilação da tau, tais como: a glicogénio sintase cinase-3 (GSK-3); a cinase dependente de ciclina-5 (cdk5); a proteína cinase A (PKA); a proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK II); caseína cinase-1 (CK-1) e proteínas cinases ativadas pelo *stress* (SAPKs).(78) Existem também várias proteínas fosfatases no cérebro. No entanto, as fosfatases 2A e 1, PP-2A e PP-1, respetivamente, são responsáveis por mais de 90% da atividade destas proteínas na regulação do estado de fosforilação da tau, em células de mamíferos. Demonstrou-se que a atividade destas fosfatases se encontra reduzida em cerca de 20% no cérebro de indivíduos com Alzheimer, o que possivelmente contribui para a patologia da tau nesta enfermidade.(79) Sob condições normais, a tau fosforilada contém 2 a 3 mol de fosfato por mol de proteína. Na DA, a tau encontra-se hiperfosforilada, apresentando pelo menos 3 a 4 vezes mais moles de fosfato por mol de proteína.(80)

Para além da DA, as TNFs podem ser observadas noutras doenças neurodegenerativas, tais como: demência frontotemporal com parkinsonismo associada ao cromossoma 17 (FTDP-17) e doença de Pick. Estas últimas são causadas por mutações no gene MAPT, que codifica a tau, e, por isso, designadas por tauopatias. No caso da DA, ainda não se encontrou nenhuma ligação entre esta doença e as mutações no gene MAPT.(76)

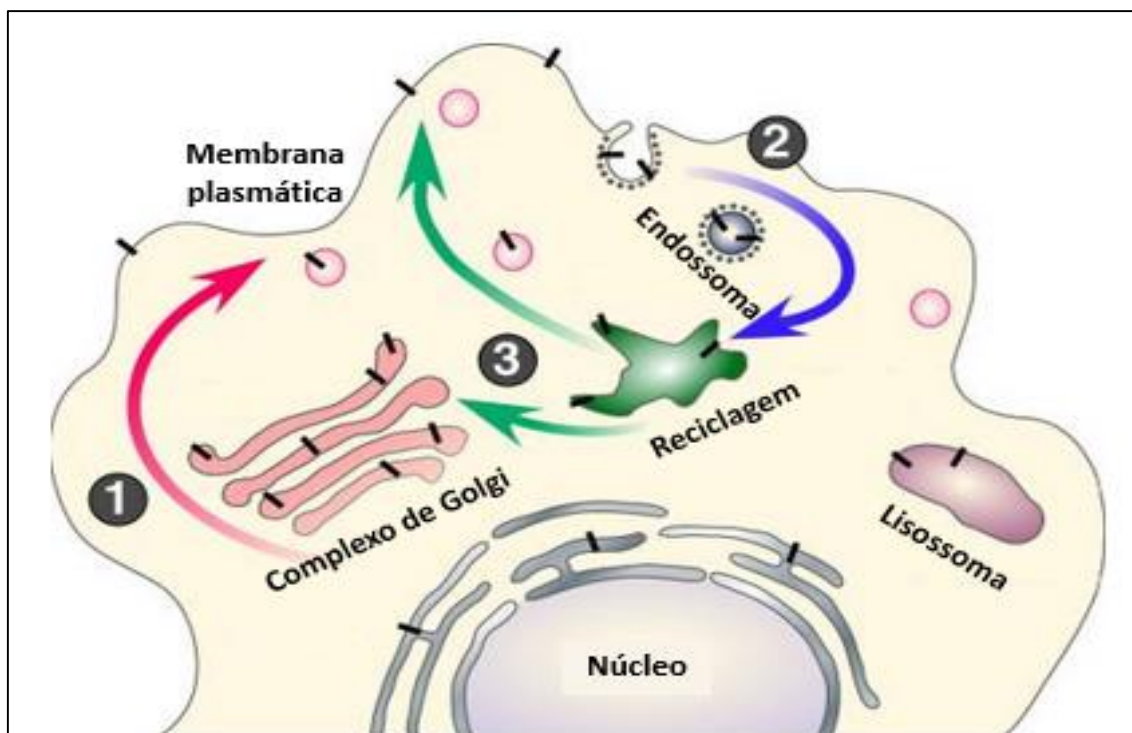
### **2.5.3 Produção de A $\beta$**

Os depósitos de A $\beta$  são as principais características neuropatológicas da DA, distinguindo-a de outros tipos de demência. O péptido A $\beta$  pode conter entre 37 a 43 resíduos de aminoácidos, tem um peso molecular de aproximadamente 4 KDa e resulta da clivagem proteolítica da proteína precursora da amiloide (APP). O gene que codifica a APP, localiza-se no cromossoma 21, tendo sido já identificadas mais de 25 mutações neste gene responsáveis pela DA familiar. Além disso, a duplicação ou triplicação (Síndrome de Down) deste gene, só por si, está na origem da DA de início precoce. O gene da APP pertence a uma pequena família de genes, onde se incluem os genes de proteínas tipo-precursoras amiloide 1 e 2 (APLP1 e APLP2, respetivamente). Todos eles codificam proteínas membranares do tipo I, com um grande domínio extracelular e uma

pequena região citoplasmática. Porém, apenas o gene da APP contém a sequência que codifica o domínio A $\beta$ .(81)

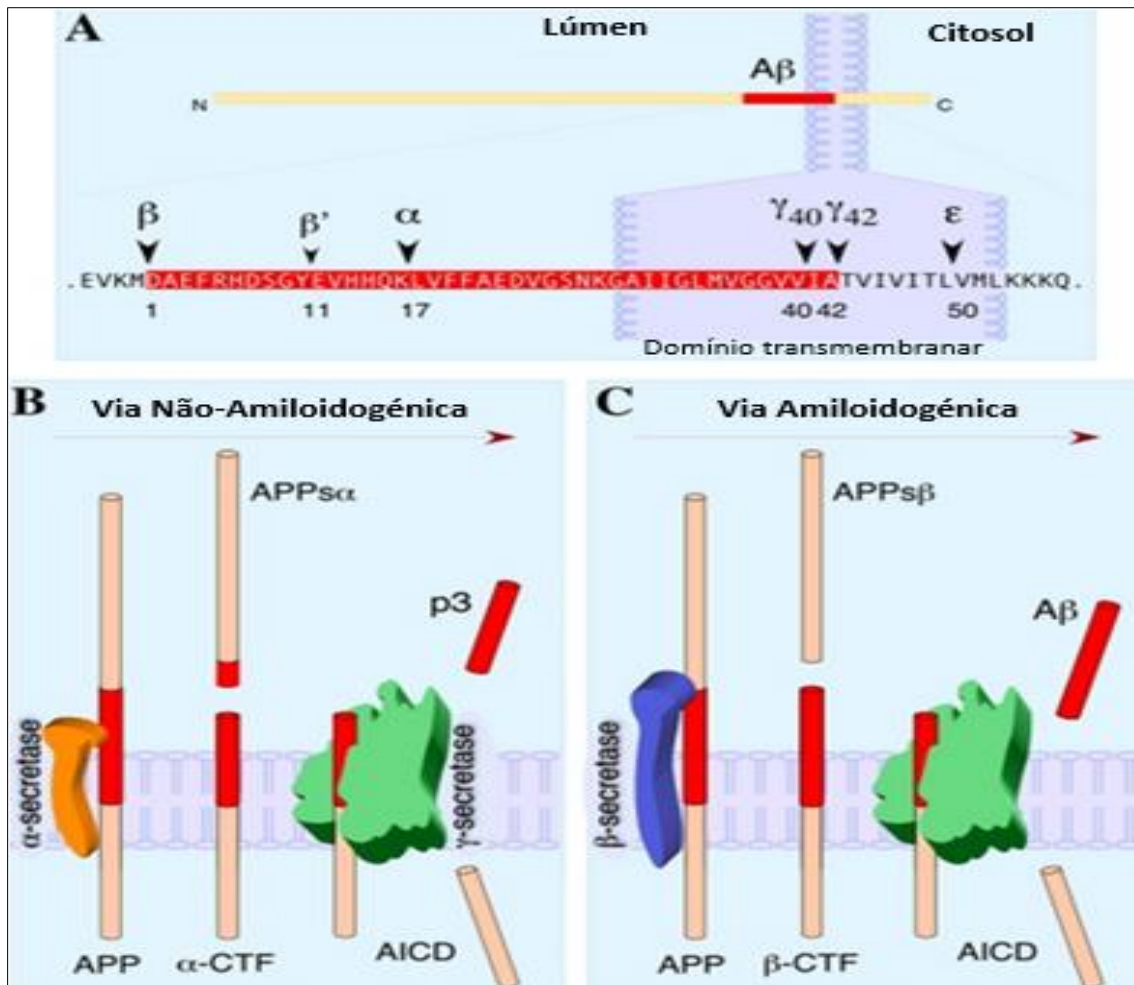
A APP possui três isoformas. A mais curta APP695 encontra-se expressa predominantemente nos neurónios, ao passo que as isoformas APP751 e APP770 estão presentes nos diferentes tecidos em quantidades idênticas. (81)

Nos neurónios, a APP é produzida em grandes quantidades, mas rapidamente metabolizada. Após translação, esta proteína é direcionada para a via secretória constitutiva e durante o seu transporte, em vesículas secretórias, pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi, em direção à membrana plasmática, sofre várias modificações pós-translacionais (maturação), tais como: N- e O-glicosilação, fosforilação e sulfatação dos resíduos de tirosina presentes ao longo da estrutura desta proteína.(82) Com base em modelos de culturas de células, verificou-se que a APP se encontra maioritariamente localizada no complexo de Golgi e que apenas uma pequena percentagem atinge a membrana plasmática, aproximadamente 10%. Nas células neuronais, a APP é internalizada (endocitose) pouco tempo depois de atingir a membrana plasmática, devido à presença da sequência YENPTY perto da região C-terminal desta proteína. Após endocitose, uma pequena fração desta proteína é reciclada de novo para a superfície celular, enquanto uma fração significativa vai sofrer um processo de degradação nos lisossomas (figura 2.11).(82)(83)



**Figura 2.11.** Ilustração da maturação e tráfego intracelular da APP. As barras a preto indicam os locais onde ocorrem os processos de maturação desta proteína. Adaptado de Lee.(83)

Na superfície celular, a APP pode ser processada por três enzimas, denominadas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases. Existem duas vias distintas pelas quais a clivagem proteolítica da APP pode ocorrer: via amiloidogénica e via não-amiloidogénica (figura 2.12).(82)



**Figura 2.12.** Representação da estrutura e processamento proteolítico da APP. Adaptado de Haass.(83)

O péptido A $\beta$  é um produto da via amiloidogénica, que é iniciada por um corte da  $\beta$ -secretase (BACE-1) levando à formação de um ectodomínio solúvel da APP (sAPP $\beta$ ) e um fragmento com a região C-terminal ( $\beta$ CTF ou C99). Em seguida, o C99 é clivado pelo complexo  $\gamma$ -secretase, culminando na libertação do péptido A $\beta$ , que será secretado no espaço extracelular, e do domínio intracelular da APP (AICD), enviado para o citosol. O complexo  $\gamma$ -secretase cliva o domínio transmembranar da APP em múltiplos sítios, dando origem a várias isoformas da proteína A $\beta$ , variando entre os 37 e os 43 aminoácidos. A isoforma A $\beta$ 40 constitui cerca de 90% da A $\beta$  resultante da clivagem proteolítica da APP, enquanto a isoforma A $\beta$ 42 corresponde a menos de 10%. Também foram detetadas quantidades ínfimas das isoformas A $\beta$ 38 e A $\beta$ 37. Por sua vez, na via não-amiloidogénica, a APP é clivada consecutivamente pelas  $\alpha$ - e  $\gamma$ -secretases. O sítio de “corte” da  $\alpha$ -

secretase encontra-se localizado no meio do domínio A $\beta$ , impedindo que se forme o péptido A $\beta$ , resultando num domínio APP $\alpha$  solúvel (sAPP $\alpha$ ) e num fragmento  $\alpha$ CTF ou C83. Posteriormente, o corte pelo complexo  $\gamma$ -secretase liberta um péptido A $\beta$  truncado (p3) e AICD.(82)(83)

Em células não-neuronais, aproximadamente 10% da APP é processada pela via amiloidogénica. Já nos neurónios, pensa-se que o processamento da APP pela via amiloidogénica ocorra com maior frequência, devido à maior abundância de BACE-1.(84)

A  $\gamma$ -secretase consiste num grande complexo enzimático constituído por quatro proteínas integrais de membrana: presenilina 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2, respetivamente); potenciador da presenilina 2 (PEN2); faringe anterior defetiva 1 (APH-1) e nicastrina (NCT). A presenilinas contêm nove domínios transmembranares e dois resíduos aspartil nos domínios 6 e 7, que fazem parte do domínio catalítico do complexo  $\gamma$ -secretase. A presença da PEN-2 é necessária para estabilizar os fragmentos de presenilina do complexo. A NCT e a APH-1 formam o “esqueleto” inicial da  $\gamma$ -secretase, ao qual se ligam, posteriormente, as presenilinas 1 e 2.(85) O complexo  $\gamma$ -secretase cliva o domínio transmembranar da APP em múltiplos sítios, dando origem a várias isoformas da proteína A $\beta$ , variando entre os 37 e os 43 aminoácidos. Foi demonstrado que fármacos pertencentes ao grupo dos Anti-Inflamatórios Não-Esteroides (AINEs) modulam a atividade catalítica da  $\gamma$ -secretase, aquando do processamento da APP, favorecendo a produção da isoforma menos tóxica, A $\beta$ 40, o que pode ter interesse a nível terapêutico.(86)

A BACE-1 (em inglês,  *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme 1*) é a única enzima que corta a APP no sítio  $\beta$ , uma vez que se verificou que o seu bloqueio inibe a via amiloidogénica e, conseqüentemente, a produção de A $\beta$ . Esta  $\beta$ -secretase foi denominada BACE-1 de forma a se distinguir da sua homóloga BACE-2, com baixa expressão no cérebro. Devido ao papel de relevo que desempenha na produção de A $\beta$ , esta  $\beta$ -secretase tem sido estudada como um potencial alvo terapêutico no tratamento da DA. Têm sido desenvolvidas moléculas inibitórias da BACE-1 de forma a diminuir a sua atividade e, conseqüentemente, a produção de A $\beta$ . Porém, dado o vasto espetro de substratos desta proteína, uma inibição excessiva da mesma pode causar graves efeitos secundários.(87)(88)

A BACE-1 encontra-se presente no pâncreas e no cérebro, em particular no córtex cerebral. Em condições normais, esta enzima encontra-se altamente expressa nos neurónios. Porém, vários estudos demonstraram que, sob diferentes condições de *stress* (tais como, privação energética; stress oxidativo; hipoxia; isquemia; apoptose e traumatismo craniano) os seus níveis aumentam drasticamente, aparecendo também expressa nos astrócitos, podendo resultar na produção exacerbada de A $\beta$ .(89)

Os doentes de Alzheimer apresentam níveis elevados de BACE-1 no córtex frontal e temporal, quando comparados com indivíduos cognitivamente saudáveis. Uma vez que na maioria dos estudos realizados, não se observou um aumento nos níveis de mRNA da BACE-1 em doentes de Alzheimer, foi proposto que o aumento dos níveis desta proteína encontra-se associado aos eventos que ocorrem após transcrição.(88)

Quanto ao processamento da BACE-1, é inicialmente sintetizada no reticulo endoplasmático e, em seguida, transportada para o complexo de Golgi, onde ocorre a sua maturação. A proteína BACE-1 madura tem uma atividade catalítica superior à BACE-1 imatura, e um tempo de meia-vida de aproximadamente nove horas. Após maturação, esta enzima pode ser transportada para a membrana celular ou diretamente para os endossomas. Este transporte intracelular é regulado pela presença de uma sequência sinalizadora di-leucina na região C-terminal da BACE-1, que permite o reconhecimento desta enzima por parte de proteínas transportadoras. É nos endossomas que ocorre a clivagem proteolítica da APP pela BACE-1, dado que o pH dentro destes compartimentos (pH 4,5) é favorável à atividade desta  $\beta$ -secretase.(87) Às proteínas que medeiam o transporte da BACE-1 (pelo reconhecimento da sequência sinalizadora di-leucina), do complexo de Golgi para os endossomas, onde ocorre a clivagem catalítica da APP, e do seu regresso de novo para o complexo de Golgi, aquando da reciclagem, dá-se o nome de GGAs (em inglês, *Golgi-localized,  $\gamma$ -ear containing ADP ribosylation-binding factor*). As GGAs apresentam três isoformas: GGA1, GGA2 e GGA3. A GGA3 é a única das três isoformas que se encontra também envolvida no transporte desta proteína dos endossomas para os lisossomas, onde vai ocorrer degradação proteolítica. Assumindo, por isso, um papel importante na manutenção dos níveis de BACE-1 no cérebro.(90)

A ubiquitina é uma proteína regulatória sinalizadora que também demonstrou ser importante no transporte intracelular da BACE-1. A ligação desta proteína à  $\beta$ -secretase (ubiquitinação), dependendo da posição do resíduo de lisina a que esta se liga, pode

direcioná-la para uma via de degradação proteossomal ou lisossomal. Por exemplo, a ubiquitinação do resíduo de lisina 501 na região C-terminal da BACE-1, independentemente da presença da sequência sinalizadora de di-leucina, gera um sinal de reconhecimento desta enzima por parte da GGA3, que se liga a ela, mediando o seu transporte em direção à via de degradação lisossomal.(91)

#### **2.5.4 Degradação e Clearance de A $\beta$**

Tal como defende a “Hipótese da Cascata Amiloide”, considera-se a acumulação de A $\beta$  no parênquima cerebral como o principal fator na origem da patologia inerente à DA. Para haver uma manutenção nos níveis de A $\beta$  no cérebro, tem que ocorrer um equilíbrio entre os mecanismos de produção e *clearance* desta proteína. Desta forma, uma acumulação excessiva e duradoura de A $\beta$ , como no caso da DA, resulta de um defeito nos mecanismos de produção e/ou degradação desta proteína. Ao passo que na DA familiar, a produção de A $\beta$  ou a razão A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 se encontram aumentados, devido a mutações nos genes que codificam as proteínas APP, PSEN1 ou PSEN2, envolvidas na sua produção, na DA de início tardio, foi proposto que a acumulação de A $\beta$  resulta de defeitos nos mecanismos de degradação e *clearance*.(92) Esta afirmação é suportada por um estudo recente, que demonstrou haver defeitos nos mecanismos de *clearance* de A $\beta$  em indivíduos com DA de início tardio, quando comparados com indivíduos cognitivamente saudáveis. Para além disso, a taxa de produção de A $\beta$  mostrou-se semelhante nos dois grupos de indivíduos.(93)

Contudo, ao passo que a produção de A $\beta$  envolve apenas um único mecanismo, que se encontra bem caracterizado, a sua eliminação, pelo contrário, envolve vários mecanismos paralelos que ainda não se encontram completamente esclarecidos (figura 2.13).(92)

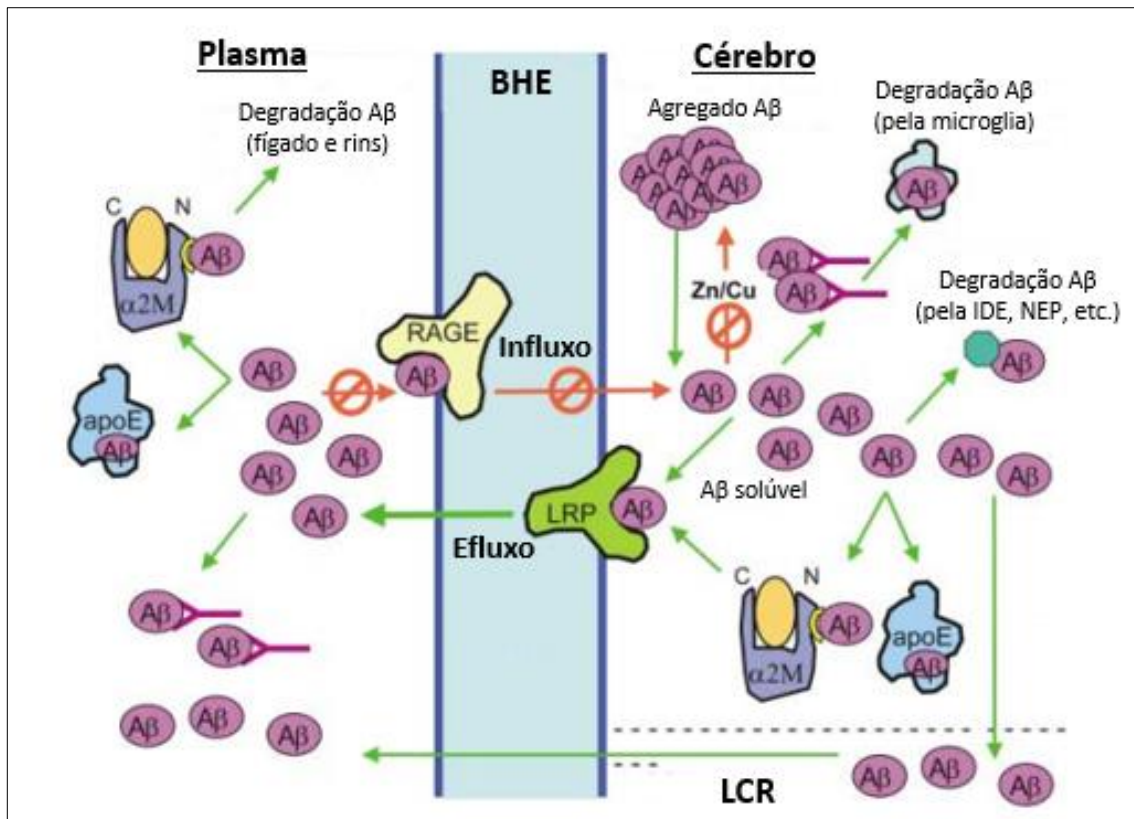


Figura 2.13. Mecanismos envolvidos na eliminação de Aβ. Adaptado de Tanzi.(92)

As enzimas de degradação proteolítica da Aβ mais estudadas são: a Neprilisina (NEP) e a Enzima Degradadora de Insulina (IDE). A NEP é uma protease tipo II associada à membrana plasmática, membro da família das metaloproteases dependentes de zinco, com os sítios catalíticos voltados para o meio extracelular, ideal para a degradação de péptidos extracelulares, tais como a Aβ. Foi demonstrado que os níveis de Aβ se encontram inversamente correlacionados com a atividade da NEP. Esta protease encontra-se quase exclusivamente expressa nos neurónios.(94) Num estudo *in vitro* demonstrou-se que a NEP é capaz de degradar oligómeros de formas sintéticas de Aβ, mas não oligómeros Aβ isolados de meios de cultura de células.(95) Em estudos *in vivo*, verificou-se que a sobreexpressão de NEP em ratos resulta numa redução de aproximadamente 90% dos níveis dos monómeros de Aβ, prevenindo a formação de placas senis. Contudo, não se verificou alteração nos níveis dos oligómeros Aβ, nem melhorias nos défices de memória e aprendizagem nos ratos utilizados neste estudo.(96)

Tal como a NEP, a IDE também pertence à família das metaloproteases dependentes de zinco. Encontra-se predominantemente expressa nos neurónios e degrada exclusivamente monómeros Aβ. Ao contrário da NEP, esta protease encontra-se localizada em vários compartimentos intracelulares, sendo mais abundante no citosol e

mitocôndria, e também no espaço extracelular. Os mecanismos responsáveis pela secreção da IDE ainda não se encontram esclarecidos, sendo que o papel desta enzima na degradação proteolítica de A $\beta$ , foi demonstrado através de estudos *in vivo*, em que se verificou que ratos desprovidos desta enzima exibem níveis significativamente mais elevados de A $\beta$  no cérebro.(97)

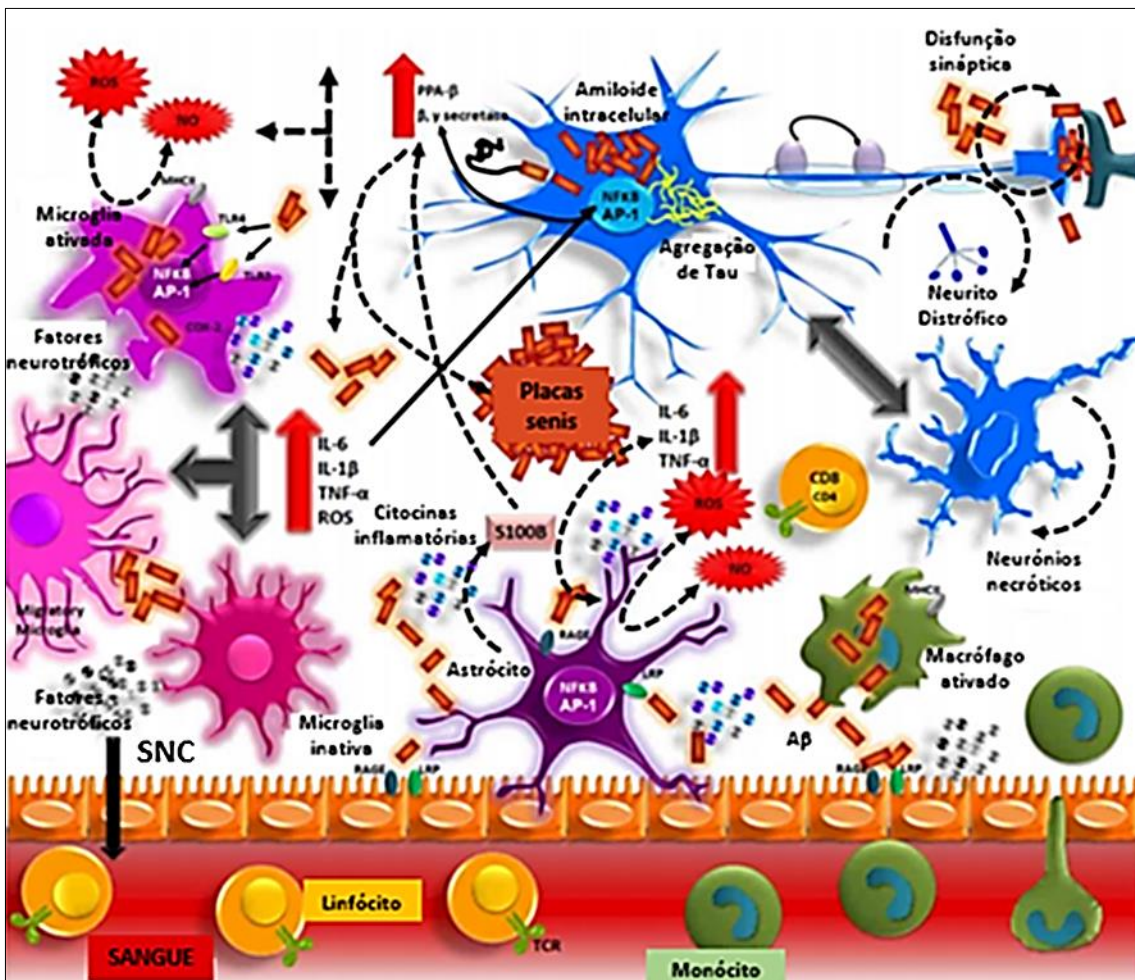
Para além da degradação proteolítica, a outra via de eliminação de A $\beta$  é a *Clearance* mediada por recetores. O recetor melhor caracterizado na eliminação de A $\beta$  é o LRP1 (em inglês, *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*), que pertence à família dos recetores de lipoproteínas de baixa-densidade (LDLR, em inglês, *low-density lipoprotein receptor*), que são recetores localizado na superfície celular que internalizam ligandos extracelulares, tais como a ApoE, encaminhando-os para a via de degradação lisossomal. O recetor LRP1 é abundante na superfície celular dos neurónios e também se encontra expresso nas células gliais que circundam as placas de A $\beta$ . Este recetor regula o transporte de A $\beta$  para o interior da célula, direcionando-o para a via de degradação lisossomal, e também do cérebro para a circulação sanguínea, através da barreira hematoencefálica (BHE), em direção a locais de degradação periféricos, tais como o fígado e os rins. O LRP1 pode ligar-se à A $\beta$  direta ou indiretamente, através dos seus ligandos:  $\alpha$ 2-macroglobulina, RAP e ApoE.(92)

### **2.5.5 Resposta Inflamatória ao nível do Sistema Nervoso Central**

O cérebro foi considerado durante muito tempo como um órgão imunologicamente privilegiado devido à existência de uma barreira hematoencefálica constituída por um sistema de *tight junctions*, entre os capilares do sistema nervoso central, que impede a entrada de células inflamatórias, agentes patogénicos e algumas macromoléculas para o espaço subaracnoide. Atualmente já é referida a existência de um sistema imune endógeno coordenado por células imunocompetentes, como a microglia, que apresenta um processo inflamatório distinto daquele que é encontrado à periferia, até porque o facto de o cérebro não conter fibras de dor torna difícil o reconhecimento da ocorrência de inflamação.(98)



Tem sido sugerido que a deposição e acumulação de A $\beta$  no parênquima cerebral constitui um dos principais processos fisiopatológicos da Doença de Alzheimer. A formação destes depósitos inicia uma série de eventos celulares capazes de desencadear uma resposta imune, na qual participam células residentes, tais como, a microglia e os astrócitos. A acumulação de A $\beta$  no parênquima cerebral e vasos sanguíneos leva a uma migração microglial e promoção de respostas inflamatórias agudas, induzindo desta forma a produção de óxido nítrico (NO); espécies reativas de oxigénio (ROS); citocinas pro-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6), quimiocinas, fatores de crescimento e fatores do complemento (C1q, C3, C4 e C9), que eventualmente podem promover a morte neuronal. (figura 2.14).(99)



**Figura 2.14.** Resposta Inflamatória na Doença de Alzheimer ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC). Adaptado de Meraz-Ríos.(99)

Como se pode observar na figura 2.14, os péptidos A $\beta$  derivados do processamento da APP pela via amiloidogénica formam agregados que ativam a microglia através de recetores do tipo Toll (TLRs) e recetores para produtos finais de glicação avançada

(RAGE). Estes recetores, por sua vez, ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear Kappa B) e AP-1 (proteína ativadora 1), que induzem a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e expressão das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Estes fatores inflamatórios atuam diretamente nos neurónios e estimulam os astrócitos, levando a uma amplificação dos sinais pro-inflamatórios, induzindo efeitos neurotóxicos. Os mediadores inflamatórios gerados pelas células residentes do SNC, induzem a produção de moléculas adesivas e quimiocinas, as quais recrutam macrófagos periféricos.(99)

A microglia são células residentes localizadas no SNC, que têm origem nas células precursoras dos monócitos aquando da embriogénese, sendo capazes de fornecer a resposta inicial contra qualquer lesão que ocorra no SNC (resposta imune inata). A presença de placas neuríticas ativa uma resposta inflamatória mediada pela microglia e leva também à secreção de citocinas pro-inflamatórias, que podem causar diretamente lesão neuronal. Um estudo verificou que a microglia em culturas de células *in vitro* são capazes de fagocitar o péptido  $\beta$ -amiloide. Contudo, a sua capacidade de fagocitose é limitada. Atualmente sabe-se que existem dois tipos de células fagocíticas no CNS, capazes de iniciar uma resposta imune inata: microglia e macrófagos periféricos. Estes macrófagos são recrutados para o SNC por citocinas específicas e quimiocinas, que são libertadas durante a ativação da microglia e dos astrócitos, sendo capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica.(99)

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

síntetase (iNOS). Por outro lado, os próprios astrócitos podem ser uma fonte de  $\beta$ A devido ao facto de aumentarem a produção de  $\beta$ -secretase (BACE1) que é uma enzima essencial para a formação de  $\beta$ A.(100)

## **2.6 Estratégias terapêuticas atuais**

Considerando o efeito deletério da DA no domínio cognitivo, comportamental e funcional dos doentes, que perdem a autonomia nas atividades do quotidiano e se tornam dependentes de terceiros, assim como as repercussões de cariz socioeconómico sentidas pelos familiares e pela comunidade em geral, torna-se crucial a existência de uma terapêutica modificadora ou preventiva desta enfermidade. No entanto, esta não é a realidade atual.(9)

O tratamento da DA deve conciliar a intervenção farmacológica com a não-farmacológica. No que concerne ao tratamento farmacológico, grandes esforços têm sido realizados, por parte da comunidade científica, na pesquisa e desenvolvimento de inúmeras substâncias psicoativas com a finalidade de preservar e reverter as funções cognitivas, comportamentais e funcionais do doente de Alzheimer. Contudo, os fármacos até hoje aprovados não permitem retardar a perda neuronal, atuando simplesmente na melhoria parcial e temporária dos sintomas cognitivos (inibidores da acetilcolinesterase e memantina) e comportamentais (antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos, etc.).(9)(101)

### **2.6.1 Tratamento não-farmacológico**

O tratamento não-farmacológico dos pacientes com Alzheimer tem a mesma importância que o farmacológico na melhoria da qualidade de vida dos doentes e dos seus cuidadores e/ou familiares.(24)

A estimulação cognitiva, nas suas diferentes modalidades, pode ter um papel terapêutico complementar, contribuindo para um melhor desempenho e bem-estar do doente. Nos últimos anos têm sido publicados diversos estudos na área da reabilitação cognitiva, nomeadamente com recurso a plataformas computadorizadas de treino cognitivo. No entanto, torna-se complexo avaliar a eficácia deste tipo de estratégias de reabilitação cognitiva, o que em muito se deve às limitações inerentes aos estudos publicados, como

por exemplo: não serem estudos aleatórios, pela insuficiente caracterização dos grupos clínicos, pelos reduzidos tamanhos das amostras, por significativas lacunas ao nível do procedimento de avaliação neuropsicológica *inicial* e *follow-up*, pela inexistência de estudos com uma monitorização de médio ou longo prazo, entre outras.(24)(49)

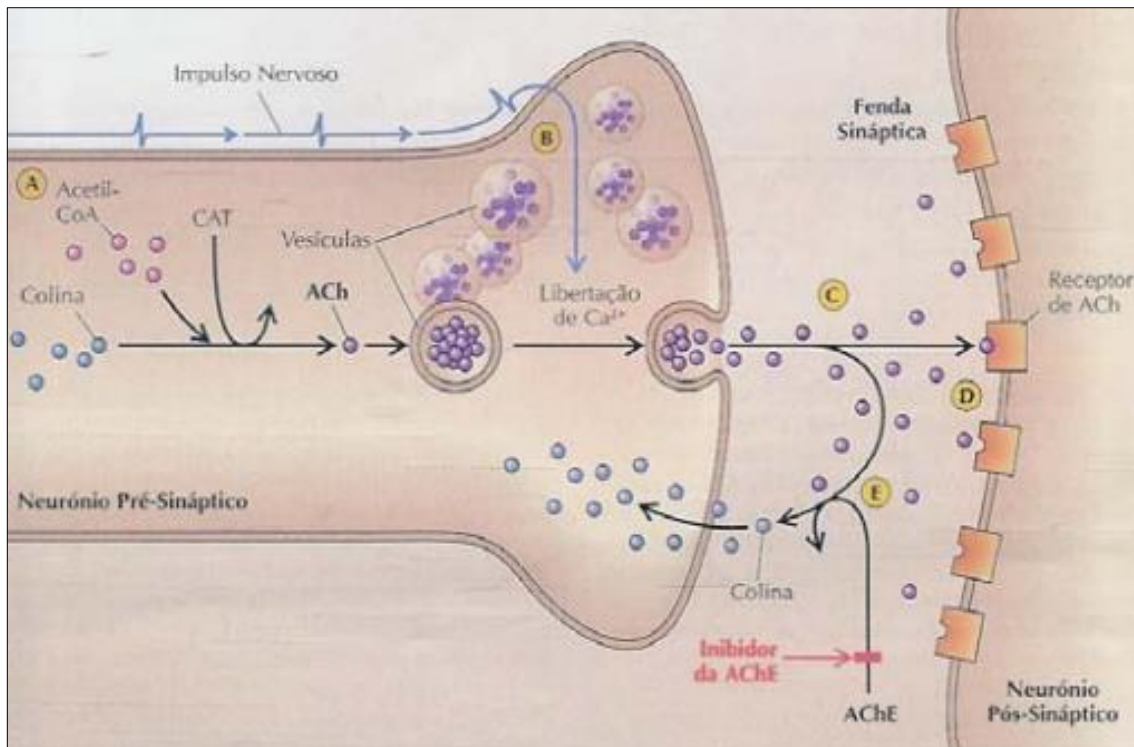
De um modo geral, as investigações têm evidenciado uma melhoria a curto prazo ao nível da capacidade funcional dos pacientes com queixas subjetivas de memória e com DCL, no entanto, os resultados não se têm confirmado nos doentes de Alzheimer. Contudo, parece ser razoável considerar que o treino cognitivo com base em programas de reabilitação cognitiva computadorizada poderá contribuir para um adiamento da contínua progressão do défice cognitivo dos doentes no espetro do DCL e da DA.(102)

O tratamento não-farmacológico também pode ser útil na abordagem de sintomas neuropsiquiátricos como apatia, depressão, ansiedade, psicose, agitação, irritabilidade, agressão e distúrbios de sono. Este tratamento inclui: medidas de higiene, de sono, fototerapia, atividades físicas e sociais, aromaterapia (com lavanda e erva-cidreira), terapia com animais, musicoterapia e terapia com presença simulada (com cassete de áudio ou vídeo com familiares).(49)

## **2.6.2 Tratamento farmacológico**

### IACHEs

Os principais fármacos atualmente aprovados para o tratamento dos sintomas cognitivos da DA são os Inibidores da Acetilcolinesterase (IACHEs), cujo mecanismo de ação visa aumentar a disponibilidade sináptica da acetilcolina (Ach) pela inibição das suas enzimas catalíticas (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), aumentando também a capacidade da Ach em estimular os recetores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (figura 2.15).(103)



**Figura 2.15.** Mecanismo de ação dos Inibidores da Acetilcolinesterase (IACHEs). Adaptado de (103)

Os fármacos pertencentes a este grupo que estão disponíveis no mercado são: a galantamina, o donepezilo e a rivastigmina. Estes são considerados IACHEs de 2ª geração, apresentam propriedades farmacológicas sobreponíveis, e demonstraram em ensaios clínicos um efeito estatisticamente significativo na função cognitiva de doentes com doença de Alzheimer inicial ou moderada. Além do efeito específico sobre as funções cognitivas, verifica-se também um efeito sobre funções não-cognitivas. Apesar do efeito observado sobre a cognição ser consistente, a sua dimensão é em média muito pequena. Estes medicamentos apresentam em geral uma boa tolerância com efeitos adversos comparáveis, resultantes da hiperativação colinérgica periférica, tais como: cefaleias, dores generalizadas, fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, câibras, insónia, tonturas, depressão, sonhos anormais, esquimoses, aumento de peso, efeitos vagotónicos, aumento da secreção gástrica e convulsões. Aquando da terapêutica com este grupo de fármacos, o doente de Alzheimer deve ser monitorizado, ao longo de um período de aproximadamente 12 semanas, de forma não só a avaliar a existência de efeito terapêutico mas também para minimizar os problemas de segurança.(2)(101)

A galantamina e o donepezilo são inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, respetivamente de duração intermédia e longa. Por sua vez, a rivastigmina, que é um inibidor pseudo-irreversível (ou lentamente reversível), tem duração intermédia. A

rivastigmina inibe também a butirilcolinesterase, o que pode resultar numa maior incidência de efeitos colaterais periféricos. Por outro lado, a sua inibição pode representar benefícios adicionais ao tratamento, uma vez que a butirilcolinesterase também parece estar envolvida na maturação das placas neuríticas. A interação da AChE com a rivastigmina leva à formação de um produto de clivagem fenólico (com atividade farmacológica mínima e rápida excreção), e de um complexo carbamilado com a enzima, que impede a hidrólise da acetilcolina por inibição competitiva e duradoura, porém reversível, sendo classificada como pseudo-irreversível. Por este motivo, os efeitos inibidores perduram após a eliminação do fármaco e dos seus metabolitos, reduzindo assim os riscos de interações medicamentosas.(101)(104)

A eficácia dos IACHEs de 2ª geração está bem documentada em múltiplos estudos na doença de Alzheimer ligeira a moderada, sendo mesmo considerados como terapêutica de 1ª linha nestas situações. Contudo, estes fármacos têm sido avaliados recentemente, do ponto de vista médico e económico acerca do seu custo-benefício. Alguns clínicos argumentam que, os IACHEs têm efeito apenas num subgrupo de 10 a 20% de doentes, e porque este subgrupo não pode à partida ser identificado, os IACHEs estão indicados para todos os doentes de Alzheimer. Dada a ausência de fatores preditores clínicos ou biológicos de eficácia, justifica-se a prescrição de um inibidor da colinesterase para todos os doentes com diagnóstico de DA ligeira ou moderada, desde que não existam contraindicações à sua prescrição. Evidentemente, a administração destes medicamentos envolve também a decisão do momento de interromper, devendo ser descontinuados nos seguintes casos: fraca adesão ao tratamento; manutenção do ritmo da deterioração cognitiva, após 12 semanas de tratamento; rápida deterioração após um período inicial de estabilização e quando após um período de tratamento se constata que o fármaco não proporciona mais benefícios.(104)

Os estudos que avaliaram a eficácia dos IACHEs mostraram que a sua administração em doentes com DA ligeira ou moderada, resulta em benefícios discretos a nível cognitivo, comportamental e funcional, em relação aos doentes que não fizeram esta terapêutica. Por outro lado, estudos controlados por placebo detetaram que os benefícios são geralmente observados a partir de doze a dezoito semanas e, possivelmente, desaparecem após seis a oito semanas da interrupção do tratamento.(105) Um estudo vai mais longe, e afirma que a administração de IACHEs a doente com DCL, por períodos que variam entre 4 meses a três anos, não se encontra associado a um atraso na evolução para demência e que os seus riscos não podem ser negligenciados, estando a galantamina

associada a um aumento da mortalidade. O mesmo estudo concluiu que, os IChEs não são eficazes nem na prevenção nem na melhoria das funções cognitivas em doentes com DCL.(106)

### Memantina

Tem sido admitida a possibilidade de que a ativação glutamatérgica através dos recetores NMDA (N-metil-D-aspartato), contribua para a DA. Em regiões associadas às funções cognitivas e à memória, o glutamato demonstrou ser o principal neurotransmissor excitatório cerebral. As regiões corticais e subcorticais que contêm neurónios e recetores do glutamato sofrem perdas estruturais e funcionais na evolução da DA, uma vez que o glutamato é excitotóxico e provoca a morte neuronal, quando presente em níveis elevados por períodos longos.

A memantina, um antagonista não-competitivo dos recetores do glutamato do tipo NMDA, constitui uma adição recente à terapia da DA. Este fármaco bloqueia os recetores NMDA no estado de repouso, de modo idêntico ao magnésio, e é deslocado do seu local de ligação em condições de ativação fisiológica, em contrapartida, não se desprende do recetor na vigência de ativação patológica. Essas propriedades conferem à memantina a possibilidade de retardar a evolução da doença.(101)(107)

A eficácia clínica e tolerabilidade da memantina foram avaliadas num estudo com 166 indivíduos, portadores de demência primária moderada a grave, incluindo a DA. Utilizando medidas funcionais, em vez de cognitivas, os autores concluíram que o tratamento com memantina (10 mg/dia durante 12 semanas) proporcionou, independentemente da etiologia da demência, benefícios funcionais e do comportamento, reduzindo a dependência de cuidados de assistência.(108) Mais recentemente, um estudo comprovou a eficácia da memantina no tratamento de doentes de Alzheimer, moderada a grave. Neste estudo de desenho duplamente-cego e controlado por placebo, 181 de 252 doentes recrutados concluíram 28 semanas de tratamento com memantina (20 mg/dia) ou placebo. Os doentes que receberam o fármaco não apresentaram efeitos adversos significativamente superiores aos do grupo controlo, onde a taxa de abandono de tratamento foi maior (42 contra 29 no grupo memantina). De acordo com os valores a atingir nas escalas de avaliação clínica e funcional, os doentes que receberam memantina apresentaram evolução mais favorável do que os doentes do grupo placebo podendo-se inferir que a terapêutica anti-glutamatérgica é capaz de reduzir a deterioração cognitiva e funcional em doentes portadores de demência moderada a grave.(109)

A segurança clínica do uso de memantina foi avaliada por estudos clínicos controlados por placebo, em doentes com demência leve ou moderada a tomar doses diárias entre 20 e 30 mg. Verificou-se que proporcionavam benefícios sobre as funções cognitivas, motoras e comportamentais e concluiu-se que a incidência de reações adversas com a memantina não foi significativamente superior à do placebo. Os efeitos secundários mais frequentes foram: diarreia, vertigens, cefaleias, inquietação, excitação e cansaço.(107)

A dose diária recomendada é de 20mg, distribuídas por duas tomas de 10mg. A absorção da memantina no trato gastrointestinal conduz a um pico de concentração sérica de três a oito horas e a sua eliminação é fundamentalmente renal, sem interferência com enzimas do citocromo P450, traduzida na ausência de interações farmacocinéticas a esse nível. Deste modo, é possível a coadministração da memantina e IChEs, com baixíssimos riscos de interações medicamentosas.(107)

## **2.7 Fatores de risco e proteção**

Embora os danos cerebrais se acumulem e a função cognitiva decline progressivamente com a idade, a demência não faz parte do processo de envelhecimento natural do ser humano, sendo que a maioria dos idosos nunca irá desenvolver esta síndrome. No entanto, a nível populacional observam-se marcadas diferenças inter-individuais no que respeita à saúde cognitiva dentro desta faixa etária. Estas diferenças podem em parte resultar do grau de exposição de cada indivíduo a um determinado número de fatores ao longo da vida, os quais são normalmente denominados por, fatores de risco ou fatores de proteção, dependendo se estão associados a um aumento ou diminuição do risco de desenvolver demência.(4)(16) Por exemplo, na Finlândia, em 1200 indivíduos dos 60 aos 77 anos, está em curso, desde 2009, uma intervenção controlada cientificamente sobre os diversos fatores de risco de demência e que pretende verificar qual o impacto do controlo dos fatores de risco na cognição.(110)

Os fatores de risco distinguem-se habitualmente em modificáveis e não-modificáveis. Dentro dos fatores de risco não-modificáveis encontram-se a idade, o género e os fatores genéticos. No que respeita aos fatores de risco modificáveis, temos uma lista extensa, com variações na literatura científica quanto à sua relevância, e nela incluem-se: a depressão; baixa escolaridade e o analfabetismo; traumatismos cranianos; o estilo de vida e doenças com ele relacionadas (diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade);



défices nutricionais; tóxicos ambientais; tabaco; anestésicos; cirurgia cardíaca e apneia do sono.(4)(111)

Por outro lado, os principais fatores de proteção da DA são a atividade cognitiva e o exercício físico. Também a eventual proteção proporcionada pelo tipo de dieta (nomeadamente a dieta mediterrânica) tem ganho cada vez mais adeptos e financiamento. É conhecido que as doenças resultantes de uma má alimentação (diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade) se alastram pelo mundo, seguidas do aumento da prevalência de demência, tornando-se graves problemas de saúde pública.(112)

Porém, torna-se relevante mencionar que atualmente ainda existe alguma controvérsia sobre o que constitui fatores de risco de demência, fatores protetores e de que modo estes interagem entre si.

### **2.7.1 Fatores de risco não-modificáveis**

#### Idade

O envelhecimento cerebral é o principal fator de risco relacionado com o aparecimento da doença de Alzheimer. Em todo o mundo, e em particular, nos países desenvolvidos, a esperança média de vida tem vindo a aumentar significativamente. Desta forma, com o aumento do número de idosos, aumentam também o número de casos de demência, particularmente DA.(4)

A prevalência desta doença dobra a cada cinco anos depois dos 60 anos, e assim, passa de uma prevalência de cerca de 1% na faixa etária dos 60-64 anos, para cima de 30% em indivíduos com no mínimo 85 anos.(3) Porém, estudos recentes, com base em técnicas de ressonância magnética e medições de biomarcadores no LCR, sugerem que após os 85 anos há um abrandamento no que diz respeito ao aumento da prevalência desta síndrome. Esta conclusão surge do facto de haver uma aproximação entre a atrofia cerebral correspondente ao envelhecimento normal e aquela que se encontra associada à patologia da DA, sendo por isso complicado realizar um diagnóstico acurado nestas faixas etárias. A relevância clínica deste achado ainda não é muito valorizada porque há ainda muito poucos indivíduos nesta faixa etária, mas poderá vir a ter implicações à medida que aumenta a esperança média de vida das populações.(113)

### Fatores Genéticos

Com base na idade em que têm início os sintomas clínicos, a DA pode ser classificada em DA de início precoce (ou familiar) e DA de início tardio (ou esporádica). Embora sejam clinicamente indistinguíveis, a DA de início precoce, está associada a uma progressão mais rápida da patologia clínica, que se inicia antes dos 65 anos e constitui cerca de 1-5% de todos os casos de DA. Nesta também se observa um padrão mendeliano de herança genética, sendo três os principais genes (APP, PSEN1 e PSEN2) implicados na origem da patologia neste tipo de DA. Mutações num destes genes, maioritariamente mutações autossomais dominantes, correspondem a 85% dos casos de DA de início precoce. Indivíduos com síndrome de Down (ou Trissomia 21) têm 1 cópia adicional do gene da APP, devido à presença de 3 cromossomas 21, e como consequência, produzem 50% mais proteína APP, aumentando a produção de A $\beta$  e conduzindo a DA de início precoce. Por fim, mutações nestes genes não são consideradas fatores de risco, mas sim marcadores genéticos desta doença, uma vez que a sua presença irá conduzir, inevitavelmente, ao desenvolvimento da patologia inerente à DA.(6)

Por outro lado, a DA de início tardio, está associada a uma progressão mais lenta da patologia clínica, que se inicia normalmente a partir dos 65 anos e corresponde a, aproximadamente, 95% do total de indivíduos afetados por este síndrome. Ao contrário da DA familiar, não apresenta nenhuma mutação associada, descrita até ao momento, mas sabe-se, através de estudos longitudinais de agregação familiar e de estudos com gémeos, que mutações em alguns genes constituem fatores de risco acrescido no desenvolvimento deste tipo de DA. Demonstrou-se que, familiares em 1º grau destes doentes têm o dobro do risco de desenvolver esta doença, quando comparados a indivíduos sem este parentesco.(6) Para além disso, verificou-se também que, gémeos monozigóticos apresentam maior incidência para a DA do que gémeos dizigóticos, o que sugere uma contribuição genética substancial, 60-80%, na origem desta doença.(19)

Como referido anteriormente, a variação genética no gene da ApoE é o principal fator de risco conhecido na DA de início tardio, uma vez que se demonstrou que as isoformas da ApoE (E2, E3 e E4) afetam de forma diferente a deposição e *clearance* de A $\beta$ , assim como, de outros processos independentes de A $\beta$ , tais como: plasticidade sináptica; metabolismo lipídico e neuroinflamação.(114)

A ApoE é uma apolipoproteína composta por 229 aminoácidos e com um peso molecular de aproximadamente, 34 kDa. O gene da ApoE, situado no cromossoma 19,

existe em três variantes, que resultam de variações em aminoácidos nas posições 112 e 158, onde pode estar presente um resíduo de cisteína (Cys) ou arginina (Arg):  $\epsilon 2$  (Cys 112; Cys 158),  $\epsilon 3$  (Cys 112; Arg 158) e  $\epsilon 4$  (Arg 112; Arg 18). No Sistema Nervoso Periférico (SNP), a ApoE é produzida principalmente no fígado e em macrófagos, e participa no metabolismo do colesterol. No Sistema Nervoso Central (SNC), é a principal apolipoproteína, sendo produzida pelos astrócitos e micróglia.(114)

O alelo  $\epsilon 4$ , presente em 15% da população em geral, encontra-se aumentado em portadores de DA, com uma sensibilidade de 65% para o seu diagnóstico isolado.(115) Apesar de 40-65% dos doentes de Alzheimer serem portadores de, pelo menos, uma cópia do alelo  $\epsilon 4$ , este não é determinante da doença. Pelo menos um terço dos indivíduos com DA não carregam este alelo, e alguns homozigotas para o alelo ApoE  $\epsilon 4$  nunca desenvolveram a doença, no entanto, o risco de a virem a desenvolver é cerca de vinte vezes maior quando comparados com indivíduos com outros genótipos.(6)

Um estudo que recorreu ao uso de imagiologia PET-PiB e de biomarcadores de A $\beta$  no LCR, demonstrou que qualquer individuo homozigota para o alelo ApoE  $\epsilon 4$ , independentemente da faixa etária a que pertence, apresenta níveis reduzidos de A $\beta$ 42 no LCR e elevada deposição de A $\beta$  no parênquima cerebral, quando comparados com indivíduos com outros genótipos ApoE.(116) Noutro estudo, foi demonstrado que a ApoE se co-deposita nas placas A $\beta$  no cérebro de doentes de Alzheimer, sendo que a isoforma ApoE4 é a que tem menor afinidade de ligação a A $\beta$ , sugerindo que esta isoforma deverá ser menos eficiente a mediar a *clearance* desta proteína.(117) Outro estudo recente, que utilizou ratos como modelos de estudo, aos quais se substituiu a ApoE nativa pelas diferentes isoformas da ApoE humana, verificou-se que os níveis de ApoE no cérebro e LCR dependem do genótipo do individuo. Os resultados indicaram que os baixos níveis de ApoE total observados em indivíduos homozigotas para o alelo ApoE  $\epsilon 4$ , podem diminuir a eficiência do mecanismo de *clearance* e, por isso, contribuir para a progressão da patologia da DA.(118)

A associação entre DCL e o alelo  $\epsilon 4$  também tem sido amplamente estudada. As conclusões geralmente são concordantes com os resultados para a demência e DA. A homozigotia para Apo $\epsilon 4$  implica um maior risco para o desenvolvimento de DCL e DA. Indivíduos homozigotas para o alelo  $\epsilon 4$  desenvolverão DA 10 a 20 anos mais cedo que os portadores dos outros dois genótipos. Se comparados com os não portadores do alelo  $\epsilon 4$ , os portadores heterozigóticos têm uma probabilidade de vir a desenvolver DA três a quatro vezes maior. Evidências sugerem que um individuo que preencha critérios

clínicos, cognitivos e etiológicos para o DCL, e é positivo para o alelo  $\epsilon 4$ , tem maior probabilidade de progredir para DA em menos anos do que um indivíduo sem esta característica genética.(34)(45)

Nos últimos anos houve um grande desenvolvimento tecnológico na área da genética. Estudos recentes de associação genómica em larga escala (GWAS, em inglês, *Genome-Wide Association Studies*) possibilitaram uma análise simultânea de milhões de polimorfismos no genoma de milhares de doentes de Alzheimer. Estes estudos revelaram novos genes (CD33, CLU, CR1, PICALM, BIN1, ABCA7, CD2AP, EPHA1 e MS4A6A/MS4A4E) como prováveis fatores de risco da DA. Contudo, apesar do forte suporte estatístico, o efeito destes novos candidatos no risco de desenvolver DA não parece ser significativo. Isto porque, enquanto a variação alélica da ApoE provoca uma alteração no risco de desenvolver DA na ordem dos 400-1500%, as alterações provocadas pela variação alélica destes novos genes variam entre 10-20%.(119)

### Sexo Feminino

Um estudo recente sugere que quase dois terços dos indivíduos diagnosticados com DA são do sexo feminino. Apesar dos vários estudos sobre o assunto, ainda não foram determinados com precisão os fatores envolvidos na maior suscetibilidade feminina para a doença. Alguns autores sugerem que se deve à maior longevidade, outros a fatores hormonais, ou ainda à menor escolarização e diferenciação profissional.(120)

Estudos efetuados em ratos transgênicos mostram uma vulnerabilidade dos cérebros femininos, em especial do hipocampo, com desenvolvimento de maior atrofia e uma deposição de A $\beta$  mais precoce. Têm sido analisadas razões para esta diferença de risco, e concluiu-se que na sua base podem estar: achados como efeitos do genótipo  $\epsilon 4$ , mais pronunciados em mulheres que em homens; uma reserva cerebral maior nos homens ser protetora quanto a suportar a patologia e, por fim, a diminuição dos níveis de estrogénio após menopausa.(121)

Uma outra hipótese relaciona a maior prevalência da DA com a maior vulnerabilidade dos hipocampos femininos ao *stress*, assim como a maior prevalência de depressão ao longo da vida adulta das mulheres, sendo ambos fatores de risco desta doença.(111)

## **2.7.2 Fatores de risco modificáveis**

### Depressão

O papel da depressão como fator de risco da DA, embora seja amplamente reconhecido, os seus mecanismos de atuação ainda não se encontram bem esclarecidos. A depressão que se associa ao aparecimento da DA parece ser aquela que se inicia antes dos 65 anos, bem como a depressão recorrente, com múltiplos episódios ao longo da vida.(122)

Num estudo populacional em que se avaliaram e seguiram durante vários anos 4 803 indivíduos, dos quais 11,7% foram diagnosticados com depressão, os investigadores verificaram, anos mais tarde, que este grupo era mais suscetível ao aparecimento de demência do que o grupo de indivíduos livres de depressão.(123) Por outro lado, existem evidências na literatura científica relativas à diminuição do risco de desenvolver certos tipos de demência com o tratamento adequado da síndrome depressiva.(122)

Muitas vezes, a depressão leva a um agravamento no funcionamento da memória, e também da cognição, que pode simular uma demência. Daí que, por vezes o diagnóstico das fases iniciais da DA possa ser confundido com um síndrome depressivo. Desta forma, quando coexistem sintomas depressivos e disfunção cognitiva, é necessário tratar a depressão de forma adequada (recorrendo a fármacos antidepressivos) e, simultaneamente, vigiar a evolução da função cognitiva.(123)

### Baixa escolaridade e falta de diferenciação profissional

A baixa escolaridade e falta de diferenciação profissional estão associados a uma elevada prevalência e incidência da DA. Porém, os mecanismos por detrás desta associação ainda não se encontram esclarecidos. Alguns investigadores propõe que quanto mais estímulos o cérebro receber, mais sinapses serão estabelecidas, proporcionando, gradualmente, uma maior “reserva cognitiva”. A reserva cognitiva refere-se a diferenças individuais no modo como executamos as tarefas. Estas diferenças individuais poderão levar uns doentes a ter uma maior resistência do cérebro às modificações patológicas do que outros. Por este motivo, indivíduos com uma reserva cognitiva mais baixa, teoricamente, atingirão o limiar de demência mais cedo do que indivíduos de maior reserva cognitiva, como por exemplo, aqueles com níveis de educação e diferenciação profissional mais elevados.(111)

### Doenças relacionadas com o estilo de vida

Os fatores de risco de DA, devido a doenças relacionadas com o estilo de vida, são: diabetes tipo II, hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade.

Resultados obtidos de estudos longitudinais, que analisaram a relação entre a hipertensão arterial, em indivíduos entre os 40-60 anos, e o declínio cognitivo, defendem que esta constitui um fator de risco na DA devido ao seu efeito na integridade vascular da barreira hemato-encefálica, que resulta num extravasamento de proteínas para o cérebro, que por sua vez pode conduzir à lesão neuronal, redução da função sináptica, apoptose e aumento do depósito extracelular de A $\beta$ .(124) A hipertensão arterial está associada ao consumo excessivo de sódio e /ou baixo consumo de potássio. De acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), os adultos deverão consumir menos de 2000 mg de sódio por dia (equivalente a 5 gramas de sal) e mais de 3500mg de potássio por dia. A ingestão diária de sódio pelos portugueses foi avaliada como sendo, em média, de 10,7g por dia, ou seja, mais do dobro dos valores recomendados pela OMS.(125)

Alguns estudos defendem, com base em dados estatísticos, que indivíduos com diabetes tipo II têm o dobro do risco de vir a desenvolver DA, quando comparados com indivíduos não-diabéticos.(126) Os mecanismos que associam a diabetes tipo II à DA de início tardio ainda não se encontram totalmente esclarecidos, mas pensa-se que nestes possam estar incluídos mecanismos cerebrovasculares e não-cerebrovasculares.(127) Sabe-se que este tipo de diabetes é um fator de risco para o acidente vascular cerebral (AVC), sendo acompanhado por outros fatores de risco vasculares, tais como, hipertensão e dislipidemia. Os mecanismos não-cerebrovasculares que se encontram associados à diabetes tipo II incluem a hiperinsulinémia. A insulina é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, sendo que a infusão periférica de insulina nos idosos pode desencadear um aumento dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR. Existem recetores de insulina no cérebro, inclusive no hipocampo e córtex entorrinal, que são estruturas afetadas numa fase inicial da DA. A enzima degradadora de insulina (IDE) encontra-se também envolvida no mecanismo de degradação proteolítica da A $\beta$  e, portanto, tanto a insulina como a A $\beta$  são substratos deste enzima. Uma vez que a insulina é um inibidor competitivo da degradação proteolítica de A $\beta$ , a presença desta no cérebro vai conduzir para uma diminuição da taxa de degradação proteolítica de A $\beta$ , contribuindo para o depósito e acumulação desta proteína no espaço extracelular, que é o mecanismo fisiopatológico característico da DA. Por outro lado, a hiperinsulinémia pode suprimir a absorção de

insulina através da barreira hemato-encefálica, resultando numa redução dos níveis desta no cérebro e, conseqüentemente, inibição da expressão da IDE, diminuindo a degradação proteolítica de A $\beta$  mediada por este enzima.(127)(128)

Alguns estudos analisaram também a relação entre os níveis lipídicos, de indivíduos entre os 40-60 anos, e o risco de desenvolverem DA, concluindo que estes podem constituir um fator de risco para esta doença. Por exemplo, estudos recentes de associação genética identificaram vários genes envolvidos no metabolismo ou transporte do colesterol (ApoE, CLU, ABCA7 e SORL1) como sendo genes sensíveis para a DA. Outros estudos, no âmbito da biologia celular, defendem o envolvimento das “jangadas lipídicas” de colesterol (domínios da membrana plasmática com elevada concentração de colesterol), na modulação do processamento da APP pelas secretases, interferindo na produção de A $\beta$ . Porém, em estudos epidemiológicos obtiveram-se resultados contraditórios, não se verificando qualquer relação entre a dislipidemia e o risco de desenvolver DA.(129)

No que diz respeito à obesidade, devido ao facto da diabetes e a hiperinsulinemia serem comuns em indivíduos com elevado índice de massa corporal (IMC), o risco elevado para a DA nestes indivíduos pode ser explicado através dos mecanismos subjacentes a estas co-morbilidades.(111)

#### Traumatismo craniano

Os traumatismos cranianos são conhecidos há várias décadas como lesivos do funcionamento cerebral. Considera-se que os traumatismos cranianos moderados a graves aumentam de duas a quatro vezes o risco de desenvolver demência, sendo este maior nos homens do que nas mulheres. São, no entanto, ainda desconhecidos quais os mecanismos envolvidos, embora existam algumas evidências de que após um traumatismo craniano, normalmente, aumenta a extensão da patologia A $\beta$  e tau no cérebro.(130)

#### Tabaco

A acetilcolina (ACh) e os seus recetores nicotínicos estão diminuídos nos doentes de Alzheimer, e uma vez que a nicotina induz a expressão destes recetores, foi proposto que esta poderia ser usada para prevenir ou atrasar a progressão da DA, contrabalançando a perda de recetores nicotínicos que conduzem a défices colinérgicos, e que, por isso, o tabagismo poderia estar associado a um risco reduzido de DA. De acordo com isto, foi demonstrado que a nicotina aumenta a performance cognitiva dos fumadores. Apesar da

possibilidade da nicotina ser benéfica para a DA, o tabaco contém outras toxinas com efeitos carcinogénicos e risco conhecido para doenças pulmonares e cardiovasculares e, portanto, pode aumentar o risco de DA através das co-morbilidades associadas. Outra desvantagem do tabaco é o facto de que, na maior parte dos casos, este hábito está associado a hábitos alcoólico e quando esta associação é forte, torna-se particularmente prejudicial para a cognição. Estudos reportam que a forte interação entre hábitos tabágicos e alcoólicos pesados leva a taxas de declínio cognitivo mais rápidas. Em estudos de coorte, verificou-se que o tabaco é um fator de risco para a DA e que está associado a uma maior atrofia regional do cérebro em indivíduos normais.(111)(131)

### **2.7.3 Fatores de proteção**

#### Estimulação Cognitiva

Atividades que estimulem a cognição foram associadas a uma redução do risco de desenvolver DA. Apesar de vários estudos epidemiológicos mostrarem associação entre uma baixa escolaridade e a DA, não se sabe ao certo o papel da educação formal no desenvolvimento da DA. Uma hipótese plausível seria que um cérebro mais escolarizado, que aprendeu mais estratégias cognitivas poderá lidar melhor com a carga lesional da doença e demorar mais tempo a revelar as falhas na cognição. Daí que, nestes doentes mais escolarizados possa ocorrer uma queda quase abrupta da função cognitiva pouco depois do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos, dando a “falsa” sensação de que a doença evoluiu mais depressa do que o habitual.

Muitos idosos não leem livros, não usam o computador, nem praticam novas atividades que lhes desperte ou mantenha as aptidões cognitivas. E toda esta inatividade cumulada com o isolamento social contribui para a diminuição das aptidões cognitivas de um modo geral.(110)

#### Atividade Física

Muitos estudos sugerem que exercícios cardiorrespiratórios estão associados a um risco diminuído de DCL e DA e a taxas de declínio mais lentas após diagnóstico de DA. Um estudo em particular reporta que a atividade física está associada a um risco diminuído de défice cognitivo em fases da vida mais tardias. As práticas de exercício físico durante a adolescência associam-se a uma ótima diminuição do risco de DA. Por



aqui se conclui que a prática de exercício físico durante a adolescência e também em menor grau, ao longo de toda a vida, é benéfica, na medida em que reduz o risco de vir a desenvolver DA, mas também contribui para a melhoria da performance cognitiva e aumento da reserva cognitiva. Ao contrário, a inatividade física durante a adolescência contribui para co-morbidades, como a obesidade e a diabetes, que por sua vez são ambos fatores de risco para a DA.(110)

### Dieta

Uma alimentação baseada em carne, laticínios, enchidos e gorduras tem um teor excessivo em ácidos gordos saturados, o que parece propiciar o declínio cognitivo. Pelo contrário, uma dieta do tipo mediterrânico, que promove o consumo de peixe, ácidos gordos mono e polinsaturados, vegetais e frutos estão relacionados com a redução do risco de disfunção cognitiva.(132)

São vários os estudos que demonstram os benefícios neuroprotetores de nutrientes presentes na dieta mediterrânica, tais como os ácidos gordos polinsaturados ómega 3 (DHA e EPA), presentes no peixe, e os antioxidantes, presentes na fruta e nos vegetais.(133) Existem, no entanto, algumas suspeitas de que a proteção dada pelos ácidos gordos ómega 3 só teria efeito nos indivíduos não portadores do alelo Apoε4.(134)

O cérebro é o órgão do corpo humano mais rico em ácidos gordos, nomeadamente ácido araquidónico (ómega 6), DHA e EPA (ómega 3). Contudo, não os sintetiza em quantidade suficiente e, como tal, os mesmos necessitam de ser ingeridos diariamente em quantidades adequadas. A proporção ideal de ómega 6/ómega 3 na dieta humana é de 4:1.

O índice ómega 6/ómega 3 é reconhecido como um marcador relevante do risco de doença cardiovascular e começou também recentemente a ser avaliado como marcador de disfunção cognitiva, parecendo existir uma correlação entre este índice e o risco de desenvolver DA. Alguns estudos em modelos animais de doença de Alzheimer revelaram que a suplementação com DHA e um quociente ómega 6/ómega 3 baixo na dieta diminui o quociente ómega 6/ómega 3 no cérebro e também os níveis de A $\beta$  e tau insolúvel, principais biomarcadores da DA.(135) Outro estudo que testou a influência da suplementação com DHA num grupo de doentes com deterioração cognitiva revelou benefícios ao fim de seis meses de suplementação, comparativamente com o grupo placebo.(136)

A ingestão de ácidos gordos necessita de ser complementada com a ingestão de antioxidantes (vitamina E) para potenciar os efeitos anti-inflamatórios, antitrombóticos,

antiarrítmicos e anticoagulantes, bem como os efeitos benéficos na cognição e flexibilidade das membranas celulares. É igualmente importante o acesso, através da dieta ou suplementação, a vitaminas do complexo B, de ácido fólico e de vitamina D. O cérebro possui inúmeros recetores de vitamina D e, recentemente, foram verificadas associações entre níveis sanguíneos baixos desta vitamina ( $<25$  nmol/l) e o risco quatro vezes mais elevado de défice cognitivo, quando comparado com pessoas com níveis normais ( $\geq 75$  nmol/l).(110)(137)

### 3. Biomarcadores

#### 3.1 Definição e utilidade dos biomarcadores

Um biomarcador ou marcador biológico é qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser objetivamente medido e avaliado, no corpo ou nos seus produtos, como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica.(11)

A identificação de biomarcadores específicos para doenças neurodegenerativas, tais como a DA, é um dos principais objetivos da investigação clínica atual, sobretudo porque estes são cruciais no diagnóstico diferencial entre patologias idênticas, o que permite uma seleção mais rigorosa dos doentes participantes em ensaios clínicos, no estudo e avaliação do efeito das diferentes terapêuticas (principalmente, em ensaios clínicos de novos fármacos) e também no acompanhamento da progressão da doença. Atualmente não existem terapêuticas capazes de reverter este tipo de patologias, sendo a carência em biomarcadores uma das principais causas apontadas para esta ausência. Como referido anteriormente, a maioria dos doentes de Alzheimer é diagnosticado já numa fase de demência. Nesta fase a degeneração neuronal já se encontra bastante avançada, o que torna difícil a eficácia de qualquer terapêutica, com exceção das que são meramente sintomáticas.(10)(11)

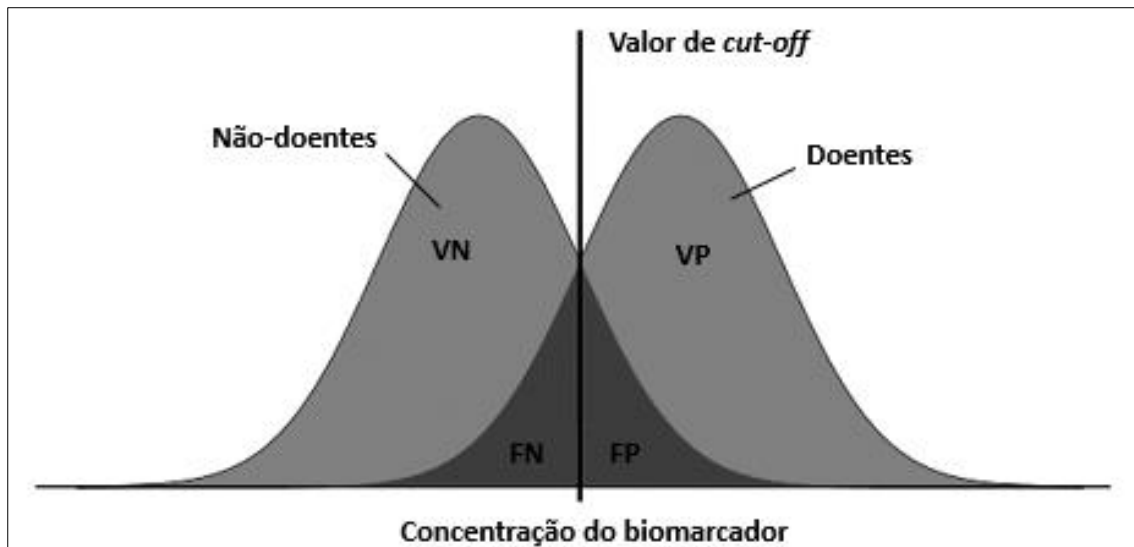
A avaliação do valor de diagnóstico de um determinado biomarcador, para uso num determinado contexto, pode ser conseguida pela análise das suas características individuais, tais como, a sensibilidade, especificidade e valores preditivos (negativo e positivo), habitualmente derivadas do estudo que o comparou com o teste de referência (*gold standard*) e que permite construir a chamada tabela de contingência (Quadro 3.1).

**Quadro 3.1.** Tabela de Contingência na avaliação do valor de diagnóstico de um biomarcador. Adaptado de Robin.(138)

		<u>Teste de referência</u>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>Teste de diagnóstico</b>	<b>Positivo</b>	Verdadeiro positivo (VP)	Falso positivo (FP)	Valor Preditivo Positivo (VPP) = $VP/(VP+FP)$
	<b>Negativo</b>	Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)	Valor Preditivo Negativo (VPN) = $VN/(FN+VN)$
		Sensibilidade = $VP/(VP+FN)$	Especificidade = $VN/(FP+VN)$	Precisão = $(VN+VP)/(VN+VP+FN+FP)$

A sensibilidade define-se como a percentagem de doentes que apresentam um resultado positivo num teste de diagnóstico. Se todos os doentes portadores de uma determinada doença apresentarem resultados anormais (positivos), esse teste tem uma sensibilidade de 100%. Um teste com uma sensibilidade elevada será particularmente útil no rastreio de um determinado diagnóstico (baixa percentagem de falsos-negativos). Por sua vez, a especificidade define-se como a percentagem de indivíduos saudáveis (controles) que apresenta um resultado negativo num teste. Se todos os controles apresentarem um resultado negativo num teste, este teste terá uma especificidade de 100%. Um teste com uma especificidade elevada será particularmente útil na confirmação de um determinado diagnóstico (baixa percentagem de falsos-positivos). O valor preditivo positivo (VPP) define-se como a probabilidade que um resultado positivo de um teste signifique presença de doença- Um teste com um VPP elevado permite, em caso do resultado ser anormal fundamentar razoavelmente o diagnóstico. Já o valor preditivo negativo (VPN) define-se como a probabilidade que um resultado negativo de um teste signifique ausência da doença.(138)

As características de diagnóstico acima descritas não são imutáveis e permanentes. Os valores da sensibilidade e especificidade de um teste dependem de duas ordens de fatores. Em primeiro lugar, do valor previamente definido a partir do qual se considera que um resultado é positivo (valor de *cut-off*), assim, o teste apresentará uma especificidade e sensibilidade variáveis, isto é, quanto mais sensível, menos específico e vice-versa (figura 3.1). Em segundo lugar, depende também da prevalência da doença na população em que o teste foi estudado. Por exemplo, na situação típica da determinação da sensibilidade e especificidade de um teste utilizando doentes mais velhos e com a doença num estágio mais avançado, comparados com grupos-controlo constituídos por indivíduos mais novos e saudáveis, faz com que a percentagem de resultados verdadeiros-positivos seja mais elevada (porque os doentes têm doença mais avançada) e a de verdadeiros-negativos também (porque o grupo-controlo é composto por indivíduos saudáveis). Deste modo, a sensibilidade e a especificidade deste teste serão mais elevadas do que seria de esperar na população em geral em que existem espectros de doença e saúde mais alargados.(11)(12)(138)



**Figura 3.1** Distribuição hipotética dos resultados de testes de diagnóstico entre doentes e não-doentes. Adaptado de Robin.(138)

Atualmente, os fatores mais importantes para definir a utilidade diagnóstica de um biomarcador são: a sensibilidade, especificidade, definirem bons valores *cut-off*, facilidade de utilização e colheita (não-invasivo), reprodutibilidade, acessibilidade (baixo custo) e o facto de estarem relacionados com os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença (Quadro 3.2). A sensibilidade e especificidade devem ser superiores a 80%.(11)(138)

**Quadro 3.2** - Critérios de seleção de um bom biomarcador para o estudo da DA. Adaptado de Humpel.(11)

<b><u>Critérios de seleção dos biomarcadores</u></b>
Refletir processos de envelhecimento fisiológico
Refletir processos fisiopatológicos básicos do cérebro
Reagir sob intervenção farmacológica
Exibir elevada sensibilidade
Apresentar alta especificidade para a doença
Permitir medições repetidas ao longo do tempo
Permitir reprodutibilidade em laboratórios por todo o mundo
Deve ser mensurável, não invasivo, fácil de utilizar
Não deve causar danos aos indivíduos que estão a ser analisados/avaliados
Os testes de diagnóstico devem ser baratos e rápidos
As amostras devem ser estáveis para permitir o transporte fácil e pouco dispendioso
Fácil recolha de fluidos, não só em hospitais
Definir bons valores de <i>cut-off</i> de forma a distinguir doenças
Os dados publicados em revistas e jornais credíveis
Dados reproduzidos por, pelo menos, duas investigações independentes

### **3.2 Métodos e materiais de recolha**

Os biomarcadores podem ser obtidos a partir de diferentes tecidos e fluidos corporais humanos e por diferentes técnicas. Por exemplo: (11)

- Na análise ao tecido cerebral *post-mortem*, por técnicas de imunohistoquímica, encontram-se as placas amiloides e os neurofilamentos de proteína tau;
- Biópsias cerebrais permitem a seriação de mudanças patológicas nos diferentes estádios da DA, mas não são úteis para análises de rotina;
- O LCR é um fluido muito útil no diagnóstico, pois reflete os processos metabólicos no cérebro, devido ao contato direto com o mesmo. A sua colheita faz-se por punção lombar, um processo invasivo que torna este procedimento limitado para uso diagnóstico na clínica;
- No sangue, as análises ao plasma e soro, são o *gold standard* nos laboratórios de análises clínicas. São técnicas minimamente invasivas quando comparadas com a técnica de recolha do LCR sendo esses fluidos mais fáceis de extrair e processar. A procura de marcadores periféricos para a DA tem ganho muito interesse. No entanto, o seu uso é ainda limitado uma vez que as possíveis alterações são pequenas e heterogéneas e a informação recolhida do plasma/soro reflete um amplo espectro de mudanças que não estão necessariamente relacionadas com a DA. A sua maior vantagem é que permite que os doentes possam ser acompanhados através de análises de rotina por vários anos.(11)

### **3.3 Biomarcadores da DA**

Os doentes de Alzheimer podem apresentar alterações fisiopatológicas associadas à demência ou apresentarem-se cognitivamente normais. Tanto a degradação patológica como o declínio cognitivo ocorrem gradualmente, mas as alterações patológicas observáveis em sujeitos com demência tendem a desenvolver-se algumas décadas antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos.(12)

Os biomarcadores, tanto bioquímicos como imagiológicos, são indicadores *in vivo* das alterações específicas que ocorrem na DA. Os principais biomarcadores desta doença são: os biomarcadores de depósitos  $\beta$ -amiloide e os de lesão neuronal.

Estes resultam numa série de alterações no cérebro e LCR, que se podem estender até ao sangue e ser detetados através de técnicas de bioquímica e de imagiologia.(12)(33)

Atualmente, estes dois grupos de biomarcadores são representados pelas seguintes alterações:(12)(44)

- 1) Biomarcadores de deposição  $\beta$ -amiloide
  - a) Níveis de  $A\beta$  no LCR;
  - b) Placas amiloides, identificadas na PET-PiB;
- 2) Biomarcadores de lesão neuronal
  - a) Níveis de proteína T-tau e P-tau no LCR;
  - b) Atrofia temporal-medial e do volume do hipocampo, através de medições volumétricas ou medições visuais em RMN;
  - c) Taxa de atrofia cerebral;
  - d) Redução do metabolismo de glicose no cérebro, identificado na FDG-PET;
  - e) Redução do fluxo sanguíneo cerebral, identificado pela SPECT (tomografia computadorizada de emissão de fóton único).

É pela combinação de informação dada por estes dois tipos de biomarcadores que se torna possível estimar a possibilidade de ocorrência de um caso de DA.(44) Desta forma, atualmente os principais biomarcadores com utilidade clínica são os de patologia amiloide e os de lesão neuronal, que podem ser medidos pela bioquímica no sangue e LCR do doente ou por métodos imagiológicos funcionais e estruturais. Para além disso, alterações neuropsicológicas, principalmente de memória episódica e fatores de risco associados também são úteis.(45)

Quanto a biomarcadores em fase de estudo, e conseqüentemente, ainda com pouco valor no diagnóstico da DA, verificam-se: biomarcadores de imagiologia funcional, como a redução do fluxo de sangue cerebral, medido pela SPECT e a diminuição do metabolismo de glicose, medido na FDG-PET; os marcadores de disfunção sináptica, relacionados com a perda de Ach e biomarcadores inflamatórios, relacionados com processos patológicos que ocorrem no cérebro.(45) Uma das possíveis classificações destes biomarcadores encontra-se resumida na tabela seguinte (Quadro 3.3).

**Quadro 3.3.** Classificação dos biomarcadores de diagnóstico da DA.(12)(45)(33)(44)

Os biomarcadores precedidos por um “\*” ainda se encontram em fase de estudo.

		Marcadores de patologia amiloide	Marcadores de lesão neuronal	Marcadores Inflamatórios	Marcadores de disfunção sináptica
<b>Bioquímicos</b>	<u>LCR</u>	Aβ42 e Aβ40 *oligómeros Aβ *Presinilinas *BACE-1 *sAPPα/sAPPβ	T-tau P-tau	-	*↓níveis de ACh
	<u>Sangue</u>	Aβ42	*Proteínas relacionadas com a proteína tau: GSK-3 e PKC	*IL-1 *TNF-α *IL-8	-
<b>Imagiológicos</b>	<u>Estrutural</u>	-	Atrofia de áreas cerebrais em RMN	-	-
	<u>Funcional</u>	Depósito de placas amiloides, na PET-PiB	*↓ Fluxo de sangue para o cérebro, medido na SPECT *↓ Metabolismo de glucose medido na FDG-PET	-	*↓atividade de AChE

### 3.3.1 Biomarcadores da patologia amiloide

#### 3.3.1.1 Biomarcadores bioquímicos no LCR

O LCR reflete a composição do parênquima cerebral, uma vez que contacta diretamente com este e, como tal, deve alojar vários biomarcadores de doenças neurodegenerativas, tal como a DA. Além disso, as alterações na composição deste fluído biológico parecem preceder as primeiras modificações anatómicas no cérebro, observadas em RMN. Contudo, o método de colheita por punção lombar é relativamente invasivo, mesmo que os efeitos secundários ocorram em menos de 2% dos doentes.(139)

#### Aβ42 e Aβ40

Como anteriormente mencionado, os mecanismos que se encontram na base da patologia da DA ainda não estão totalmente esclarecidos. Contudo, evidências patológicas e genéticas sugerem que o péptido Aβ, particularmente Aβ42, está altamente envolvido no processo patológico da DA. Este péptido pode ser medido diretamente no LCR e também no plasma sanguíneo, pelo método ELISA (*Enzyme Linked*



*Immunosorbent Assay*). Porém, são os seus níveis no LCR que refletem a presença e extensão dos depósitos cerebrais de A $\beta$ .(12)(45) Existem várias isoformas desta proteína, sendo as mais importantes para o contexto, a A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, que existem numa razão de 10:1 no cérebro.(11)

A A $\beta$ 40, apesar de ser mais abundante, é a isoforma mais solúvel e menos propensa a formar placas amiloides, sendo portanto considerada a menos neurotóxica. Comparativamente a indivíduos cognitivamente saudáveis, os níveis de A $\beta$ 40 no LCR em doentes de Alzheimer variam de poucas a nenhuma alterações ou, em alguns casos, podem estar ligeiramente aumentados. Desta forma, verifica-se um elevado grau de sobreposição entre doentes de Alzheimer e os grupos-controlo.(140)

Por sua vez, a A $\beta$ 42 é a isoforma menos abundante e mais insolúvel, sendo portanto mais neurotóxica e mais propensa a agregar-se no cérebro, formando facilmente placas de  $\beta$ -amiloide. A análise dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR revela uma redução significativa dos mesmos em doentes de Alzheimer quando comparados a grupos-controlo, tendo sido sugerido que esta é causada por um défice na eliminação desta proteína do cérebro para o LCR e corrente sanguínea, assim como por uma maior agregação e deposição em placas desta proteína no cérebro (tabela 3.1).(141)

**Tabela 3.1.** Desempenho do biomarcador A $\beta$ 42 no LCR na diferenciação entre Doentes de Alzheimer e controlos saudáveis. O símbolo “↓” significa que se verificou uma diminuição dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR em doentes de Alzheimer comparativamente aos controlos Adaptado de (39)

Autor	Ano	Método	n (DA/Controlos)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Níveis A $\beta$ 42
<i>Hulstaert</i>	1999	ELISA	150/100	78	81	↓
<i>Sjogren</i>	2000	ELISA	60/32	93	85	↓
<i>Rosler</i>	2001	ELISA	27/49	78	100	↓
<i>Mulder</i>	2002	ELISA	20/20	100	95	↓
<i>Riemenschneider</i>	2002	ELISA	74/40	89	95	↓
<i>Sjogren</i>	2002	ELISA	19/17	100	94	↓
<i>Kapaki</i>	2003	ELISA	49/49	82	80	↓
<i>Maddalena</i>	2003	ELISA	51/31	78	90	↓
<i>Rosso</i>	2003	ELISA	18/13	89	85	↓
<i>Lewczuk</i>	2004	ELISA	22/35	100	83	↓

Num estudo com doze doentes de Alzheimer e doze controlos saudáveis, verificou-se que a taxa de clearance de A $\beta$  para o CSF estava reduzida em 30% nos doentes de Alzheimer, ao passo que a produção desta mesma proteína se manteve inalterada.(93) Um estudo populacional demonstrou uma forte correlação inversa entre os níveis de A $\beta$ 42 no

LCR e os depósitos de A $\beta$  observados nas regiões do neocórtex e hipocampo.(142) Porém, a diminuição dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR também é observada noutras patologias, que não apresentam depósitos de  $\beta$ -amiloide, tais como: Doença de Creutzfeldt-Jacob, Demência de Corpos de Lewy e Esclerose Lateral Amiotrófica.(143)(144) As medições dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR, pelo método ELISA, conseguem estabelecer um diagnóstico diferencial entre doentes de Alzheimer e indivíduos cognitivamente saudáveis com uma sensibilidade e especificidade de 86% e 90%, respetivamente.(39) As mesmas medições revelam concentrações de A $\beta$ 42 no LCR compreendidas entre 600 e 1230 pg/ml, em indivíduos cognitivamente normais, e entre 260 a 500 pg/ml em doentes de Alzheimer.(145)(146) Alguns autores sugerem que os níveis de A $\beta$  podem servir como um bom preditor do risco de evolução de DCL para DA, uma vez que foram relatados níveis reduzidos no LCR de idosos saudáveis assintomáticos, que passam a desenvolver DA 1 a 2 anos após acompanhamento.(12)

Num estudo da ADNI (em inglês, *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*) verificou-se uma correlação entre o decréscimo dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR e a elevada taxa de atrofia hipocampal em doentes de Alzheimer em fase inicial.(147) Noutros estudos, demonstrou-se também que o declínio dos níveis de A $\beta$ 42 no LCR estão também relacionados com a atrofia cerebral em indivíduos com DCL devido a DA e em alguns indivíduos cognitivamente saudáveis. (40)(148) Contudo, existem outros estudos em que estas associações não foram confirmadas.(149)

As isoformas do péptido A $\beta$  mais abundantes no LCR são, por ordem crescente de concentração, A $\beta$ 40, A $\beta$ 38 e A $\beta$ 42. Na DA, como referido anteriormente, os níveis no LCR da isoforma A $\beta$ 40 costumam manter-se estáveis, podendo em alguns casos encontrar-se ligeiramente aumentados. Contudo, as medições da concentração desta isoforma de A $\beta$  no LCR são muito instrutivas, isto porque refletem aproximadamente a quantidade total de péptido A $\beta$  que é libertado neste fluido biológico.(144) Uma vez que os indivíduos que produzem mais A $\beta$ , através do metabolismo da APP pela via amiloidogénica, vão ter concentrações deste péptido mais elevadas no LCR, foi proposto que a razão A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 pode constituir um biomarcador mais preciso no diagnóstico diferencial entre doentes de Alzheimer e grupos-controlo, pois permite retificar os erros na interpretação dos resultados biológicos correspondentes apenas aos níveis de A $\beta$ 42 no LCR.(150)

Paralelamente às isoformas do péptido A $\beta$  já referidas, outras são produzidas através da regulação fisiológica pela  $\gamma$ -secretase. Parte da investigação atual concentra-se na identificação de novas isoformas desta proteína, com o objetivo de melhorar o diagnóstico diferencial, visto que as diferentes isoformas apresentam perfis específicos consoante o tipo de afeção neurológica.(150)

#### Oligómeros A $\beta$

Pensa-se que os oligómeros A $\beta$  (solúveis) sejam mais tóxicos que as placas de A $\beta$  (insolúveis). Em estudos *in vivo*, verificou-se que estes podem inibir a potenciação a longo-termo do hipocampo e provocar a hiperfosforilação da tau e distrofia neurítica. Já foram publicadas várias sugestões de métodos analíticos com capacidade de quantificar os oligómeros A $\beta$  no LCR. Estes estudos mostram que o nível de oligómeros A $\beta$  no LCR é muito baixo, provavelmente inferior a 1% dos níveis totais de A $\beta$  no LCR e, por isso, torna-se difícil quantificá-los de forma acurada.(151)(152)

Alguns estudos, detetaram níveis elevados no LCR de oligómeros A $\beta$  em doentes de Alzheimer, quando comparados com grupos-controlo. Contudo, noutros estudos não se verificam quaisquer alterações nos níveis de oligómeros A $\beta$  no LCR, entre estes dois grupos de indivíduos. Para além das dificuldades técnicas na quantificação de pequenas quantidades de oligómeros A $\beta$  no LCR, também é possível que os diferentes métodos analíticos usados para o efeito meçam diferentes variantes dos oligómeros A $\beta$ , o que pode explicar a divergência dos resultados obtidos em diferentes estudos.(153)

#### BACE-1

Para que o péptido A $\beta$  seja produzido a APP tem de ser processada pela via amiloidogénica, na qual é clivada por duas enzimas diferentes:  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. A principal  $\beta$ -secretase presente no cérebro é denominada BACE-1. São vários os estudos que têm investigado os níveis de BACE-1 no LCR em doentes com DCL e DA, mas os resultados nem sempre são concordantes. Três pequenos estudos verificaram que os doentes de Alzheimer apresentam níveis elevados de atividade BACE-1 quando comparados com indivíduos cognitivamente saudáveis e doentes com outros tipos de demência. (153) Outro estudo, demonstrou níveis mais elevados de BACE-1 em doentes com DCL e DA quando comparados com controlos saudáveis. Por outro lado, noutros estudos não foram detetadas diferenças nos níveis de BACE-1 entre doentes com DCL e DA e indivíduos saudáveis. (154)

Quando os doentes de Alzheimer foram subdivididos em DA moderada e DA grave, verificou-se um aumento da atividade da BACE-1 no grupo com DA moderada. Estes estudos indicam que a atividade BACE-1 pode-se encontrar aumentada nas fases iniciais da DA, mas a sua utilidade no diagnóstico pode ser limitada. Pode no entanto ser útil nos ensaios clínicos de fármacos inibidores da BACE-1.(153)

#### sAPP $\alpha$ /sAPP $\beta$

Os níveis de sAPP $\alpha$  e sAPP $\beta$  correlacionam-se muito bem em doentes de Alzheimer assim como em grupos-controlo. Porém, vários estudos falharam em detetar alguma diferença nos níveis destes biomarcadores entre estes dois grupos de indivíduos. Um desses estudos detetou níveis elevados de sAPP $\beta$  em doentes com DCL quando comparados com controlos saudáveis. Outro estudo verificou que doentes com DCL que mais tarde viriam a desenvolver DA apresentavam níveis de sAPP $\beta$  mais elevados do que aqueles que estabilizavam. Contudo, noutro estudo que pretendeu demonstrar o mesmo que o anterior, não se observaram diferentes níveis de sAPP entre doentes com DCL devido a DA e aqueles com DCL não demencial. Estudos que compararam doentes com DCL ou demência (comprovada por biomarcadores) com controlos saudáveis, verificaram que o primeiro grupo apresentava níveis elevados de sAPP $\alpha$  e sAPP $\beta$ , embora existissem sobreposições entre os grupos. Desta forma, o valor de diagnóstico destes biomarcadores parece ser limitado. Contudo, estas proteínas podem ser usadas no estudo dos efeitos metabólicos da APP em ensaios clínicos.(153)

#### **3.3.1.2 Marcadores bioquímicos no sangue**

O diagnóstico de rotina da DA, e outros tipos de demência, a partir do LCR apresenta inúmeros inconvenientes, tais como, o facto do método de colheita por punção lombar ser invasivo com potenciais efeitos secundários, tornando problemática a monitorização do doente ao longo do tempo. Como tal, existe uma necessidade clara de procurar por biomarcadores noutros fluidos corporais. Embora a saliva e urina sejam facilmente colhidas, as análises ao sangue são o método *gold standard* nos laboratórios de análises clínicas.(11)

A $\beta$ 42 e A $\beta$ 40 periférico

Os níveis do péptido A $\beta$  também podem ser detetados no plasma sanguíneo, através da técnica ELISA. No entanto, possuem fraca magnitude no diagnóstico da patologia. Tal acontece porque embora as medições sejam precisas, estas também são portadoras de incertezas e fatores de confusão, devido a:(11)(140)

- A expressão de A $\beta$  ser influenciada por medicamentos;(155)
- A $\beta$  ter uma capacidade de ligação não específica a proteínas plasmáticas, o que acaba por alterar os valores medidos no sangue, num grau que varia de acordo com as condições metabólicas de cada indivíduo;(11)(140)
- Os níveis de A $\beta$  no sangue flutuarem ao longo do tempo e entre os indivíduos e podendo diferir nos diferentes estádios da DA;(11)
- Haver um aumento significativo de A $\beta$ 42 no sangue em mulheres com DCL, mas não em homens, quando comparados com indivíduos da mesma faixa etária e cognitivamente saudáveis;(156)
- As plaquetas conterem elevadas quantidades de A $\beta$ , o que afeta diretamente os níveis plasmáticos. Estas expressam a APP e a maquinaria das secretases e produzem principalmente A $\beta$ 40, que desempenha um papel importante na agregação plaquetária.(157)

Não obstante, estudos mais recentes neste campo têm revelado um aumento da confiança no seu valor de diagnóstico. Num estudo de coorte, encontrou-se uma associação entre elevados níveis de A $\beta$ 40 e baixos níveis de A $\beta$ 42 com o risco de desenvolver DA. Noutro estudo, que comparava os níveis plasmáticos desta proteína em três grupos de indivíduos: grupo com DA esporádica, grupo com DCL e o grupo-controlo. Concluiu-se que a diminuição de A $\beta$ 42 plasmática é preditiva de DA, especificamente da transição de um estado cognitivo normal ou DCL para DA.(140)

Em alguns estudos transversais os resultados mais comuns são o declínio dos níveis de A $\beta$ 42 e aumento ou manutenção dos níveis de A $\beta$ 40, associados a um declínio cognitivo, o que aumenta a credibilidade da razão A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 como potencial biomarcador da DA.(158)(159) Em contraste, níveis elevados de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 encontram-se associados a um baixo risco de demência.(158) Por outro lado, outros estudos não têm verificado qualquer associação entre os níveis de A $\beta$ 42 e o risco de desenvolver DA.(160) As divergências nos resultados obtidos em diferentes estudos, podem ser atribuídos

principalmente a: diferenças nas populações em estudo; diferentes períodos de *follow-up* e variações nos métodos de análise utilizados. Uma evidência que se tem demonstrado comum em estudos transversais e longitudinais é o facto de, contrariamente ao que ocorre no LCR, haver um aumento brusco dos níveis de A $\beta$ 42 periféricos antes do início do declínio cognitivo.(161)

Resultados recentes de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ajudaram a entender melhor a dinâmica dos níveis de A $\beta$  periférico e a sua relação com a cognição. Num estudo com 1125 indivíduos saudáveis, a diminuição dos níveis de A $\beta$ 42 e o baixo valor de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, foram associados a um início de declínio nas funções cognitivas.(162) Noutro estudo, com 481 mulheres saudáveis na faixa etária dos 65 anos, seguidas durante dez anos, verificou-se que os valores iniciais de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 periférico que se apresentaram baixos, estavam associados a um declínio cognitivo mais acentuado ao fim de 10 anos.(159) Acrescenta-se que, noutro estudo, onde foram acompanhados 997 indivíduos saudáveis durante 9 anos, naqueles que apresentaram um baixo valor inicial de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 periférico combinado com uma baixa escolaridade, verificou-se um maior declínio cognitivo após os 9 anos de *follow-up*.(163)

As evidências relativas à correlação entre os níveis de A $\beta$  no plasma e os depósitos de A $\beta$  no cérebro, só agora se estão a começar a conhecer. Num pequeno estudo caso-controlo de 20 doentes com DCL e 19 controlos saudáveis, os baixos valores de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 foram associados a uma maior retenção de PiB na PET, sendo esta relação mais pronunciada nos doentes de DCL.(164) Num estudo transversal com 1032 doentes, foram detetados valores baixos de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 em doentes com DCL e DA, em comparação com doentes cognitivamente saudáveis. Para além disso, 255 destes indivíduos foram analisados através das técnicas imagiológicas RMN e PiB-PET, tendo sido observada uma correlação inversa entre os valores de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 e a intensidade de ligação de PiB aos depósitos  $\beta$ -amiloides.(165)

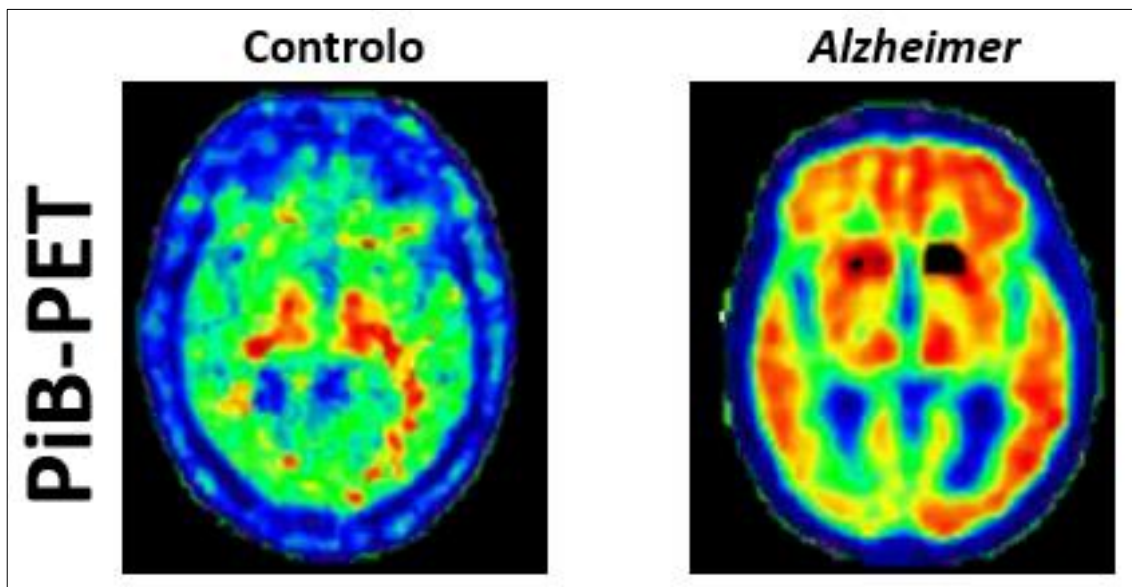
### **3.3.1.2 Biomarcadores de Imagiologia Funcional**

A Medicina Nuclear é uma técnica que utiliza radioisótopos para o diagnóstico, tratamento e estudo de algumas doenças, sendo uma das áreas mais emergentes da Imagiologia Nuclear que permite a visualização, caracterização e quantificação de sistemas *in vivo*. As técnicas de imagiologia, sendo não-invasivas, são atualmente

bastante utilizadas no meio clínico pois permitem uma visualização com grande detalhe das estruturas anatómicas e fisiológicas do corpo humano, sem causar dor ou desconforto. Os métodos imagiológicos mais utilizados atualmente são: a TC (tomografia computadorizada), raio-X, PET e RMN.(11)

#### Depósitos de placas $\beta$ -amiloide no cérebro

A acumulação extracelular de depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide, é a principal característica patológica da DA. Estes podem ser visualizados e quantificados através da Tomografia com Emissão de Positrões (PET) com o auxílio de um ligando específico para  $A\beta$ , Composto B de Pittsburgh (PiB), marcado com o radioisótopo carbono-11 ( $^{11}C$ ) (figura 3.2). O ligando PiB liga-se com grande afinidade aos agregados fibrilares de  $A\beta$  (Placas Neuríticas), mas não aos agregados amorfos e difusos (Placas difusas) nem às tranças neurofibrilares.(166)(167)



**Figura 3.2.** Diferenças observadas nas imagens PiB-PET obtidas de um indivíduo cognitivamente saudável (controlo) e de um doente de Alzheimer. Adaptado de *Cedazo-Minguez*.(167)

Os resultados obtidos pela PiB-PET demonstraram uma boa correlação com os depósitos  $A\beta$  detetados no tecido cerebral durante a autópsia ou biópsia cerebral.(168) Acrescenta-se que os resultados obtidos a partir desta técnica imagiológica também se correlacionam com as quantidades de  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  insolúveis, presentes no tecido cerebral *post-mortem*.(169) Verifica-se também que a retenção de PiB em doentes de Alzheimer, é mais intensa no córtex lateral frontal, córtex cingulado posterior, regiões do

lobo parietal medial e lateral e do lobo temporal lateral, que correspondem às regiões conhecidas de deposição amiloide na patologia da DA.(170)

Esta técnica imagiológica distingue eficazmente doentes de Alzheimer de indivíduos cognitivamente saudáveis.(171) Contudo, também pode ocorrer retenção de PiB em indivíduos saudáveis, quase 30-40% dos indivíduos a partir dos 80 anos. Cinco em cada seis idosos com mais de 85 anos apresentam retenção de PiB indicadora de uma elevada deposição amiloide.(172) Por outro lado, sabe-se também que indivíduos com DCL diagnosticado clinicamente e que apresentam elevada retenção de PiB na PET, têm uma maior probabilidade de evoluírem para DA, quando comparados com aqueles que não apresentam retenção de PiB.(173)

Por fim, as limitações do uso clínico do PET-PiB são: o curto tempo de meia-vida ( $t_{1/2}=20$  minutos) do ligando PiB, o facto de ser um método imagiológico dispendioso e, por isso, pouco acessível e a exposição dos indivíduos à radiação. Com a finalidade de ultrapassar estas limitações, estão a ser desenvolvidos novos radiofármacos específicos para depósitos de  $\beta$ -amiloide, tais como: o florbetabeno e o florbetapir ( $^{18}\text{F}$ ). (173) São as medições de A $\beta$ 42 no LCR e as medições PiB que refletem a deposição de A $\beta$  no cérebro, estando fortemente correlacionados.(45)(174)

### **3.3.2 Biomarcadores de Lesão Neuronal**

#### **3.3.2.1 Biomarcadores bioquímicos no LCR**

##### T-tau e P-tau

Como marcador bioquímico com utilidade clínica no diagnóstico da DA e prognóstico da progressão de DCL para DA, existe a proteína Tau na sua forma normal (T-tau) e fosforilada (P-tau). Em indivíduos cognitivamente saudáveis (controlos) verificou-se que os níveis de T-tau no LCR variam com a idade: <300 pg/ml (21-50 anos); <450 pg/ml (51-70 anos) e <500 pg/ml (> 70 anos). Em doentes de Alzheimer, os níveis de T-tau encontram-se significativamente aumentados, quando comparados a controlos saudáveis da mesma faixa etária (tabela 3.2), com valores *cut-off* superiores a 600 pg/ml.(11)(39) Porém, como referido anteriormente, a T-tau é mais um indicador de lesão neuronal do que um biomarcador específico da DA, isto porque, também se observa uma variação nos níveis desta proteína noutras neuropatologias, tais como: a Doença de Creutzfeldt-Jacob



(CJD), Demência Frontotemporal (FTD); Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP) e Demência com Corpos de Lewy (CBD).(175) Os níveis de T-tau na CJD encontram-se drasticamente aumentados, comparativamente com qualquer outra doença neurodegenerativa, incluindo a DA. Estima-se que o limiar da concentração de T-tau na CJD seja de 1300 pg/ml.(176)

A T-tau também pode funcionar como biomarcador de prognóstico na conversão de DCL a DA, isto porque em 90% dos casos de DCL que mais tarde progrediram para DA, mas em nenhum dos casos de DCL estável, foram detetados níveis elevados de T-tau no LCR.(39) Casos de conversão de DCL para DA podem ser discriminados de DCL estável, com sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, através da medição ELISA da concentração desta proteína no LCR.(12)

**Tabela 3.2.** Desempenho do biomarcador T-tau no LCR na diferenciação entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis. O símbolo “↑” significa que se verificou um aumento dos níveis de T-tau no LCR em doentes de Alzheimer comparativamente aos controlos. Adaptado de (39)

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Método</b>	<b>n (DA/Controlos)</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>Níveis T-Tau</b>
<i>Andreasen</i>	1999	ELISA	407/93	93	86	↑
<i>Sjogren</i>	2000	ELISA	60/32	79	82	↑
<i>Sjogren</i>	2001	ELISA	41/17	85	95	↑
<i>Buerger</i>	2002	ELISA	80/21	81,3	91	↑
<i>Hu</i>	2002	ELISA	52/56	79	100	↑
<i>Riemenschneider</i>	2002	ELISA	74/40	95	98	↑
<i>Shoji</i>	2002	ELISA	366/316	59	97	↑
<i>Kapaki</i>	2003	ELISA	49/49	88	96	↑
<i>Wallin</i>	2003	ELISA	39/12	72	93	↑
<i>Jia</i>	2005	ELISA	39/35	63	89	↑

No que diz respeito aos níveis de P-tau, verifica-se que estes se encontram particularmente aumentados em doentes de Alzheimer, quando comparada com “controlos” saudáveis ou doentes com outro tipo de demências, tais como, FTD e demência vascular (tabela 3.3).(170)

**Tabela 3.3.** Desempenho dos biomarcadores P-tau181 e P-tau231 no LCR na diferenciação entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis. O símbolo “↑” significa que se verificou um aumento dos níveis de P-tau no LCR em doentes de Alzheimer comparativamente aos controlos Adaptado de (39)

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>P-tau isoforma</b>	<b>n (DA/Controlos)</b>	<b>Sensibilidade de (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>Níveis P-Tau</b>
<i>Parnetti</i>	2001	P-tau <sub>181</sub>	80/40	84	88	↑
<i>Sjogren</i>	2001	P-tau <sub>181</sub>	41/17	44	95	↑
<i>Sjogren</i>	2002	P-tau <sub>181</sub>	19/17	58	94	↑
<i>Maddalena</i>	2003	P-tau <sub>181</sub>	51/31	84	84	↑
<i>Riemenschneider</i>	2003	P-tau <sub>181</sub>	42/43	88	100	↑
<i>Rosso</i>	2003	P-tau <sub>181</sub>	18/13	89	85	↑
<i>Humpel</i>	2004	P-tau <sub>181</sub>	108/23	85	91	↑
<i>Kohnken</i>	2000	P-tau <sub>231</sub>	27/31	85	97	↑
<i>Buerger</i>	2002	P-tau <sub>231</sub>	82/21	100	91	↑
<i>Humpel</i>	2004	P-tau <sub>231</sub>	108/23	85	96	↑

Outros estudos, também demonstraram um aumento nos níveis de P-tau na DA e DCL.(177) Além disso, o declínio cognitivo encontra-se relacionado com o aumento dos níveis de P-tau, o que indica que este biomarcador pode marcar especificamente um processo cerebral degenerativo.(178)

Algumas fosforilações são mais específicas para a DA. Os níveis da tau fosforilada na serina-181 (P-tau<sub>181</sub>) ou na treonina-231 (P-tau<sub>231</sub>), parecem melhorar claramente a exatidão do diagnóstico da DA.(38) Os níveis de P-tau<sub>181</sub> no LCR aumentam significativamente em doentes de Alzheimer, quando comparados com “controlos” saudáveis, apresentando uma sensibilidade de 80% e especificidade de 92% na discriminação de casos de DA dos controlos saudáveis.(167) As medições ELISA da P-tau<sub>181</sub>, revelam níveis desta proteína no LCR de 30-50 pg/ml em “controlos” saudáveis e entre 70-100 pg/ml em doentes de Alzheimer.(145) Esta forma fosforilada da tau permite também distinguir a DA de outro tipo de etiologias neurodegenerativas com elevada sensibilidade e especificidade. Por exemplo, as medições de P-tau<sub>181</sub> são capazes de diferenciar a DA da FTD com uma sensibilidade de 85% e especificidade superior a 80%.(179) Estes resultados são semelhantes na diferenciação entre DA e outro tipo de

demências neurodegenerativas.(38) Além disso, a P-tau<sub>181</sub> reflete a neuropatologia da DA uma vez que a sua concentração no LCR se correlaciona com as quantidades de TNFs detetadas na autópsia.(180) Por sua vez, a P-tau<sub>231</sub>, aparece precocemente no processo patológico da DA, e também é capaz de diferenciar doentes de DA de indivíduos cognitivamente saudáveis com elevada sensibilidade e especificidade (90%).(181) Para além disso, a P-tau<sub>231</sub> mostrou também um declínio longitudinal durante o processo patológico da DA, o que permite ter uma ideia da severidade da demência. É prioritário desenvolver ELISAs sensíveis e específicas para outras isoformas de P-tau (tais como, P-tau<sub>235</sub>, P-tau<sub>199</sub>, P-tau<sub>396</sub> e P-tau<sub>404</sub>) de forma a melhorar o repertório de diagnóstico precoce da DA.(182)

A razão T-tau/A $\beta$ <sub>42</sub> aumenta a especificidade do diagnóstico diferencial da DA comparativamente a controlos saudáveis ou com outros tipos de demência. A especificidade desta razão na diferenciação entre a DA e a demência vascular é superior a 80%, sendo contudo menos eficiente na diferenciação entre DA e DLB.(183) Outro estudo, verificou que esta razão T-tau/A $\beta$ <sub>42</sub> permite prever alterações cognitivas em indivíduos assintomáticos em até oito anos antes do início dos sintomas clínicos da DA.(184) De forma semelhante, a razão P-tau<sub>181</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub> surge como um elemento importante no diagnóstico diferencial da DA. Esta permite distinguir doentes de Alzheimer daqueles com FTD com uma sensibilidade e especificidade superior a 80%.(185)

### **3.3.2.2 Biomarcadores bioquímicos no sangue**

#### Enzimas relacionadas com a proteína Tau

As concentrações da proteína Tau no plasma sanguíneo encontram-se, na sua maioria, abaixo dos limites de deteção. Nas patologias relacionadas com a Tau, estão implicadas alterações na função das proteínas cinases e fosfatases. As cinases que contribuem para a hiperfosforilação da tau, incluem: a glicogénio cinase sintase-3 (GSK-3), cinase dependente ciclina-5 (cdk5), cinase reguladora afinidade microtúbulo (MARK) e a proteína cinase C (PKC). Por sua vez, a fosfatase 2A contribui para a desfosforilação da tau.(186)

Foi demonstrado que a GSK-3 se encontra significativamente aumentada nos leucócitos em doentes com DA ou DCL, quando comparados com controlos saudáveis.(187) Contrariamente, noutros estudos, foram detetados níveis reduzidos de

GSK-3 em células mononucleares presentes na circulação sanguínea periférica, o que indica uma elevada variabilidade deste biomarcador.(188)

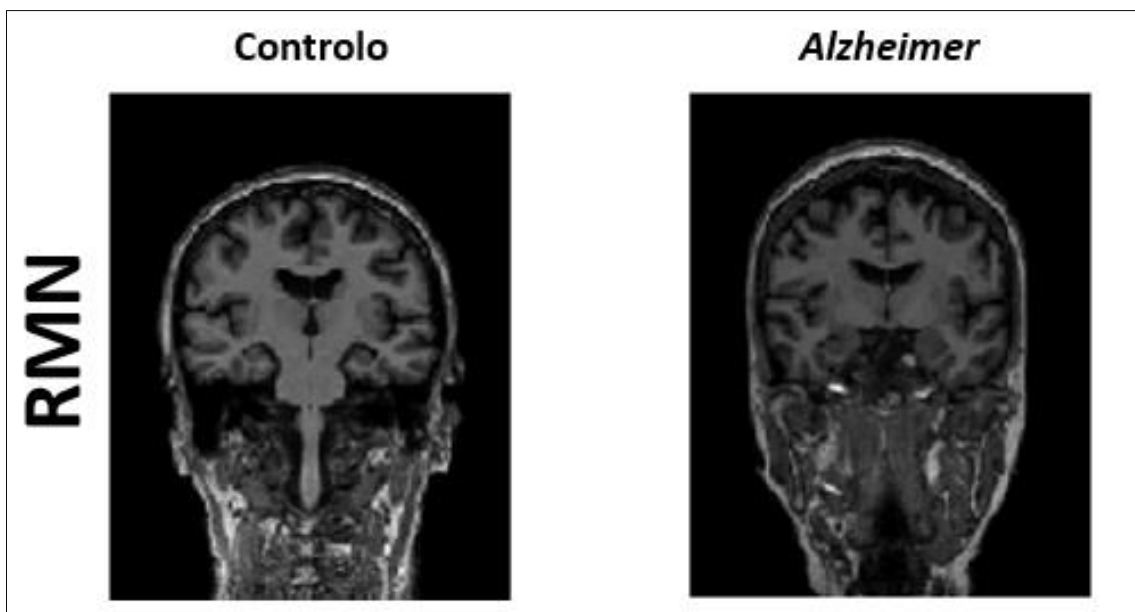
A PKC está alterada nos fibroblastos, linfócitos e glóbulos vermelhos dos doentes de Alzheimer, o que apoia a ideia de que a conformação da desta proteína nas células periféricas pode constituir um biomarcador com bom valor preditivo no diagnóstico precoce da DA.(189)

Apesar disto, atualmente os biomarcadores periféricos associados à proteína tau, não têm utilidade no diagnóstico da DA.(11)

### **3.3.2.3 Biomarcadores Imagiológicos**

#### Biomarcadores de Imagiologia Estrutural

Em estudos estruturais de RMN, identificam-se áreas “chave” de atrofia cerebral, tais como o lobo temporo-medial, que reflete a perda de volume entorrinal e hipocampal, e o córtex cingulado posterior, o que conduz à dilatação do sistema ventricular e alargamento dos sulcos corticais (figura 3.3). Em estudos longitudinais, mostrou-se que a aceleração anual da taxa de atrofia hipocampal e as taxas de atrofia cortical e expansão ventricular são bons preditores de progressão de DCL para DA. Na revisão de estudos prévios neste campo, apuraram-se valores de precisão entre 56% e 82%.(12)(45)(44)

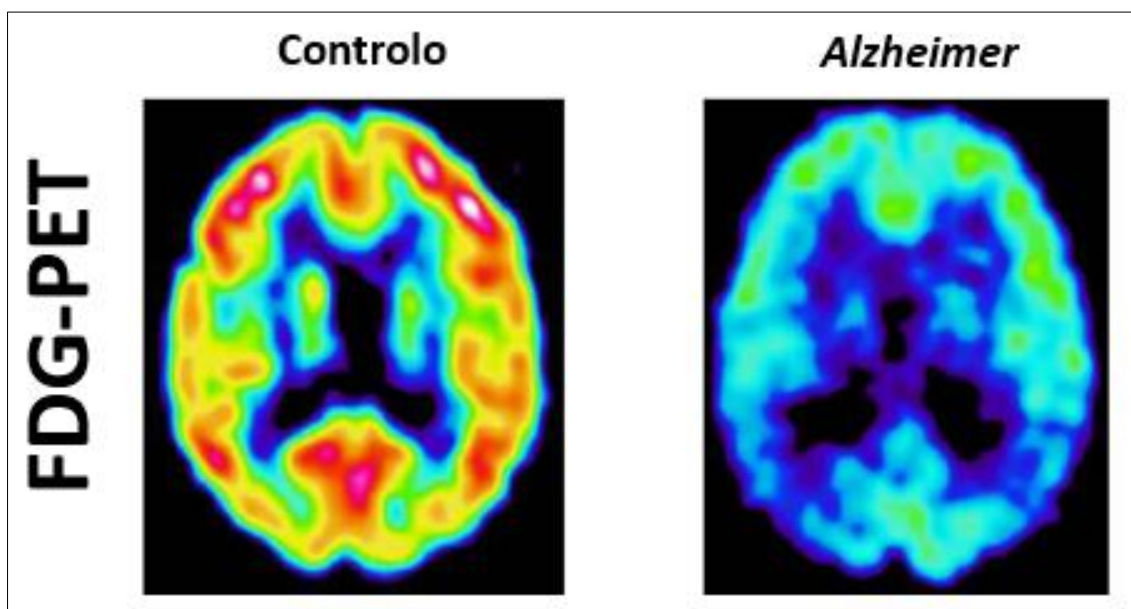


**Figura 3.3.** Diferenças observadas nas imagens RMN obtidas de um indivíduo cognitivamente saudável (controlo) e de um doente de Alzheimer. Adaptado de *Ceedazo-Minguez*.(167).

De acrescentar também que outro dos aspetos neuropatológicos da atrofia cerebral é que esta ocorre nas regiões límbicas e pode ser cortical e/ou central. Isto é relevante para diferenciar casos de início precoce de DA dos de início tardio. Nos casos de início precoce, a atrofia cortical é mais pronunciada. Por outro lado, nos casos de início tardio, a atrofia central é mais proeminente. Para além disto, na DA há aspetos macroscópicos específicos importantes, como a atrofia dos bulbos e trato olfatório e o encolhimento do hipocampo com aumento do corno temporal dos ventrículos laterais.(174)

#### Biomarcadores de Imagiologia Funcional

O FDG (2-Fluoro-2-desoxi-D-glicose) é um marcador imagiológico do metabolismo de glicose no cérebro na PET (figura 3.4). O mesmo permite identificar os défices de metabolismo da glicose na região temporoparietal. Tal défice metabólico correlaciona-se com défices neuropsicológicos e aumenta com a progressão da doença, tornando o mesmo um meio mais sensível de acompanhar a progressão e severidade da doença.(12) Outros estudos FDG-PET demonstraram défice substancial no córtex de associação temporoparietal e cingulado posterior em indivíduos com DCL que progrediram rapidamente para DA.(44)



**Figura 3.4.** Diferenças observadas nas imagens FDG-PET obtidas de um indivíduo cognitivamente saudável (controlo) e de um doente de Alzheimer. Adaptado de *Cedazo-Minguez*.(167)

Todos estes achados, apesar de não serem específicos para a DA, fornecem evidências acerca do estágio ou severidade da doença que não podem ser dadas pelas medições do péptido A $\beta$ .(45)

Em estudos comparativos que combinaram diferentes marcadores num modelo de previsão de DCL, a FDG-PET, juntamente com os testes de memória episódica, eram fortes preditores da transição clínica para DA, enquanto os marcadores no LCR primeiramente refletiam a taxa de declínio cognitivo, independentemente da severidade da doença. Conclui-se que FDG-PET tem mais informação prognóstica.(44)

#### Tomografia Computorizada por emissão de fóton único (SPECT)

NA SPECT, que mede o fluxo de sangue cerebral, verifica-se uma redução do fluxo sanguíneo no córtex temporoparietal nos pacientes com DA. No entanto, este achado continua ainda em fase de estudo, não podendo prever a progressão de casos de DCL para DA.(45)

### **3.3.3 Biomarcadores de disfunção sináptica**

Nesta patologia, há perda progressiva da acetilcolina (ACh) do córtex e do hipocampo. Sugere-se que esta perda está altamente correlacionada com o declínio cognitivo.(11) As mudanças bioquímicas associadas ao processo patológico de DA que indicam a destruição sináptica e neuronal são:(174)

- Diminuição da atividade de acetilcolinesterase (AChE);
- Diminuição dos níveis de ACh, muito importante no processo de memória;
- Perda da atividade da enzima Colina-O-acetil-transferase.

Estas mudanças atingem o sistema colinérgico da base do cérebro e são as primeiras que aparecem comprometidas na DA. A perda neuronal colinérgica está diretamente relacionada com as manifestações de DA. Esta ocorre a nível do núcleo basal de Meynert (o ponto de partida ascendente do sistema colinérgico), que conduz ACh ao córtex e hipocampo e atinge 90% da inervação.(174) Marcadores colinérgicos vistos em imagens funcionais permitem também medir a atividade de AChE, a sua ligação a recetores nicotínicos e muscarínicos e o transporte vesicular de ACh. Sugere-se que estes marcadores são mais sensíveis às mudanças precoces no cérebro que o metabolismo de glucose.(12)

### **3.3.4 Biomarcadores Inflamatórios: Citocinas e Quimiocinas**

A DA caracteriza-se também pela sobre-expressão das respostas imunes inatas no cérebro, resultando em processos inflamatórios que culminando em dano e destruição neuronais.(12) Um processo de inflamação crónica está implicado na cascata neuropatológica da Doença de Alzheimer (DA). Os componentes inflamatórios na DA incluem: a microglia, astrócitos, sistema do complemento e vários mediadores inflamatórios, nos quais se incluem as citocinas e quimiocinas. A maioria dos estudos da DA concentram-se na atividade das células neuronais, mas há indícios que sugerem que as células gliais têm um papel importante no processo patológico da DA, sendo responsáveis pela degeneração neuronal. Neste contexto, foi proposto que as citocinas secretadas pela microglia, astrócitos e/ou neurónios podem induzir a síntese de certas proteínas de fase-aguda, tais como a APP. Da mesma forma, foi demonstrado que o péptido A $\beta$  é capaz de induzir a expressão da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 nos astrócitos e microglia em meios de cultura. Então, foi estabelecida uma correlação direta entre a neurotoxicidade induzida por A $\beta$  em condições neurodegenerativas e a produção de citocinas. (11)

A barreira hematoencefálica (BHE) restringe a troca de solutos polares, tais como a A $\beta$ , entre o cérebro e a corrente sanguínea devido à presença de tight junctions entre as células endoteliais do cérebro. A presença da BHE pode interferir com o movimento das moléculas cerebrais para o sangue periférico, comprometendo a validade dos biomarcadores. Estudos recentes sugerem um possível envolvimento das citocinas e quimiocinas sistémicas na patologia da DA, embora ainda esteja a ser debatido se a superprodução de citocinas no cérebro possa contribuir para o conjunto de citocinas periféricas por transbordamento do CNS ou se as citocinas periféricas possam afetar as funções cerebrais humanas por atravessamento da BHE e interação com o CNS.(45)

#### Citocinas e Quimiocinas periféricas na DA

A IL-1 $\beta$  encontra-se associada à A $\beta$  nas placas senis e aumenta a síntese e translação de mRNA da APP. A maior parte dos estudos que investigaram os níveis no soro e/ou plasma de IL-1 $\beta$  não detetaram diferenças entre doentes de Alzheimer e controlos saudáveis. Contudo, um estudo com 145 doentes de Alzheimer e 51 controlos verificou maiores concentrações desta interleucina em doentes de Alzheimer em comparação aos

indivíduos saudáveis. Esta discrepância pode ser explicada pelos baixos níveis de IL-1 $\beta$  no soro de indivíduos saudáveis, cumulado com a baixa sensibilidade do sistema ELISA utilizado. Por exemplo, os níveis de IL-1 $\beta$  apenas foram detetados em 13% dos doentes de Alzheimer e em 2% dos controlos.(190) Da mesma forma, noutro estudo, a maioria das amostras analisadas tinham níveis de IL-1 $\beta$  abaixo do limite de deteção do sistema de ELSIA utilizado (10 pg/ml).(191)

A IL-6 é uma citocina que medeia respostas imunes e reações inflamatórias que afetam o crescimento e diferenciação celular no SNC, sendo marcadamente induzida sob condições patológicas. Em indivíduos diagnosticados com “DA provável” os níveis de IL-6 no soro correlacionam-se com os seus níveis no LCR e os níveis no LCR de recetores desta interleucina encontram-se reduzidos em doentes de Alzheimer, sugerindo talvez um mecanismo de regulação compensatório da ativação aberrante de IL-6. Vários estudos reportaram níveis elevados de IL-6 no soro ou plasma de doentes de Alzheimer quando comparados com controlos, enquanto outros estudos foram incapazes de encontrar tais alterações.(12)(192)

A TNF- $\alpha$  parece ser um fator não-específico mas significativo no desenvolvimento de várias doenças neurológicas, incluindo depressão e demência. No mecanismo patogénico da DA, o TNF- $\alpha$  é produzido pela microglia ativada, principalmente na resposta aos péptidos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 e ao *stress* oxidativo. É consensual de que os níveis de TNF- $\alpha$  e o seu recetor aumentam com a idade em indivíduos saudáveis. Contudo, nos pacientes com DA os seus níveis estão diminuídos, comparativamente com o grupo controlo. Num estudo, verificou-se que as concentrações no soro deste fator de necrose tumoral se encontram diminuídas em indivíduos com demência quando comparados a controlos saudáveis. Acrescenta-se que, os níveis de TNF- $\alpha$  no soro são significativamente menores na DA inicial ou moderada quando comparados com a DA severa e demência vascular, sugerindo que existe uma diferença no perfil desta citocina nos diferentes estádios da DA, assim como, para diferentes tipos de demência.(192)

As quimiocinas são uma superfamília de citocinas quimiotáticas essenciais na ativação e migração de leucócitos em contextos fisiológicos e patológicos. A interleucina-8 (IL-8), uma quimiocina derivada da microglia produzida em resposta a sinais pró-inflamatórios tais como  $\beta$ -amiloide, podem ser importantes no recrutamento da microglia ativada para áreas do cérebro lesadas pela patologia da DA. Não foram encontradas



diferenças significativas nos níveis de IL-8 entre controlos saudáveis e doentes de Alzheimer ou entre os diferentes estádios da DA.(192)

A proteína quimiotática de monócitos (MCP) é um membro da família das quimiocinas que desempenha um papel importante nos processos inflamatórios, incluindo a aterosclerose e doenças neurodegenerativas. As células microgliais produzem MCP e estimulam os astrócitos, que em conjunto participam na degradação de péptidos A $\beta$ . A regulação ascendente de MCP-1 foi demonstrada em doenças neurodegenerativas (tais como a DA), e existe uma evidência que indica que os níveis plasmáticos de MCP-1 podem servir como biomarcadores para monitorizar o processo inflamatório da DA. É provável que os níveis de MCP-1 sejam influenciados pela idade, dado que num estudo da população japonesa foi demonstrada uma correlação entre a idade e os níveis elevados de MCP-1. Da mesma forma, o MCP-3 é a quimiocina mais potente capaz de regular os macrófagos e monócitos sendo que foi demonstrado que esta tem um papel importante no recrutamento e manutenção do infiltrado inflamatório. A MCP-3 é uma das 18 proteínas sinalizadores no plasma sanguíneo que podem ser usadas para discriminar entre doentes de Alzheimer e controlos com uma precisão de 90%.(192)

## **4. Conclusão**

Atualmente, os principais biomarcadores da Doença de Alzheimer encontram-se divididos em duas categorias, tendo por base a biologia das suas medições. Na primeira categoria encontram-se os biomarcadores de deposição da proteína  $\beta$ -amiloide, tais como: níveis diminuídos de A $\beta$ 42 no LCR e aumento da deposição amiloide identificada na PET-PiB. Na segunda categoria situam-se os biomarcadores de lesão neuronal, tais como: níveis elevados de tau (P-tau e T-tau) no LCR; atrofia das estruturas dos lobos temporais mesiais (hipocampos) e parietais em RMN; redução do metabolismo de glicose no cérebro, identificado na FDG-PET (em fase de estudo).

Tendo em conta a sua natureza, os biomarcadores do LCR assentam numa interpretação quantitativa, já os biomarcadores imagiológicos podem ser interpretados de ambas as formas, qualitativa e quantitativa. Em vários casos, os resultados dos biomarcadores, de acordo com uma interpretação qualitativa, irão ser “positivos”, aquando da presença do processo fisiopatológico subjacente à DA, ou “negativos”, quando o mesmo se encontra ausente. Contudo, em alguns casos, os resultados podem ser ambíguos ou indeterminados (“falsos positivos” ou “falsos negativos”).

De acordo com os mais recentes critérios de diagnóstico, propostos pelo *National Institute on Aging-Alzheimer’s Association* (NIA-AA), em indivíduos que cumpram os critérios clínicos principais para a DA, a evidência com biomarcadores pode aumentar a “certeza” de que o processo fisiopatológico característico da DA se encontra na base da síndrome de demência clínica. Contudo, ainda não se chegou a um consenso acerca da utilização dos biomarcadores em análises de rotina. As razões mais frequentemente apontadas para esta limitação, são: o facto dos critérios clínicos atuais fornecerem um rigor de diagnóstico satisfatório na maioria dos doentes; serem necessários mais estudos para assegurar que os critérios que incluem o uso dos biomarcadores foram desenvolvidos apropriadamente; ainda não existirem métodos padrão de análise globalmente aceites nem reprodutibilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios e, por último, o facto do acesso a estes biomarcadores ser limitado. Desta forma, nos dias de hoje, a utilização de biomarcadores pode ser útil em três circunstâncias: estudos de investigação dos mecanismos fisiopatológicos inerentes à DA e desenvolvimento de novos potenciais fármacos; ensaios clínicos (por exemplo, na seleção dos diferentes grupos de doentes ou

monitorização do efeito de novos fármacos) e também como ferramenta adicional de diagnóstico para ser usada se o médico assim o entender.

Por outro lado, e apesar da especificidade e sensibilidade demonstradas pelos biomarcadores do LCR no diagnóstico da DA, a sua utilidade em análises de rotina encontra-se limitada, principalmente, devido ao método de colheita invasivo por punção lombar. Como tal, existe uma necessidade clara de procurar por biomarcadores noutros fluidos corporais. Embora a saliva e a urina sejam facilmente colhidas e não-invasivas, as análises ao sangue (minimamente invasivos) são o método *gold standard* nos laboratórios de análises clínicas. Contudo, ainda não se esclareceu como é que a concentração de analitos no sangue se correlaciona diretamente às mudanças fisiopatológicas que ocorrem no cérebro, particularmente no caso da DA.

Por fim, no futuro o principal objetivo dos biomarcadores da DA será o de facilitar o diagnóstico acurado desta doença (ou o prognóstico na evolução de DCL para DA), através de um rastreio rápido, económico e não-invasivo da população e numa fase inicial em que a terapêutica eficaz seja factível e acessível.

## **5. Bibliografia**

1. Berchtold N, Cotman C. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*. 1998;19(3):173–89.
2. Dan L, Longo M, Fauci M, Kasper D, Hauser S, Jameson L, et al. Section 14: Neurology. *Harrison's Manual of Medicine*. 18th ed. 2013. p. 1212–20.
3. Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112–7.
4. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Pina M. *World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction an analysis of protective and modifiable factors*. Alzheimer's Disease International (ADI). 2014.
5. David S, Knopman F, Petersen RC. Essentials of the Proper Diagnoses of Mild Cognitive Impairment, Dementia, and Major Subtypes of Dementia. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1290–308.
6. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):640–51.
7. Crews L, Masliash E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2010;19(1):12–20.
8. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi H. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2007;3(3):186–93.
9. Ferreira S, Massano J. *Terapêutica farmacológica na Doença de Alzheimer : progressos e esperanças futuras*. *Arq Med*. 2013;27(2):65–86.
10. Atkinson J, Warren G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
11. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol*. 2011;29(1):26–32.
12. Chintamaneni M, Bhaskar M. Biomarkers in Alzheimer's Disease: A Review. *ISRN Pharmacol*. 2012;1–6.
13. Barnes D, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011;10(9):819–28.
14. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2011;377:1019–31.
15. Kalaria R, Maestre G, Arizaga R, Friedland R, Galasko D, Hall K, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management and risk factors. *Lancet Neurol*. 2008;7(9):812–26.

16. Prince M, Jackson J. World Alzheimer Report. Alzheimer's Disease International. 2009 p. 1–96.
17. Nunes B, Silva R, Cruz V, Roriz J, Pais J, Silva M. Prevalence and pattern of cognitive impairment in rural and urban populations from Northern Portugal. *BMC Neurol.* 2010;10(42):1–12.
18. Rossor MN, Fox NC, Mummery CJ, Schott JM, Warren JD. The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol.* 2010;9(8):793–806.
19. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(2):168–74.
20. Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, et al. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1996;39(1):62–70.
21. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68(1):1–14.
22. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239–59.
23. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 1995;16(3):271–8.
24. Chu L. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J.* 2012;18(3):228–37.
25. Abordagem Terapêutica das Alterações Cognitivas. 053/2011 Portugal: Direcção-Geral da Saúde; 2011 p. 1–21.
26. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2011;7(3):263–9.
27. Gonzaga L, Pais J, Nunes B. Memória - funcionamento, perturbações, treino. *Demências e memória.* 2008. p. 225–55.
28. Wind A, Schellevis F, Van Staveren G, Scholten R, Jonker C, Van Eijk J. Limitations of the Mini-Mental State Examination in diagnosing dementia in general practice. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1997;12(1):101–8.
29. Nasreddine Z, Phillips N, Bédirian V, Charbonneau, S Whitehead V, Collin I, Cummings J, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53(4):695–9.
30. Reisberg B, Ferris S, de Leon M, Crook T. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry.* 1982;139(9):1136–9.

31. Morris J. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412–4.
32. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387–403.
33. Jack CJ, Knopman D, Jagust W, Shaw L, Aisen P, Weiner M, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):119–28.
34. Sperling R, Aisen P, Beckett L, Bennett D, Craft S, Fagan A, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2011;7(3):280–92.
35. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006;5(3):228–34.
36. Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, Wallin A, Blennow K, Hansson O. Cerebrospinal fluid levels of  $\beta$ -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69(1):98–106.
37. Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2001;24(3):87–97.
38. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel S, Goernitz A, Andreasen N, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(1):95–102.
39. Blennow K. Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease. *NeuroRx*. 2004;1(2):213–25.
40. Mattsson N, Rosén E, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, et al. Age and diagnostic performance of Alzheimer disease CSF biomarkers. *Neurology*. 2012;78(7):468–76.
41. Van Rossum I, Vos S, Burns L, Knol D, Scheltens P, Soininen H, et al. Injury markers predict time to dementia in subjects with MCI and amyloid pathology. *Neurology*. 2012;79(17):1809–16.
42. Apostolova L, Cummings J. Neuropsychiatric Manifestations in Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review of the Literature. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;25(2):115–26.
43. Forlenza O V, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med*. 2010;8(89):1–14.
44. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: A concept in evolution. *J Intern Med*. 2014;275(3):214–28.

45. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2011;7(3):270–9.
46. Perl D. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med.* 2010;77(1):32–42.
47. Cummings J. *The Neuropsychiatry of Alzheimer's Disease and Related Dementias.* 2013.
48. Netter FH. *Nervous System, Volume I. The Ciba Collection of Medical Illustrations.* 1991.
49. Alves L, Correia ASA, Miguel R, Alegria P, Bugalho P. Alzheimer's disease: A clinical practice-oriented review. *Front Neurol.* 2012;3(63):1–20.
50. Alzheimer's Disease Education and Referral Center a service of the NI on A. Alzheimer's disease brain preclinical [Internet]. 2000. Available from: <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Resources/HighRes.htm>
51. Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.* 1992;267(1):546–54.
52. Vehmas A, Kawas C, Stewart W, Troncoso J. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(2):321–31.
53. LeVine H. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzym.* 1999;309:274–84.
54. Krebs M, Bromley E, Donald A. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol.* 2005;149(1):30–7.
55. Masliah E, Terry R, Mallory M, Alford M, LA H. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1990;137(6):1293–7.
56. Hyman B, Marzloff K, Arriagada P. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993;52(6):594–600.
57. Giannakopoulos P, Herrmann F, Bussi ere T, Bouras C, K ovari E, Perl D, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology.* 2003;60(9):1495–500.
58. Holtzman D, Morris J, Goate A. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011;3(77).
59. Bu e L, Bussi ere T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof P. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33(1):95–130.
60. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006;112(4):389–404.

61. Golde T, Dickson D, Hutton M. Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3(5):421–30.
62. Christensen DD. Changing the Course of Alzheimer's Disease: Anti-Amyloid Disease-Modifying Treatments on the Horizon. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2007;9(1):32–41.
63. Selkoe D. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;924:17–25.
64. Small S, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 2008;60(4):534–42.
65. Wang J, Dickson D, Trojanowski J, Lee V. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol.* 1999;158(2):328–37.
66. Cooke S, Bliss T. Plasticity in the human central nervous system. *Brain.* 2006;129(7):1659–73.
67. Shankar MG, Li S, Mehta HT, Garci-Munoz A, Shepardson EN, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14:837–42.
68. Irizarry M, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman B. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):965–73.
69. Mucke L, Selkoe JD. Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):1–17.
70. Rapoport M, Dawson H, Binder L, Vitek M, Ferreira A. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Acad Sci USA.* 2002;99(9):6364–9.
71. Roberson E, Scarce-Levie K, Palop J, Yan F, Cheng I, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science (80- ).* 2007;316(5825):750–4.
72. Geula C. Pathological Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Early Diagnosis of Alzheimer's Disease.* 2000. p. 65–82.
73. Resende R, Moreira P, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(12):2051–7.
74. Mattson M. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004;430:631–9.
75. Mandelkow E, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):1–25.



76. Iqbal K, Liu F, Gong C, Alonso AC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):53–69.
77. Henry W, Querfurth M, LaFerla F. Mechanisms of disease: Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med.* 2010;362:329–44.
78. Iqbal K, Flory M, Khatoon S, Soininen H, Pirttila T, Lehtovirta M, et al. Subgroups of Alzheimer’s disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol.* 2005;58(5):748–57.
79. Gong C, Shaikh S, Wang J, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 1995;65(2):732–8.
80. Köpke E, Tung Y, Shaikh S, Alonso A, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24374–84.
81. Selkoe DJ. Alzheimer’s Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev.* 2001;81(2):742–60.
82. Thinakaran G, Koo E. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem.* 2008;283(44):29615–9.
83. Lee J, Retamal C, Cuitiño L, Caruano-Yzermans A, Shin J, van Kerkhof P, et al. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11501–8.
84. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):1–20.
85. St George-Hyslop P, Fraser P. Assembly of the presenilin  $\gamma$ - $\epsilon$ -secretase complex. *J Neurochem.* 2012;120(1):84–8.
86. Schenk D, Basi G, Pangalos M. Treatment strategies targeting amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9):1–6.
87. Cole S, Vassar R. The Alzheimer’s disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* 2007;2:2–22.
88. Vassar R, Kovacs D, Yan R, Wong P. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer’s disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci.* 2009;29(41):12787–94.
89. Hiltunen M, Mäkinen P, Peräniemi S, Sivenius J, van Groen T, Soininen H, et al. Focal cerebral ischemia in rats alters APP processing and expression of Abeta peptide degrading enzymes in the thalamus. *Neurobiol Dis.* 2009;35(1):103–13.
90. Puertollano R, Bonifacino J. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol.* 2007;6(3):244–51.
91. Kang E, Cameron A, Piazza F, Walker K, Tesco G. Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem.* 2010;285(31):24108–19.

92. Tanzi R, Moir R, Wagner S. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*. 2004;43(5):605–8.
93. Mawuenyega K, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris J, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* (80- ). 2010;330(6012):1774.
94. Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard N, et al. Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res*. 2002;43(1):39–56.
95. Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett*. 2003;350(2):113–6.
96. Meilandt W, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito L, Scarce-Levie K, et al. Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic Abeta oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2009;29(7):1977–86.
97. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman E, Frosch M, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4162–70.
98. Finsen B, Owens T. Innate immune responses in central nervous system inflammation. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3806–12.
99. Meraz-Ríos M, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci*. 2013;7(59):1–15.
100. Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman A, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*. 39:115–23.
101. Caramona M, Esteves AP, Gonçalves J, Macedo T, Mendonça J, Osswald W, et al. Sistema Nervoso Central. In: *INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I/ M, Saúde D*, editors. *Prontuário Terapêutico*. 11th ed. 2012. p. 158–63.
102. Viola LF, Nunes P V, Yassuda MS, Aprahamian I, Santos FS, Santos GD, et al. Effects of a multidisciplinary cognitive rehabilitation program for patients with mild Alzheimer's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(8):1395–400.
103. Becker R. Therapy of the Cognitive Deficit in Alzheimer's Disease: The Cholinergic System. *Cholinergic Basis for Alzheimer Therapy*. 1991. p. 1–22.
104. Kaduszkiewicz H, Zimmermann T, Beck-Bornholdt H-P, van den Bussche H. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ*. 2005;331:321–7.

105. Rogers S, Farlow M, Doody R, Mohs R, Friedhoff L. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*. 1998;50(1):136–45.
106. Raschetti R, Albanese E, Vanacore N, Maggini M. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. *PLOS Med*. 2007;4(11):1818–28.
107. Jarvis B, Figgitt D. Memantine. *Drugs Aging*. 2003;20(6):465–76.
108. Winblad B, Poritis N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry*. 1999;14(2):135–46.
109. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius H. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1333–41.
110. Solomon A, Kivipelto M, Soininen H. Prevention of Alzheimer's disease: moving backward through the lifespan. *J Alzheimer's Dis*. 2013;33:465–9.
111. Hughes T, Ganguli M. Modifiable Midlife Risk Factors for Late-Life Cognitive Impairment and Dementia. *Curr Psychiatry Rev*. 2009;5(2):73–92.
112. Williams J, Plassman B, Burke J, Benjamin S. Preventing Alzheimer's disease and cognitive decline. Evidence Report/Technology Assessment. 2010 p. 1–727.
113. Holland D, Desikan R, Dale A, Mc Evoy L. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Rates of decline in Alzheimer's disease decreases with age. *PLoS One*. 2012;7(8):42320–5.
114. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(5):333–44.
115. Aprahamian I, Martinelli JE YM. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Clin Med*. 2013;1:135.
116. Morris J, Roe C, Xiong C, Fagan A, Goate A, Holtzman D, et al. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol*. 2010;67(1):122–31.
117. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 2008;118(12):4002–13.
118. Poirier J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2005;26(3):355–61.
119. Tanzi R. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10):1–10.
120. Viña J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimer's Dis*. 2010;20(2):527–33.

121. Oliveira S, Ribeiro C, Cardoso I, Saraiva M. Gender-dependent transthyretin modulation of brain amyloid- $\beta$  levels: evidence from a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;27(2):429–39.
122. Kessing L. Depression and the risk for dementia. *Curr Opin Psychiatry.* 2012;25(6):457–61.
123. Gracia-García P, de-la-Cámara, C Santabábara J, Lopez-Anton R, Quintanilla M, Ventura T, Marcos G, et al. Depression and incident Alzheimer disease: the impact of disease severity. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2015;23(2):119–29.
124. Kivipelto M, Helkala E, Hänninen T, Laakso M, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology.* 2001;56(12):1683–9.
125. Polónia J, Maldonado J, Ramos R, Bertoquini S, Duro M, Almeida C, et al. Estimation of salt intake by urinary sodium excretion in a Portuguese adult population and its relationship to arterial stiffness. *Rev Port cardiol.* 2006;25(9):801–17.
126. Luchsinger J, Tang M, Stern Y, Shea S, Mayeux R. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am J Epidemiol.* 2001;154(7):635–41.
127. Luchsinger J. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol.* 2008;6(585):119–29.
128. Park C. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25(4):311–23.
129. Kuo Y, Emmerling M, Bisgaier C, Essenburg A, Lampert H, Drumm D, et al. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(3):711–5.
130. Fleminger S, Oliver D, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(7):857–62.
131. Merchant C, Tang M, Albert S, Manly J, Stern Y, Mayeux R. The influence of smoking on the risk of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1999;52(7):1408–12.
132. Roberts R, Geda Y, Cerhan J, Knopman D, Cha R, Christianson T, et al. Vegetables, unsaturated fats, moderate alcohol intake, and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010;29(5):413–23.
133. Lopez L, Kritz-Silverstein D, Barret CE. High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: the Rancho Bernardo study. *J Nutr Heal Aging.* 2011;15:25–31.
134. Solfrizzi V, Frisardi V, Seripa D. Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Curr Alzheimer Res.* 2011;8:520–42.

135. Conquer J, Tierney M, Zecevic J, Bettger W, Fisher R. Fatty acids analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*. 2000;35(12):1305–12.
136. Yurko-Mauro K, McCarthy D, Rom D, Nelson E, Ryan A, Blackwell A, et al. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement*. 2010;6(6):456–64.
137. Soni M, Kos K, Lang I, Jones K, Melzer D, Llwellyn D. Vitamin D and cognitive function. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;24:79–82.
138. Robin X. Panels of biomarkers to improve patient classification in brain diseases. Université de Genève; 2012. p. 13–9.
139. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003;2:605–13.
140. Tang BL, Kumar R. Biomarkers of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Ann Acad Med*. 2008;37:406–10.
141. Fagan A, Mintun M, Mach R, Lee S, Dence C, Shah A, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol*. 2006;59(3):512–9.
142. Strozzyk D, Blennow K, White L, Launer L. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology*. 2003;60(4):652–6.
143. Aerts M, Esselink R, Claassen J, Abdo W, Bloem B, Verbeek M. CSF tau, A $\beta$ 42, and MHPG differentiate dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(2):377–84.
144. Wiltfang J, Esselmann H, Smirnov A, Bibl M, Cepek L, Steinacker P, et al. Beta-amyloid peptides in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 2003;54(4):263–7.
145. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler J, Henkel A, Henkel M, et al. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging*. 2004;25(3):273–81.
146. Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, Diehl J, Drzezga A, Kurz A. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2002;59(11):1729–34.
147. Schuff N, Woerner N, Boreta L, Kornfield T, Shaw L, Trojanowski J, et al. MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimer's disease in relation to ApoE genotype and biomarkers. *Brain*. 2009;132(4):1067–77.
148. Fagan AM, Mintun M a., Shah AR, Aldea P, Roe CM, Mach RH, et al. Cerebrospinal fluid tau and ptau181 increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: Implications for future clinical trials of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2009;1:371–80.

149. Sluimer J, van der Flier W, Karas G, Fox N, Scheltens P, Barkhof F, et al. Whole-brain atrophy rate and cognitive decline: longitudinal MR study of memory clinic patients. *Radiology*. 2008;248(2):590–8.
150. Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, et al. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem*. 2007;101(4):1053–9.
151. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*. 2010;277(6):1348–58.
152. De Felice F, Wu D, Lambert M, Fernandez S, Velasco P, Lacor P, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging*. 2008;29(9):1334–47.
153. Rosén C, Hansson O, Blennow K, Zetterberg H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. *Mol Neurodegener*. 2013;8(20):8–20.
154. Abdi F, Quinn J, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz J, Peskind E, et al. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3):293–348.
155. Blasko I, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Jellinger K, et al. Plasma amyloid beta protein 42 in non-demented persons aged 75 years: effects of concomitant medication and medial temporal lobe atrophy. *Neurobiol Aging*. 2005;26(8):1135–43.
156. Assini A, Cammarata S, Vitali A, Colucci M, Giliberto L, Borghi R, et al. Plasma levels of amyloid beta-protein 42 are increased in women with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2004;63(5):828–31.
157. Tang K, Hynan L, Baskin F, Rosenberg R. Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2006;240(1-2):53–8.
158. Van Oijen M, Hofman A, Soares H, Koudstaal P, Breteler M. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol*. 2006;5(8):655–60.
159. Okereke O, Xia W, Selkoe D, Grodstein F. Ten-year change in plasma amyloid beta levels and late-life cognitive decline. *Arch Neurol*. 2009;66(10):1247–53.
160. Lopez O, Kuller L, Mehta P, Becker J, Gach H, Sweet R, et al. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology*. 2008;70(19):1664–71.
161. Cosentino S, Stern Y, Sokolov E, Scarmeas N, Manly J, Tang MX, et al. Plasma beta-amyloid levels associated with cognitive decline. *Arch Neurol*. 2010;67(12):1485–90.
162. Schupf N, Tang M, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta A, et al. Peripheral A $\beta$  subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14052–7.

163. Yaffe K, Weston A, Graff-Radford N, Satterfield S, Simonsick E, Younkin S, et al. Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA*. 2011;305(3):261–6.
164. Devanand D, Schupf N, Stern Y, Parsey R, Pelton G, Mehta P, et al. Plasma A $\beta$  and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2011;77(2):125–31.
165. Lui J, Laws S, Li Q, Villemagne V, Ames D, Brown B, et al. Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1233–42.
166. Jack CR, Wiste HJ, Vemuri P, Weigand SD, Senjem ML, Zeng G, et al. Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain*. 2010;133:3336–48.
167. Cedazo-Minguez A, Winblad B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):5–14.
168. Leinonen V, Alafuzoff I, Aalto S, Suotunen T, Savolainen S, Någren K, et al. Assessment of beta-amyloid in a frontal cortical brain biopsy specimen and by positron emission tomography with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B. *Arch Neurol*. 2008;65(10):1304–9.
169. Svedberg M, Hall H, Hellström-Lindahl E, Estrada S, Guan Z, Nordberg A, et al. [(11)C]PIB-amyloid binding and levels of Abeta40 and Abeta42 in postmortem brain tissue from Alzheimer patients. *Neurochem Int*. 2009;54(5-6):347–57.
170. Klunk W, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt D, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004;55(3):306–19.
171. Mintun M, Larossa G, Sheline Y, Dence C, Lee S, Mach R, et al. [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology*. 2006;67(3):446–52.
172. Rowe C, Ellis K, Rimajova M, Bourgeat P, Pike K, Jones G, et al. Amyloid imaging results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) study of aging. *Neurobiol Aging*. 2010;31(8):1275–83.
173. Wolk D, Price J, Saxton J, Snitz B, James J, Lopez O, et al. Amyloid imaging in mild cognitive impairment subtypes. *Ann Neurol*. 2009;65(5):557–68.
174. Hamdan AC. Avaliação Neuropsicológica na Doença de Alzheimer e no Comprometimento Cognitivo Leve. *Psicol Argumento*. 2008;26(Mci):183–92.
175. Hesse C, Rosengren L, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Jensen C, Davidsson P, et al. Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J Alzheimers Dis*. 2000;2(3-4):199–206.

176. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 2002;58(2):192–7.
177. Herukka S, Hallikainen M, Soininen H, Pirttilä T. CSF Abeta42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64(7):1294–7.
178. Wallin A, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21(3):131–8.
179. Schoonenboom N, Pijnenburg Y, Mulder C, Rosso S, Van Elk E, Van Kamp G, et al. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;62(9):1580–4.
180. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel S, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006;129(11):3035–41.
181. Mitchell A. CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(9):966–75.
182. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, Teipel S, Zinkowski R, Moeller H, et al. Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol*. 2001;49(4):545–6.
183. Gómez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz M, Cantarero S, Cemillán C, et al. Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003;60(9):1218–22.
184. Fagan A, Roe C, Xiong C, Mintun M, Morris J, Holtzman D. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol*. 2007;64(3):343–9.
185. Carpenter J, Jackson W, de Souza G, Haarr L, Grose C. Insulin-degrading enzyme binds to the nonglycosylated precursor of varicella-zoster virus gE protein found in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 2010;84(2):847–55.
186. Hampel H, Blennow K, Shaw L, Hoessler Y, Zetterberg H, Trojanowski J. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):30–40.
187. Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, et al. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2005;373(1):1–4.
188. Marksteiner J, Humpel C. Glycogen-synthase kinase-3beta is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment. *Exp Gerontol*. 2009;44(6-7):370–1.
189. De Barry J, Liégeois C, Janoshazi A. Protein kinase C as a peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):64–9.



190. Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis L, Ferri C, et al. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol.* 2000;103:97–102.
191. Pirttila T, Mehta P, Frey H, Wisniewski H. Alpha 1-antichymotrypsin and IL-1 beta are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1994;15:313–7.
192. Lee K, Chung J, Choi T, Suh S, Oh B, Hong C. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;28(4):281–7.